الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم الإنتاج الحيواني

إنتاج الأجنة ونقلها في الأبقار الشامية

أطروحة أُعدّت لاستكمال متطلبات الحصول على درجة دكتوراة في العلوم الزراعية

تخصص: إنتاج حيواني – فيزيولوجيا تناسل

إعداد: المهندس ماجد الدكاك

(ماجستير في الإنتاج الحيواني)

إشـراف

أ. د. سليمان سلهب
كلية الزراعة
جامعة دمشق

د. المعتصم بالله الدقر
إدارة بحوث الثروة الحيوانية
الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية

دمشق، 2012

تصريــح

أصرح بأن هذا البحث **(إنتاج الأجنة ونقلها في الأبقار الشامية)** لم يسبق أن قبل للحصول على أية شهادة، ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

المرشح

ماجد زهير الدكاك

Declaration

I confirm that this thesis titled "Production and transfer of embryos in Shami cattle" has not submitted previously to get a certificate and is not submitted now to get another certificate.

Majed Al- Dakkak

كلمـة شـكر

الحمد لله عز وجل الذي وفقني لإنجاز هذه الأطروحة، وعرفاناً بالجميل أتقدم بالشكر الجزيل لكل من ساهم في تنفيذها، وأخص بالذكر:

- **الأستاذ الدكتور سليمان سلهب** – كلية الزراعة– جامعة دمشق الذي تكرم بالإشراف على هذه الأطروحة وتتبع خطوات التنفيذ وتذليل كافة الصعوبات والمشاكل التي صادفتني أثناء الإعداد، مع خالص التمنيات بالتوفيق الدائم والدعاء النابع من القلب بأن تكتب جهوده المظفرة في صفيحة أعماله لترفعه إلى الدرجات العلى في الدنيا والآخرة.
- **الدكتور المعتصم بالله الدقر**– إدارة بحوث الثروة الحيوانية– الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية الذي واكب تنفيذ هذه الدراسة خطوة خطوة، وبذل جهداً كبيراً لإكمال التنفيذ وتأمين كافة المتطلبات.
- **الأستاذ الدكتور هيثم السيد** – كلية الهندسة التقنية– جامعة حلب، لما قدمه من مساهمات كبيرة وجهد مشكور في الجزء الخاص بتجنيس الأجنة.
- **المهندس عدنان الأسعد**– مدير إدارة بحوث الثروة الحيوانية، لما قدمه من دعم وتسهيلات لإنجاز هذه الدراسة.
- **المهندس عقبة محمد**– إدارة بحوث الثروة الحيوانية– على دعمه المعنوي، ومساعدته الكبيرة في إنجاز التحليل الإحصائي.
- **المراقب البيطري عدنان السيبي**، والعامل **عبد الباسط شلحة**، وكافة العاملين في محطة بحوث الأبقار الشامية الذين قدموا كل مساعدة ممكنه لتنفيذ العمل الحقلي الذي تطلب جهداً كبيراً وشاقاً.
- **جميع الزملاء والعاملين في إدارة بحوث الثروة الحيوانية.**

الفهرس

الخلاصة: .....أ

الخلاصة باللغة الانكليزية Abstract: .....a

1: مقدمة عامة: 1

2. المواد والطرائق: 3

2-1. حيوانات التجارب: 3

2-2. فحص المبايض: 4

3. الفصل الأول: توقيت الشبق والإباضة في الأبقار الشامية: 5

3-1. مقدمة: 6

3-2. المواد والطرائق: 10

3-3. التحليل الإحصائي: 12

3-4. النتائج: 14

3-5. المناقشة: 26

4. الفصل الثاني: إنتاج الأجنة في الأبقار الشامية: 37

4-1. مقدمة: 38

4-2. المواد والطرائق: 42

4-3. نقل الأجنة: 48

4-4. التحليل الإحصائي: 49

4-5. النتائج: 51

4-6. المناقشة: 57

5. الفصل الثالث: تجميد الأجنة وتجنيسها: 68

5-1. مقدمة 69

5-2. المواد والطرائق: 71

5-2-1. تجميد الأجنة: 71

5-2-2. إذابة الأجنة وتقييمها: 72
5-2-3. تجنيس الأجنة: 72
استخلاص المادة الوراثية من الأجنة 72
استخلاص المادة الوراثية من الدم 73
5-2-3-1. تقدير جودة الـDNA: 74
5-2-3-2. تقدير كمية الـDNA: 75
5-2-3-3. تفاعل البوليميريز المتسلسل PCR: 76
أ :مواد التفاعل: 76
ب :تحضير العينات: 77
ج: تحميل العينات على هلامة الآغار: 79
5-3. التحليل الإحصائي: 80
5-4. النتائج: 81
5-4-1. تجميد الأجنة:: 81
5-4-2. تجنيس الأجنة 81
5-5. المناقشة: 83
5-5-1. التجميد: 83
5-5-2. التجنيس: 84
6. الاستنتاجات: 87
7. التوصيات: 88
8. المراجع: 89
9. السيرة الذاتية: 106
10-الأبحاث المنشورة من الأطروحة: 107

فهرس الجداول:

الجدول 3–1. تحليل التغاير لتأثير العوامل المدروسة في ديناميكية الجريبات المبيضية في الأبقار الشامية. 14

الجدول 3-2. تحليل التغاير لتأثير العوامل المدروسة في قطر الجريب السائد وفي موعدي حدوث الشبق والإباضة في الأبقار الشامية 18

الجدول 3–3. متوسط أدنى المربعات لمواصفات الجريب السائد، وموعد الشبق والإباضة في الأبقار الشامية 18

الجدول 3–4. تحليل التغاير لتأثير العوامل المدروسة في العدد اليومي للجريبات المبيضية في الأبقار الشامية 20

الجدول 3–5. تحليل التغاير لتأثير العوامل المدروسة في مواصفات الجريبات المبيضية والجسم الأصفر في الأبقار الشامية.....24

الجدول 3–6. متوسط مواصفات الجريبات المبيضية والجسم الأصفر للأبقار الشامية المعاملة بهرموني GnRHو hCG في مرحلة نمو الجريب المبيضي السائد في الموجة المبيضية الأولى.....25

الجدول 4–1. تحليل التغاير لتأثير نوع منشطات المناسل وعمر البقرة في مؤشرات الإباضة المتعددة وإنتاج الأجنة في لأبقار الشامية.....52

الجدول 4–2. متوسط مؤشرات الإباضة المتعددة والأجنة القابلة للنقل وفقاً لنوع منشط المناسل وحجم الجرعة في الأبقار الشامية.....56

الجدول 5–1. البادئات المستخدمة في تحديد جنس الجنين في الأبقار الشامية 77

الجدول 5–2. نسبة الأجنة الحية بعد التجميد والإذابة بطريقة التزجيج حسب مرحلة التطور الجنيني في الأبقار الشامية. 81

فهرس الأشكال

الشكل 3–1. متوسط أدنى المربعات لعدد الجريبات المبيضية الصغيرة ± الخطأ القياسي في الأبقار الشامية حسب بروتوكول المعاملة الهرمونية 15

الشكل 3–2. متوسط أدنى المربعات لعدد الجريبات المبيضية المتوسطة ± الخطأ القياسي في الأبقار الشامية حسب بروتوكول المعاملة الهرمونية 16

الشكل3–3. متوسط أدنى المربعات لعدد الجريبات المبيضية الكبيرة ± الخطأ القياسي في الأبقار الشامية حسب بروتوكول المعاملة الهرمونية. 17

الشكل3–4. متوسط أدنى المربعات لعدد الجريبات المبيضية الصغيرة ± الخطأ القياسي في الأبقار الشامية المعاملة هرمونياً 21

الشكل3–5. متوسط أدنى المربعات لعدد الجريبات المبيضية المتوسطة ± الخطأ القياسي في الأبقار الشامية المعاملة هرمونياً.....22

الشكل 3–6. متوسط أدنى المربعات لعدد الجريبات المبيضية الكبيرة ± الخطأ القياسي في الأبقار الشامية المعاملة هرمونياً 23

فهرس المخططات:

المخطط 1. برنامج PG+GnRH مع CIDR أو من دونه المستخدم في توقيت الشبق للأبقار الشامية خلال نمو الجريب السائد أو تراجعه في الموجة الجريبية الأولى من دورة الشبق.....11

المخطط 2. بروتوكول الإباضة المتعددة في الأبقار الشامية حسب جرعة هرمون FSH ومصدره 44

المخطط 3. بروتوكول الإباضة المتعددة في الأبقار الشامية التي لقحت صناعياً بعد0، و12 ساعة من ظهور الشبق.....44

فهرس الصور:

الصورة 1: فحص المبايض باستخدام جهاز راسم الصدى 47
الصورة 2: التلقيح الصناعي في الأبقار الشامية.....47
الصورة 3: جريبات محرضة بهرمون الإباضة المتعددة 47
الصورة 4: أجسام صفراء ناتجة عن انفجار الجريبات المحرضة بالإباضة المتعددة.....47
الصورة 5: البحث عن الأجنة باستخدام المجسام الضوئي.....47
الصورة 6: أجنة في مرحلة التويتة من الدرجة الأولى 47
الصورة 7: أجنة في مرحلة الكيس الأرومي 48
الصورة 8: جنين من الدرجة الثانية 48
الصورة 9: جنين من الدرحة الثالثة 48
الصورة 10: أجنة من الدرجة الرابعة.....48
الصورة 11: بقرة شامية مستقبلة حامل بجنين بقرة شامية مانحة أ- حمل بعد نقل الجنين بـ25 يوماً
ب: حمل بعد نقل الجنين بـ35 يوماً.55
الصورة 12. ولادة بقرة شامية مستقبلة بطريقة نقل الأجنة زرع فيها جنين من بقرة شامية مانحة.....55
الصورة 13: سحب خلية من جنين الأبقار الشامية.....73
الصورة 14: مقارنة كثافة حزم العينات المختبرة مع كثافة حزم السلالم المعيارية المعلومة التركيز
في المسار الأول والأخير للتأكد من جودة DNA.....75
الصورة 15: ظهور حزم DNA على هلامة الآغار وفقاً لحجمها للاستدلال على صفة الذكورة أو الأنوثة
في أجنة الأبقار الشامية قبل نقلها 82

إنتاج الأجنة ونقلها في الأبقار الشامية

الخلاصة:

نفذت الدراسة خلال الفترة 2009–2012 في محطة بحوث دير الحجر للأبقار الشامية، إدارة بحوث الثروة الحيوانية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، وبمخبر نقل الأجنة في إدارة بحوث الثروة الحيوانية، بينما جنست الأجنة بمخبر كلية الهندسة التقنية في جامعة حلب.

استخدمت 45 بقرة شامية بمواسم انتاجية مختلفة (1–5) وبعمر راوح بين 30 و92 شهراً، لرصد ديناميكية الجريبات المبيضية للأبقار الشامية المعاملة هرمونياً، وتوقيت الشبق أثناء نمو الجريب المبيضي السائد أو خلال تراجعه، وتحديد فعالية الهرمون المحرر لموجّهة القند GnRH أو هرمون بول المرأة الحامل hCG في إحداث الإباضة أثناء نمو الجريب السائد في الموجة المبيضية الأولى، وتحديد كمية ونوع الهرمون المحرض للإباضة الأمثل في معدل الإباضة وعدد الأجنة وحيويتها، وتحديد الموعد الأمثل للتلقيح الصناعي في معدل الإخصاب، وعدد الأجنة وحيويتها بغرض نقلها وتجميدها أو تجنيسها في الأبقار الشامية. فحصت المبايض يومياً عدة مرات باستخدام جهاز راسم الصدى لتتبع ديناميكية نمو الجريبات المبيضية والجسم الأصفر.

خُصص **الجزء الأول** من التجربة الأولى لدراسة توقيت الشبق في 26 بقرة شامية وُزعت عشوائياً على أربع مجموعات متوسط عمرها 58.99±4.24 شهراً، ومتوسط مواسمها الإنتاجية 2.70±0.30موسم. أودعت لوالب CIDR (1.38 غ بروجسترون) في مهابل أبقار المجموعتين 1 (ن=8)، و2 (ن=8) لمدة 7 أيام و حقن GnRH (50 ميكروغرام gonadorelin diacetate tetrahydrate) في اليوم 5 (المجموعة الأولى)، واليوم 9 (المجموعة الثانية) من دورة الشبق، بينما حقنت أبقار المجموعتين 3(ن=5)، و4(ن=5) بهرمون GnRH بالجرعة ذاتها، وفي الموعد ذاته (اليوم 5 أو 9، على التوالي، من دورة الشبق) دون إيداع لوالب في مهابلها، وحُقن البروستاغلاندين عضلياً بعد 7 أيام من حقن GnRH في المجموعات كافة بمعدل 500 ميكروغرام كلوبروستينول cloprostenol.

استخدم في **الجزء الثاني من التجربة الأولى** 15 بقرة شامية لإحداث الإباضة وتوقيتها، وُزعت الحيوانات عشوائياً بصورة متساوية على ثلاث مجموعات متوسط عمرها 55.77±5.94 شهراً، ومتوسط موسمها الإنتاجي 2.67±0.21. تُركت مجموعة الشاهد بلا معاملة (المجموعة 1)، وحقنت أبقار المجموعتين

2 و3 عضلياً في اليوم الخامس من دورة الشبق إما بـ GnRH (8 ميكروغرام بوسيرلين، المجموعة 2)، أو3000 وحدة دولية من هرمون hCG، المجموعة3).

بينما خصصت الحيوانات (n=29) في **التجربة الثانية** بهدف إنتاج الأجنة، وزعت الحيوانات عشوائياً إلى 6 مجموعات متوسط عمرها 56.09±4.40 شهراً ومتوسط موسمها الإنتاجي 2.61±0.31 حسب نوع مستحضر هرمون FSH وكميته، وموعد التلقيح الصناعي. أودعت اللوالب CIDR الحاوية على 1.38غ بروجسترون في مهابل أبقار المجموعات الأربع الأولى (A، وB، وC، وD) لمدة 7 أيام، وحقنت أبقار المجموعة A (n=5) وB (ن=6) عضلياً بـ8 جرعات متناقصة تدريجياً اعتباراً من اليوم الرابع من تركيب اللولب ولمدة 4 أيام (مرتين/يوم) من هرمون FSH قدرها 400 و200مغ NIH-FSH-P1، على التوالي. وأعطي GnRH بمعدل 100 ميكروغرامgonadorelin diacetate tetrahydrate بعد نزع اللوالب بـ 36 ساعة. بينما حقنت الأبقار في **المجموعتين C** (ن=4)، وD (ن=4) عضلياً بـ750 وحدة دولية من مستحضر يحتوي هرموني FSH وLH في الموعد ذاته وبمقدار 8 جرعات متناقصة تدريجياً، أما **المجموعتين E، وF** فحقنت بهرمون PMSG في اليوم التاسع من دورة الشبق بجرعة قدرها 2000 وحدة دولية (ن=5)، و4000 وحدة دولية (ن=5)، على التوالي. حقن البروستاغلاندين F2α بمعدل 750 ميكروغرام كلوبروستينول عضلياً لكافة الحيوانات قبل 12 ساعة من نزع اللوالب في المجموعات الأربع الأولى، وبعد يومين من حقن هرمون PMSG للمجموعتين الأخيرتين. لقحت الأبقار صناعياً مرتين بعد 12، و24 ساعة من ظهور الشبق في كافة المجموعات عدا المجموعة C التي لقحت فيها الأبقار صناعياً بعد 0، و12 ساعة من ظهور الشبق. جمعت الأجنة بعد 7 أيام من بدء الشبق باستخدام الطريقة غير الجراحية بواسطة قسطرة ثلاثية الشعب، وبُحث عن الأجنة بواسطة المجسام الضوئي، وعزلت لتقييمها.

جُمّد في **التجربة الثالثة** 48 جنيناً من الدرجة الأولى والثانية في كل من مرحلتي الكيس الأرومي (ن=28) والتويتة (ن=20) بطريقة التزجيج vitrification، باستخدام محلول نهائي مكون من 10% سيروم دم العجل + 90% PBS يحتوي على 16.5% إتيلين غليكول و16.5% داي متيل سولفوكسيد و0.5 مول/ليتر سكروز، عُبّئت1–3 أجنة في قشات 0.25 مل في وسط التجميد، وغمرت مباشرة في السائل الآزوتي وخُزّنت فيه لنحو 4 أشهر، أذيبت القشات الحاملة للأجنة في حمام مائي حرارته 39 °م وفرغت محتوياتها في طبق بتري، ونُقلت إلى محلول مكون من 10% سيروم دم العجل + 90% PBS ويحوي على السكروز بتركيز 0.25 مول/ل لمدة 1 دقيقة، ومن ثم بتركيز0.15 مول/ل لمدة 5 دقائق، وبعدها بتركيز 0 مول/ل لمدة 5 دقائق أخرى. وُضعت بعدها في حاضنة درجة حرارتها 38.5 م° في جو رطب ونسبة غاز

CO2 5% لمدة 4–5 ساعات، ثم أخرجت من الحاضنة وقيمت الأجنة شكلياً إلى أجنة صالحة للنقل وأخرى غير صالحة للنقل.

أما في **التجربة الرابعة** فقد استخدم 13 جنيناً بمرحلة التويتة أوالكيس الأرومي سُحب منها 1–2 خلية باستخدام إبرة رفيعة مركبة على مجهر مقلوب. وأجري تضخيم الـDNA المستخلص من الخلايا الجنينية بواسطة تقانة تفاعل البوليميريز المتسلسل المتعدد PCR، واختُبر 16 بادئ لتحديد المناسب منها في التجنيس.

أظهرت نتائج الجزء الأول وجود تأثير معنوي ($p < 0.01$) لموعد المعاملة ونوعها في ديناميكية العدد اليومي للجريبات الصغيرة والكبيرة، وبلغ معدل الإباضة بعد حقن هرمون GnRH 100% بالنسبة للمجموعتين 1 و3، ونحو 25% و40% في المجموعتين 2 و4، على التوالي. واستجابت جميع الأبقار الشامية المعاملة لبروتوكولات توقيت الشبق الذي حدث بعد مرور نحو 49.54±1.15 ساعة من حقن البروستاغلاندين، وحدثت الإباضة بعد نحو 72.46±1.05 ساعة من حقن PGF2α. ولم تؤثر نوع المعاملة في كل من موعد الشبق بعد حقن PGF2α، وفي قطر الجريب السائد عند الشبق، وبالمقابل كان قطر الجريب السائد عند الإباضة أعلى مايمكن ($p < 0.01$) في المجموعة 4 (15.70±0.38 مم)، وأقل مايمكن في المجموعة 2 (14.36±0.30 مم) كما تأخر موعد الإباضة ($p < 0.05$) بعد حقن هرمون PGF2α في المجموعة 4 إلى 76.85±2.21 ساعة مقارنة مع المجموعة 1 (68.96±1.77 ساعة).

أظهرت نتائج الجزء الثاني من التجربة الأولى تغيراً في ديناميكية الجريبات المبيضية بعد حقن هرموني GnRH وhCG. وحدثت الإباضة بمعدل 5/5، و 5/4 في المجموعتين 2 و3، على التوالي. ولم يتأثر قطر الجسم الأصفر الأصلي أو الثانوي المتشكل بعد الحقن بنوع المعاملة.

أظهرت نتائج التجربة الثانية وجود فرق معنوي بين مجموعات التجربة المعاملة بالهرمونات الموجهة للقند (FSH، LH/FSH، PMSG) في معدل الإباضة (A: 70.58^{b}±3.59، B: 80.34^{b}±1.54، C: 72.90^{b}±2.77، D: 81.40^{b}±4.30، E: 43.54^{a}±13.85، F: 61.20^{ba}±13.94؛ P^{a-b} <0.01)، وفي نسبة الإخصاب (A: 85.10^{b}±5.35، B: 82.32^{b}±3.31، C: 64.70^{a}±3.97، D: 82.14^{b}±3.57، E: 65.42^{a}±3.56، F: 86.67^{b}±8.16؛ P^{a-b}<0.05)، وفي عدد الأجنة القابلة للنقل (A: 5.50^{d}±0.29، B: 6.00^{d}±0.41، C: 3.50^{c}±0.29، D: 5.67^{d}±0.67، E: 1.50^{a}±0.29، F: 2.50^{b}±0.29؛ P^{a-d} <0.01)، وتفوقت هذه المؤشرات بصورة معنوية في المجموعات المعاملة بهرمون FSH مقارنة مع نظيراتها المعاملة بهرمون PMSG.

في التجربة الثالثة لم يلحظ وجود تأثير معنوي لمرحلة الجنين أو نوعيته اعتماداً على حجم كتلة الجنين المتماسكة المجمدة في معدل بقاء الأجنة، وكانت هذه النسبة في التويتة نحو 66.7%، و50.0% عندما كانت درجتها جودته 1، و2 ، على التوالي، بينما كان المعدل في مرحلة الكيس الأرومي 73.3% للنوعية 1، و53.8% للنوعية 2 للأجنة المجمدة.

نجح تجنيس الأجنة باستخدام زوجين فقط من البادئات (P1sex، P2sex، وP1Aut، P2Aut) من الـ16 المدروسة. حيث أظهرت حزمة DNA ذات الحجم الجزيئي 141 أساس أزوتي دالة على الصبغي الجنسي Y المميز للجنين الذكر، وغابت تلك الحزمة في أجنة الإناث.

سجلت 3 حالات حمل في أبقار شامية مستقبلة نُقلت إليها أجنة أبقار شامية، إذ ولدت بقرتان بينما نفقت البقرة الثالثة وهي حامل بعمر 7 شهر، مما يشير إلى إمكانية نجاح نقل الأجنة في هذا العرق المحلي.

واستنتج أن حقن الأبقار الشامية في اليوم الخامس من دورة الشبق بالمعدلات المدروسة من هرموني GnRH أوhCG يساعد في ظهور موجة مبيضية، وتحدث الإباضة بعد 24–48 ساعة من الحقن شريطة وجود حويصل مبيضي سائد. كما استنتج أن الأبقار الشامية تستجيب كبقية العروق الأخرى لبرامج الإباضة المتعددة، ويمكن تقليل كمية هرمون FSH بنحو 50% (200مغ) في حين لا ينصح باستخدام هرمون PMSG لوحده، وأن أفضل وقت للتلقيح الصناعي يكون مرتين بعد 12، و24 ساعة من بدء الشبق في برامج نقل الأجنة. ويمكن حفظ أجنة الأبقار الشامية بالتزجيج بتكلفة قليلة لموانع التجميد دون وجود تأثيرات سلبية كبيرة في نوعيتها. كما يمكن استخدام بادئات نوعية لتجنيس أجنة الأبقار الشامية بما يفيد في تقنيات نقل وتقسيم الأجنة المرغوبة في عمليات التحسين الوراثي.

توصي هذه الدراسة بإجراء مزيد من الدراسات المتعلقة بتجميد أجنة الأبقار الشامية بطريقة التزجيج، واختيار الأجنة المجنسة أنثوياً وزرعها في أبقار مستقبلة كمنطلق لإكثار هذا العرق وإعادة انتشاره.

الكلمات المفتاحية: توقيت الشبق، إنتاج الأجنة، تجميد الأجنة، التجنيس، الأبقار الشامية.

Production and Transfer of Embryos in Shami Cattle

Abstract:

This study was performed at Dier-Al-Hajar Station for Improving Shami Cattle, Animal Wealth Research Administration (AWRA), General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR) during 2009-2012, and at embryo transfer laboratory located in AWRA, while sexing embryos was performed at the Technological Engineering College, University of Aleppo.

Forty five Shami cows 30-92 months old having 1-5 parities were used to monitor dynamics of ovarian follicles in hormonal treated cows, study estrous synchronization during growing or regression of the dominant follicle in the first ovarian follicular wave, evaluate the ovarian response of cows to gonadotropin releasing hormone (GnRH) or human chorionic gonadotropin (hCG) injected when growing follicle was dominant in the first follicular wave of the estrous cycle, determine the optimal type and amount of ovulation stimulating hormone in ovulation rate and transferabe embryos, the optimal time of artificial insemination in superovulated cows, and transfer, freezing, and sexing embryos in Shami cows.

Transrectal ovarian ultrasonography was performed daily to monitor ovarian follicular dynamics and corpus luteum formation.

The first experiment was divided into 2 parts: 26 Shami cows assigned in the first part to study estrous synchronization were divided randomly into 4 groups (average age: 58.99±4.24 months, average parity: 2.70±0.30). GnRH (50 µg gonadorelin diacetate tetrahydrate) was injected intramusculary (i. m.) on day 5 (group1: n=8; group3: n=8) or on day 9 (group2: n=8; group4: n=5) of estrous cycle, Controlled intra-vaginal drug release device (CIDR) was inserted at time of GnRH injection for 7 days in groups1 and 2. prostaglandin(500 µg cloprostenol) was injected i.m. in all cows after 7 days of GnRH treatments.

In the second part, 15 Shami cows distributed randomly into 3 groups of five cows (average age: 55.77±5.94, average parity: 2.67±0.21) were used to induce and synchronize ovulation. Group 1 was assigned as a control and received no treatment, while Groups 2 and 3 received on day 5 of the estrous cycle a single i.m. injection of 8 µg of a GnRH agonist (Buserelin) and 3000 IU hCG, respectively.

Cows in **the second experiment** (n=29) allocated to embryos production were divided randomly into 6 groups (average age: 56.09±4.40, average parity: 2.61±0.31) according to type and amount of FSH hormone and time of artificial insemination. Cows in the first four groups (A, B, C, D) received CIDR (1.38g

progesterone) for 7 days. Cows in the groups A:(n=5) and B:(n=6) were treated i.m. with one of either 200 or 400 mg of NIH-FSH-P1 on the fourth day of estrous using progressively decreasing doses (twice/day for 4 days), respectively and GnRH (100 µg gonadorelin diacetate tetrahydrate) were given 36 h after CIDR removal. Cows in group C (n=4) and group D (n=4) were treated i.m. similarity with 8 decreasing injections (twice/day) of FSH/LH (750 iu). Cows in group E (n=5) and F(n=5) were treated i.m. on the ninth day of estrous with one of two different amounts of PMSG (2000 vs. 4000 i.u.), respectively. Prostaglandin $F_2\alpha$ was given 12 h before CIDR removal in the first four groups and 2 days after PMSG injection. Cows were inseminated at 12 and 24 h after onest of estrous in groups A, B, D, E and F, while group C was inseminated at 0 and 12 h after onest of estrous. Embryos were collected using a three-way catheter. Embryos and ova were searched and examined under stereomicroscope for assessment embryo quality.

In **the third experiment** 48 embryos at morula (n=20) or blastocyst (n=28) stage were cryopreserved by vitrification method, using final solution containing holding medium (90%PBS + 10% FCS) supplemented with of 16.5% ethylene glycol, 16.5% dimethyl sulphoxide, and 0.5 mol/L sucrose. 1-3 embryos were loaded in straws and submerged into liquid nitrogen for 4 months. Thawing of vitrified embryos was performed by expelling the embryos at the the holding medium containing 0.25 mol/L sucrose for 1 min and then into holding medium containing 0.15 mol/L sucrose for 5 min and then into sucrose-free holding medium for another 5 min. The embryos were placed at 39 ºC in an atmosphere of 5% CO2 in humid air for 4-5 h. then the embryos were assessed on morphological quality grades.

In **the fourth experiment** thirteen embryos from morula and blastocyst were used in order to determine sex of embryos using Polymerase Chain Reaction (PCR). Biopsies (1-2 cells) embryos were taken by using micromanipulation system under inverted microscope. DNA amplification was conducted using Multiplex PCR, and 16 primers were tested to determine possibility of success sexing embryos.

Results in the first part of the **experiment** 1 indicated that time and type of treatment had a significant effect ($p < 0.05$) on follicular dynamics of small (<5 mm) and large follicles (≥ 9 mm). Ovulation rate of cows after GnRH treatment was 100%, 25%, 100% and 40% in groups 1, 2, 3 and 4, respectively.

All treated Shami cows were complied to estrous synchronization protocols showed estrous after 49.54±1.15 h of PGF2α injection, and ovulation after 72.46±1.05 h of PGF2α injection. However, type of treatment didn't affect significantly the time of estrous and diameter of the dominant follicle at estrous, while dominant follicle size at ovulation was the largest ($P<0.01$) in group 4(15.70±0.38) and the smallest in group 2 (14.36±0.30), time of ovulation was also delayed ($P< 0.05$) after PGF2α injection in group 4 (76.85±2.21 h) in comparison to group 1 (68.96±1.77).

Results in the second part showed a change in follicular wave dynamic after GnRH injection. Ovulation occurred in 5/5 and 4/5 of cows treated with GnRH and hCG on day 5, respectively, and the diameter of original and secondary CLs weren't affected between groups.

In **experiment** 2 there were significant differences between groups in ovulation rate (A: $70.58±3.59^{b}$, B: $80.34±1.54^{b}$, C: $72.90±2.77^{b}$, D: $81.40±4.30^{b}$, E: $43.54±13.85^{a}$, and F: $61.20±13.94±13.94^{ba}$; $^{a–c}P < 0.05$), in fertilization rate (A: $85.10±5.35^{b}$, B: $82.32±3.31^{b}$, C: $64.70±3.97^{a}$, D: $82.14±3.57^{b}$, E: $65.42±3.56^{a}$, F: $86.67±8.16^{b}$; $^{a–c}P < 0.05$) and in number of transferable embryos (A: $5.50±0.29^{d}$, B: $6.00±0.41^{d}$, C: $3.50±0.29^{c}$, D: $5.67±0.67^{d}$, E: $1.50±0.29^{a}$, F: $2.50±0.29^{b}$; $^{a–c}P < 0.01$) and results were favorable of FSH than PMSG treatements.

Three Shami cows were pregnant by using embryo transfer technique, two of them calved, and one was dead at 7 months of pregnancy. Consequently, it is possible to apply embryo transfer succesfully in this breed according to the used protocol.

No significant difference was found between viable of embryos vitrified at the morula (grade 1: 66.7%, vs. grade 2: 50.0%) or at the blastocyst (grade 1: 73.3%, vs. grade 2: 53.8%).

Four primers (P1sex, P2sex, P1Aut, P2Aut) out of 16 primers were determined to help successfully in sexing embryos, showing that 141bp band distinguishing male embryos.

It was concluded that an injection of GnRH or hCG on day 5 of the estrous cycle could promote the emergence of a new follicular wave in Shami cows, and causes ovulation after 24-48 hours if there is a dominant follicle. Shami cows response like the other breeds to superovulation regimen with a half recommended dose of FSH but not with PMSG alone in embryo production program and the optimal artificial insemination time is preferable at 12 and 24 h after onset of estrus. Embryos could be forezen by vitrification method with little negative effect on viability of embryos. Successfully using specific primers for sexing of Shami cattle embryos can be determined.

It was suggested that further study researches about vitrification of Shami cows embryos and selected female embryos can be used as a tool for increasing population and respreading Shami cattle.

Key words: Estrous synchronization, Embryo production, Vitrification, Sexing embryos, Shami cattle.

1. مقدمة عامة:

تمتلك معظم الأبقار الشامية مواصفات شكلية عامة على درجة لا بأس بها من التماثل تؤهلها لتكتسب مواصفات العرق. وتشير الدراسات الحقلية بأنها تتصف بخواص تناسلية جيدة تماثل أو تضاهي العروق الأجنبية, فهي قلما تصاب بالمشاكل التناسلية، كالتهابات الرحم أو خمول المبايض، كما أنها تتميز بسهولة الولادة, ويمكن أن تنجب مولوداً كل عام (العوا، 1965)، ورغم أنها حيوانات محلية وتملك قدرات وراثية كامنة عالية إلا أنه لم تُجرى دراسات تتعلق بالحفاظ عليها كإنتاج الأجنة ونقلها وتجميدها وتجنيسها، بينما نالت اهتماماً واسعاً عند العروق الأخرى، إذ يتطلب إنتاج الأجنة embryo production وإجراءات نقلها في الأبقار معرفة دقيقة في تطور الجريبات المبيضية في الحيوانات الحيّة إضافة إلى فهم واسع في الأحداث الهرمونية التي ترافق دورة الشبق ووظائف المبيض (Gordon، 2003). وتعد تقانة نقل الأجنة embryo transfer وسيلة قيّمة لحفظ الأنواع والسلالات المهددة بالانقراض (Solti وزملاؤه، 2000). ويعتمد إنتاج الأجنة في الأبقار الحيّة على إحداث إباضة متعددة (فائقة) superovulation في الإناث المانحة عن طريق حقنها بمنشطات المناسل وخاصة هرموني FSH وLH لزيادة حجم الجريبات الكبيرة ولتحرير البويضات منها، ثم تلقيحها صناعياً بسائل منوي من ذكر مختبر ذو مواصفات وراثية عالية تتوافق مع رغبة المربي، ومن ثم جمع الأجنة بعد أسبوع من تاريخ التلقيح، وزرعها في حيوانات مستقبلة (Quaresma وزملاؤه، 2003)، ما يساعد في تحسين الكفاءة التناسلية للقطعان عن طريق تسريع نشر العوامل الوراثية للقطعان المحسنة وزيادة أعداد الحيوانات النادرة (Bülbül وزملاؤه، 2010). وأصبحت المعاملات الهرمونية للحيوانات المانحة (توقيت الشبق والإباضة المتعددة) من أهم الأبحاث المنفذة في هذا الاتجاه، لأن الإباضة المتعددة هي الخطوة الأولى في الحصول على عدد أكبر من مواليد الأمَّات المتفوقة وراثياً وتعد عاملاً رئيساً في نجاح تطبيق تقانة نقل الأجنة (Mikkola وزملاؤه، 2005).

إن التطور الكبير في علم الإخصاب مكّن الباحثين من الحصول على عدد كبير من أجنة الحيوانات الزراعية، ونظراً لعدم توفر العدد الكافي من الحيوانات المستقبلة التي تنقل إليها الأجنة مباشرة فقد استخدم السائل الآزوتي لتخزين الأجنة لفترات طويلة لحين تأمين الحيوانات المستقبلة (Leibo وLoskutoff، 1993)، ولحفظ هذه الأجنة كموارد وراثية للحيوانات المتميزة، والمهددة بالانقراض (Kuwayama، 2005). وبيّنت نتائج أبحاث Havlicek وزملاؤه (2005) إلى ضرورة إضافة بعض الصادات الحيوية لأوساط التجميد منعاً لنمو البكتيريا، وكذلك إضافة موانع التجميد لمنع تشكّل بلورات ثلجية ضمن خلايا الجنين، مع ضرورة الانتباه إلى إجراء الإذابة وفق خطوات متعاقبة لتجنب حدوث تغير في الضغط الحلولي الداخلي والخارجي للخلايا (Kaidi وزملاؤه، 2001).

يُعد تحديد الجنس في الحيوانات الزراعية من الأمور المرغوبة في برامج التربية. فعند إنتاج اللحم فإنه من المرغوب زيادة أعداد الذكور التي تنمو بسرعة وتملك كفاءة عالية في التحويل الغذائي، وجودة في مواصفات اللحم الذوقية (Dw وزملاؤه، 2001). وعندما يكون الهدف هو زيادة إنتاج الحليب وأعداد القطيع يفضّل الحصول على مواليد إناث (Phua وزملاؤه، 2003). ومن الطرق المستخدمة في تحديد الجنس الكشف عن وجود الصبغي Y الموجود فقط في الجنين الذكر باستخدام تقانة تفاعل البوليميريز المتسلسل PCR (Polymerase Chain Reaction) (Lopatarova وزملاؤه، 2007).

مما سبق فإن الدراسات السابقة تعدّ مهمة للحفاظ على النوع الحيواني وإكثاره وتحسينه وراثياً. وإذا علمنا أن أعداد الأبقار الشامية في سورية تتناقص بشكل يدعو للقلق من احتمال انقراضها (المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية، 2010)، فنجد أنفسنا بحاجة ماسة للحفاظ على هذا العرق، وإيجاد الوسائل الكفيلة بإكثاره وزيادة أعداده، وخصوصاً الحيوانات المتفوقة وراثياً، خاصة وأن الأبقار الشامية تعد من الحيوانات المحلية المتأقلمة مع ظروفنا البيئية. ولهذا يتطلب تطبيق تقانة إنتاج الأجنة ونقلها برامج مدروسة بحثياً ذات صلة بالموضوع.

أهداف الدراسة:

1- رصد ديناميكية الجريبات المبيضية للأبقار الشامية المعاملة هرمونياً أثناء نمو الجريب المبيضي السائد أو خلال تراجعه في دورة الشبق.

2- تحديد برنامج المعاملة الهرمونية الأمثل لتوقيت الشبق وتحريض الإباضة، وتأثيره في عدد الأجنة وحيويتها في الأبقار الشامية.

3- تحديد الموعد الأمثل للتلقيح الصناعي وتأثيره في عدد الأجنة وحيويتها.

4- جمع الأجنة ونقلها وتجنيسها في الأبقار الشامية.

5- تجميد الأجنة وتحديد نسبة بقاء الحيّة والصالحة منها للنقل بعد الإذابة مباشرة.

2. المواد والطرائق:

نفذت الدراسة خلال الفترة 2009-2012 في محطة بحوث دير الحجر للأبقار الشامية، في محافظة ريف دمشق، ناحية الغزلانية، وهي إحدى المحطات التابعة لإدارة بحوث الثروة الحيوانية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، وجرى البحث عن الأجنة وتقييمها في مخبر نقل الأجنة بإدارة بحوث الثروة الحيوانية، بينما جنست الأجنة بمخبر كلية الهندسة التقنية بجامعة حلب.

2-1. حيوانات التجارب:

استخدم لهذه الدراسة 45 بقرة شامية بمواسم انتاجية مختلفة (1-5) وبعمر راوح بين 30 و92 شهراً، وضعت الأبقار في حظيرة ذات إيواء نصف مفتوح مزودة بمزنق خاص يتيح تجميع الحيوانات وفحصها باستخدام جهاز راسم الصدى (Echo)، وأخضعت الحيوانات إلى نظام تغذية جماعية، إذ قدمت العليقة على دفعتين صباحية ومسائية وتكونت من تبن القمح، ودريس الشعير، وشعير مجروش، ونخالة قمح، وكسبة قطن مقشورة، وذرة صفراء مجروشة وفق الاحتياجات العلفية التي تتناسب وأعمار الحيوانات وأوزانها، قدمت العلائق العلفية حسب الخطة المتبعة في المحطة، أما بالنسبة للماء فكان متوفراً بشكل

دائم أمام الحيوانات في مناهل الحظيرة. أعطيت الحيوانات التحصينات المعتمدة في خطة المحطة والمعالجات الفردية في حينها.

2-2. فحص المبايض:

أُجري الفحص اليومي للمبايض باستخدام جهاز راسم الصدى (Echo) من شركة Honda Electronics اليابانية طراز HS-2000 V مزود بشاشة فيديو مدمجة قياس 9 إنش 256 سوية رمادية، الذي يعمل بالطريقة الخطية B-Mode Linear Real Time، وكمشعر للجهاز استخدم الناقل الشرجي الخطي عبر المستقيم موديل HLS-475VWF بتردد قدره 7.5 ميغاهرتز وكبل طوله 3 أمتار لتتبع ديناميكية نمو الجريبات المبيضية والجسم الأصفر، وقيست أقطار التراكيب الجريبية الموجودة على كل مبيض، وخزنت الصور داخل الجهاز ثم نُقلت بواسطة وصلة خاصة من جهاز راسم الصدى إلى جهاز الكمبيوتر لتوثيقها، وعند إجراء الفحص بالأمواج فوق الصوتية استخدم جل خاص كوسط ناقل بين رأس الجهاز ومخاطية المستقيم.

فُحص كل مبيض يومياً على حدة، ومسح سطحه عدة مرات لمتابعة نمو الجريبات وتراجعها ونمو الجسم الأصفر، ورصدت أقطار الجريبات ≤ 2 مم، طوال فترة الدراسة. ونظراً لوجود جريبات مبيضية بأحجام مختلفة، قسمت الجريبات من حيث حجمها إلى جريبات صغيرة الحجم (2-5 مم)، ومتوسطة الحجم (>5-<9 مم)، وكبيرة الحجم (≤ 9 مم) وفقاً لـ Alvarez وزملاؤه (2000)، وحددت الموجة الجريبية المبيضية بأنها الفترة الممتدة من ظهور الجريب السائد حتى غيابه (Viana وزملاؤه، 2000)، حيث اعتبر يوم بدء الموجة هو اليوم الذي ظهر فيه الجريب السائد وكان قطره يتراوح بين 4-5 مم (Gaur و Purohit، 2007)، وقيس قطر الجسم الأصفر أثناء دورة الشبق باستخدام راسم الصدى، وحددت الإباضة من خلال اختفاء الجريب السائد وتشكل الجسم الأصفر في الموضع نفسه من المبيض (Alvarez وزملاؤه، 2000).

3. الفصل الأول:

توقيت الشبق والإباضة في الأبقار الشامية

3-1. مقدمة:

تحدث ديناميكية تطور الجريبات المبيضية في الأبقار على شكل موجات خلال دورة الشبق، إذ تنمو مجموعة منها يزداد قطرها تدريجياً (مرحلة تجنيد الجريبات، Recruitment)، ثم يستمر القليل منها بالنمو، وتتراجع الأخرى (مرحلة الانتخاب)، وعادة يستمر جريب واحد بالنمو، ويدخل مرحلة السيادة، ثم يزداد قطره إلى أن يتراجع، أو ينفجر بعد اكتمال تدهور الجسم الأصفر السابق إن وجد (Kanitz، 2003)أن ديناميكية تطور الأمواج المبيضية تحدث من خلال نمو مجموعة جريبات صغيرة ، وعُبِّر عن هذا التغير في ديناميكية نمو الجريبات على سطح المبيض بالموجة الجريبية المبيضية (Gaur وPurohit، 2007). تظهر الدورات التناسلية في عروق الأبقار المختلفة على شكل دورات ثنائية، أو ثلاثية الموجة (Gaur وPurohit، 2007)، أو رباعية، أو خماسية الموجة (Viana وزملاؤه، 2000)، ووجد أن بكاكير الأبقار الشامية البالغة تظهر من 1-5 موجات جريبية مبيضية تختلف نسبها باختلاف طول الدورة التناسلية (الدكاك، 2008). بيّن Ginther وزملاؤه (2002) أن مستوى هرمون FSH يزداد عند بداية تطور الموجة الجريبية، ويعتمد مستوى هرمون LH على مستوى FSH الذي يُحدد من خلال بداية تشكل الموجة الجريبية، ومن خلال نمو الجريب السائد أو تراجعه (Austin وزملاؤه، 2002). استخدمت طرائق عدة للتحكم في بدء ظهور الموجة الجريبية عند الأبقار، كتفجير الجريب المبيضي الذي قطره يساوي 5 مم أو أكبر يدوياً (Kohram وزملاؤه، 1998)، أو باستخدام إبرة عبر المهبل موصولة بجهاز الأمواج فوق الصوتية يزيد من الاستجابة للإباضة المتعددة (Kim وزملاؤه، 2001) أو من خلال حقن البروجسترون، أو الإستراديول، أوLH، أوhCG (Bo وزملاؤه، 1995a، b) أو إعطاء GnRH في مراحل مختلفة من نمو الجريب السائد خلال دورة الشبق (Pursley وزملاؤه، 1995).

يُعرَّف توقيت الشبق بأنه التحكم بدورة الشبق للحصول على أكبر عدد من الإناث بحالة شبق ضمن وقت قصير ومحدد في القطيع، ويعتمد توقيت الشبق في الأبقار على التحكم الفعال في حياة الجسم

الأصفر وفي موجة الجريبات المبيضية، وتعد مركبات البروستاغلاندين F2α، والبروجستوجينات، وهرمون GnRH من أهم الهرمونات التي تستخدم لهذا الغرض (Ball وPeters، 2004).

أورد Lamb وزملاؤه (2010) **برتوكولات لتوقيت الشبق في أبقار اللحم** تضمنت **بروتوكول** الحقنة بجرعتين من البروستاغلاندينF2α بفاصل 11–14 يوماً، **والبروتوكول** MGA-PGF2α وهو إضافة مادة MGA: melengestrol acetate إلى علائق الأبقار بمعدل 0.5 مغ للرأس/يوم ولمدة 14 يوماً يتبعها إعطاء البروستاغلاندينF2α في اليوم 14، **والبروتوكول** Synch وهو حقن هرمون GnRH في اليوم 0 (يوم غير معلوم من الدورة) متبوعاً بحقن البروستاغلاندينF2α في اليوم 7، **والبروتوكول** CIDR-PGF2α: وهو إيداع اللولب CIDR في مهبل البقرة لمدة 7 أيام وحقن البروستاغلاندينF2α عند نزع اللولب، **والبروتوكول** CIDR+Synch: وهو إيداع اللولب لمدة 7 أيام في مهبل البقرة مع إعطاء هرمون GnRH في اليوم 0، والبروستاغلاندين F2α في اليوم 7، **والبروتوكول** Synch 7–11 : إعطاء مادة MGA مع العلف لمدة 7 أيام، وإعطاء البروستاغلاندين F2α في اليوم 7، وGnRH في اليوم 11، والبروستاغلاندينF2α في اليوم 18. وفي حال استخدام التلقيح الصناعي بعد توقيت الشبق عادة ما يعطى GnRH بعد 48 ساعة من الجرعة الأخيرة من البروستاغلاندينF2α لتوقيت الإباضة في الجريب السائد.

يستخدم البروستاغلاندين F2α لتوقيت الشبق في الأبقار التي تستجيب من حقنه في حال وجود جسم أصفر وظيفي (Lamb وزملاؤه، 2010)، فعندما يحقن مرة واحدة بأوقات عشوائية من دورة الشبق يحدث الشبق في نحو ثلثي أفراد القطيع (Islam، 2011)، وفي حال حقنه مرتين بفاصل 11 يوماً يحدث الشبق بنسبة 80– 100%(Sahatpure و Patil، 2008).

أشار Islam (2011) أن توقيت الشبق باستخدام البروجستوجينات يحافظ على مستويات عالية من البروجسترون في الجهاز التناسلي الأنثوي حتى ولو استخدم أثناء تراجع الجسم الأصفر، ويستخدم

البروجسترون ذو المنشأ الخارجي إما على شكل مزدرعات في قاعدة الأذن (Ayres وزملاؤه، 2006)، أو على شكل بودرة تضاف للعلف (MGA: melengestrol acetate) (Hyland وزملاؤه، 2009)، أو على شكل لوالب مهبلية من نوع CIDR أو من نوع PRID (Intravaginal Device Progesterone-Releasing) (Islam، 2011)، وعادة مايحقن البروستاغلاندينF2α عند نزع البروجسترون بهدف هدم الجسم الأصفر وحدوث الإباضة (Lamb وزملاؤه، 2006). ومن الممكن إضافة بعض الهرمونات إلى البروجسترون كالإستراديول وGnRH لتحسين استجابة الأبقار من توقيت الشبق وإحداث الحمل لاحقاً (Xu وزملاؤه، 2000).

استخدم Ayres وزملاؤه (2006) هرمون الإستراديول مع غرس مزدرعات البروجسترون في أذن أبقار النيلور لتحضيرها كمستقبلات للأجنة. بينما استخدم Colazo وزملاؤه (2003) طريقة اللوالب المهبلية(CIDR) التي تحوي البروجسترون مع إعطاء هرمون الإستراديول عند إيداع اللولب وعند نزعه لإحداث الإباضة في عجلات اللحم، إذ يعمل الهرمونان السابقان على تثبيط تحرر كلٍ من هرموني FSH وLH، وعلى تراجع الجريب السائد، وهذا يؤدي إلى ظهور موجة جريبية مبيضية جديدة تحوي العديد من الجريبات المبيضية النامية التي تكون أكثر استجابة لمنشطات المناسل (Bülbül وزملاؤه، 2010). كما استخدم Ferreira وزملاؤه (2006) عدة برامج لتوقيت الشبق في أبقار خليطة مستخدماً التأثير التضامني للمواد البروجسترونية مع البروستاغلاندينات مع إعطاء هرمون مصل الفرس الحامل (PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropin) بأوقات مختلفة من تاريخ بدء برنامج توقيت الإباضة.

استخدم نظام GnRH−PGF2α+GnRH بصورة فعالة في توقيت الشبق في أبقار اللحم (Atkins وزملاؤه، a2010)، إذ تساعد الجرعة الأولى من هرمون GnRH في حدوث إباضة الجريب المبيضي السائد أو لوتنته، في حين تفيد الجرعة الثانية في توقيت الإباضة (Gordon، 2003).

أشار الدكاك (2008) إلى أن الجريب المبيضي السائد في بكاكير الأبقار الشامية ينمو عادة في الموجة المبيضية الأولى حتى اليوم 6–7 بعد الشبق بغض النظر عن عدد الموجات في الدورة الواحدة، ويحافظ الجريب السائد على قطره حتى اليوم 8–10 ثم يتراجع تدريجياً مالم ينفجر.

إن حقن GnRH في بداية الموجة المبيضية يسبب الإباضة خلال 24–48 ساعة من الحقن متبوعة بظهور موجة مبيضية لاحقاً (Martinez وزملاؤه، 2000)، وفي حال حقن هرمون GnRH أثناء تركيب اللولب CIDR يتشكل جسم أصفر مساعد يزيد من تركيز هرمون البروجسترون في الدم (Xu وزملاؤه، 2000). ويثبط البروجسترون ذو المنشأ الخارجي إفراز هرمونLH ويمنع من حدوث شبق مبكر أو إباضة قبل أوانها (Macmillan وBurke، 1996)، وبعد نزع اللولب تتحرر كمية كبيرة من هرمون الإستراديول–17β وهرمون LH تؤدي إلى حدوث إباضة (Ando وزملاؤه، 2005).

بناء على المعطيات السابقة افتُرض أن إعطاء GnRH في مرحلة نمو الجريب المبيضي السائد في الموجة الأولى (اليوم 5 من الدورة) يمكن أن يسبب الإباضة، وبالتالي بداية ظهور الموجة المبيضية.

ونظراً لعدم وجود دراسات سابقة عن توقيت الشبق وتأثيره في ديناميكية الجريبات المبيضية في الأبقار الشامية هدف هذا الجزء من الدراسة إلى:

1– مقارنة فعالية البروتوكول PGF2α+GnRH مع CIDR أو من دونه في ديناميكية تطور الجريبات المبيضية، وفي توقيت الشبق أثناء نمو الجريب المبيضي السائد أو خلال تراجعه في الموجة الجريبية المبيضية الأولى من دورة الشبق في الأبقار الشامية.

2- تأثير إعطاء GnRH أو hCG في اليوم الخامس من دورة الشبق في إمكانية حدوث الإباضة خلال موجة الجريبات المبيضية الأولى وفي ديناميكية تطور الجريبات المبيضية في الأبقار الشامية.

3-2. المواد والطرائق:

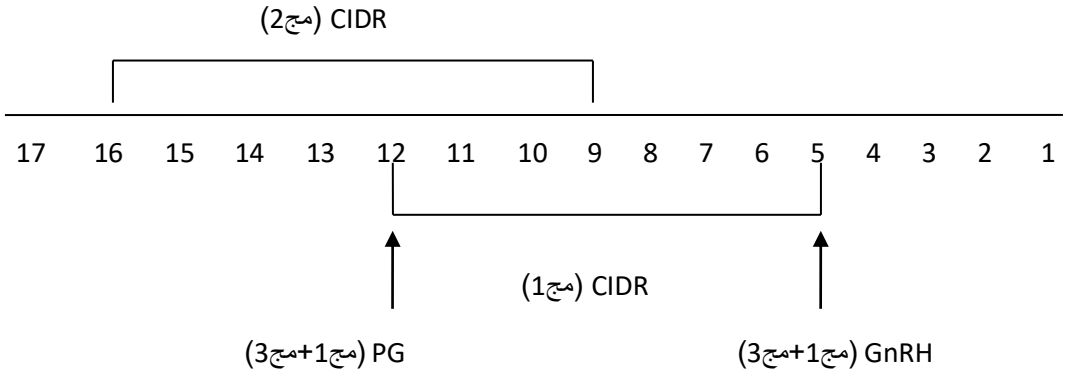
3-2-1. الجزء الأول:

استخدمت 26 بقرة شامية في مواسم إنتاجية مختلفة (1-5) راوح أعمارها بين 32 و92 شهراً، لدراسة توقيت الشبق، وُزعت الحيوانات عشوائياً على أربع مجموعات متوسط عمرها 58.99±4.24 شهراً، ومتوسط رقم موسمها الإنتاجي 2.70±0.30، وبعد ملاحظة الشبق عينياً، والتأكد من حدوث الإباضة بواسطة الفحص اليومي لمبايض الأبقار باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية، استُخدمت المعاملات التالية (المخطط 1):

أعطي هرمون GnRH لكافة الحيوانات بمعدل 2 مل من المستحضر التجاري Cystorelin الذي يعادل 50 ميكروغرام gonadorelin diacetate tetrahydrate (شركة CEVA الفرنسية) في اليوم 5 (المجموعتين1 و3) أو9 (المجموعتين 2 و4) من دورة الشبق، وأودعت اللوالب CIDR الحاوية على 1.38غ بروجسترون (شركة Pfizer ltd hamilton النيوزلندية) في مهابل أبقار المجموعتين 1، و2 أثناء حقن GnRH لمدة 7 أيام اعتباراً من اليوم 5 حتى اليوم 12 (المجموعة 1: ن=8)، ومن اليوم 9 حتى اليوم 16 (المجموعة 2: ن=8) من دورة الشبق، على التوالي. بينما حقن هرمون GnRH في اليوم 5 (المجموعة 3: ن=5)، أو اليوم9 (المجموعة 4: ن=5) من دورة الشبق من دون إيداع لوالب في مهابلها، وحُقن البروستاغلاندينF2α عضلياً بعد 7 أيام من حقن GnRH بجرعة قدرها 2 مل من مستحضر alfaglandine (شركة alfasan الهولندية) الذي يعادل 500 ميكروغرام cloprostenol كلوبروستينول للأبقار في المجموعات كافة.

(مج2 +مج4) GnRH

(مج2+مج4) PG



المخطط 1. برنامج GnRH+PG$F_2\alpha$ مع CIDR أو من دونه، المستخدم في توقيت الشبق للأبقار الشامية خلال نمو الجريب السائد أو تراجعه في الموجة الجريبية الأولى من دورة الشبق.

3-2-2. الجزء الثاني: استخدم فيها GnRH أو hCG لإحداث الإباضة وتوقيتها في 15 بقرة شامية ذات مواسم إنتاجية مختلفة (1-5) راوحت أعمارها بين 30 و86 شهراً. وُزعت الحيوانات عشوائياً على ثلاث مجموعات ضمت كل منها 5 أبقار متوسط رقم موسمها الإنتاجي 2.67±0.21، ومتوسط عمرها 55.77±5.94 شهراً. وبعد ملاحظة الشبق عينياً، والإباضة بواسطة الفحص اليومي لمبايض الأبقار باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية، تركت مجموعة الشاهد بلا معاملة (المجموعة 1)، وحقنت أبقار المجموعتين 2 و3 عضلياً في اليوم الخامس من دورة الشبق إما بـGnRH (8 ميكروغرام بوسيرلين) (المجموعة 2)، أو بـ3000 وحدة دولية من هرمون hCG (المجموعة3). (شركة intervet – المانيا، وهولندا)، على التوالي.

3-3. التحليل الإحصائي:

درس تأثير كل من نوع المعاملة الهرمونية، ويوم التجربة في المؤشرات التالية: عدد الجريبات، وقطر الجريب السائد، ووقت الإباضة، ومعدل النمو اليومي للجريبات، وقطر الجسم الأصفر، وعدد الجريبات المبيضية (≤8 مم)، وعدد الأجسام الصفراء.

أخضعت البيانات للتحليل الإحصائي وفقاً للنموذج الخطي العام General Linear Model، حسب توصيف الموديلات الإحصائية التالية:

الموديل الأول: القياسات المتكررة repeated measures، تحليل التغاير covariance (التباين المشترك) لدراسة العدد اليومي للجريبات المبيضية بأحجامها المتعددة، كما يلي:

$$X_{in} = \mu + \alpha_i + \rho_{t(i)} + \beta(A_{in} - \bar{A}) + \varepsilon_{itn}$$

الموديل الثاني: تحليل التغاير، لدراسة قطر الجريب السائد، ووقت الإباضة، ومعدل النمو اليومي للجريبات، وقطر الجسم الأصفر، وموعدي الشبق والإباضة، كما يلي:

$$X_{in} = \mu + \alpha_i + \beta(A_{in} - \bar{A}) + \varepsilon_{in}$$

حيث إن:

X_{in}: الصفة المدروسة (عدد الجريبات، قطر الجريب السائد، وقت الإباضة، معدل النمو اليومي للجريبات، قطر الجسم الأصفر، عدد الجريبات المبيضية (≤8 مم)، عدد الأجسام الصفراء).

μ: المتوسط العام لصفة المدروسة.

α_i: تأثير نوع المعاملة، i(الشاهد، GnRH، hCG، البروتوكول1، و2، و3، و4).

$\rho_{t(i)}$: تأثير يوم التجربة، t : يوم التجربة (1، 2، 3، ...،9 يوم).

β : معامل انحدار الصفة المدروسة على عمر الحيوان (شهر).

$(A_{in} - \bar{A})$: انحراف عمر الحيوان عن المتوسط العام للعمر.

ε_{tin}: المتبقي (الخطأ العشوائي).

قُدرت المتوسطات بطريقة المربعات الصغرى Least Squares Means مع الانحرافات القياسية (SE)، واستخدمت طريقة Bonferroni لمقارنة المتوسطات، باستخدام حزمة البرامج الإحصائية SAS (version 9) لإجراء عمليات التحليل الإحصائي كافة.

3-4. النتائج:

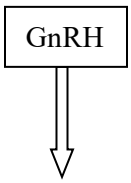
3-4-1. الجزء الأول:

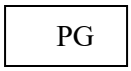
أظهرت نتائج التحليل (الجدول 3–1) وجود تأثير معنوي ($p < 0.01$) لبروتوكول المعاملة الهرمونية في متوسط العدد اليومي للجريبات الصغيرة والكبيرة، كما وجد تأثير معنوي ($p < 0.05$) لتفاعل يوم التجربة مع بروتوكول المعاملة الهرمونية في العدد اليومي للجريبات المبيضية الصغيرة، وبمقدار ($p < 0.01$) بالنسبة للجريبات الكبيرة، ويوضح الجدول أيضاً وجود تأثير معنوي ($p < 0.01$) ليوم التجربة وللتفاعل بين بروتوكول المعاملة الهرمونية ويوم التجربة في عدد الجريبات الكبيرة، بينما لم تؤثر نوع المعاملة أو عمر البقرة في العدد اليومي للجريبات المبيضية المتوسطة.

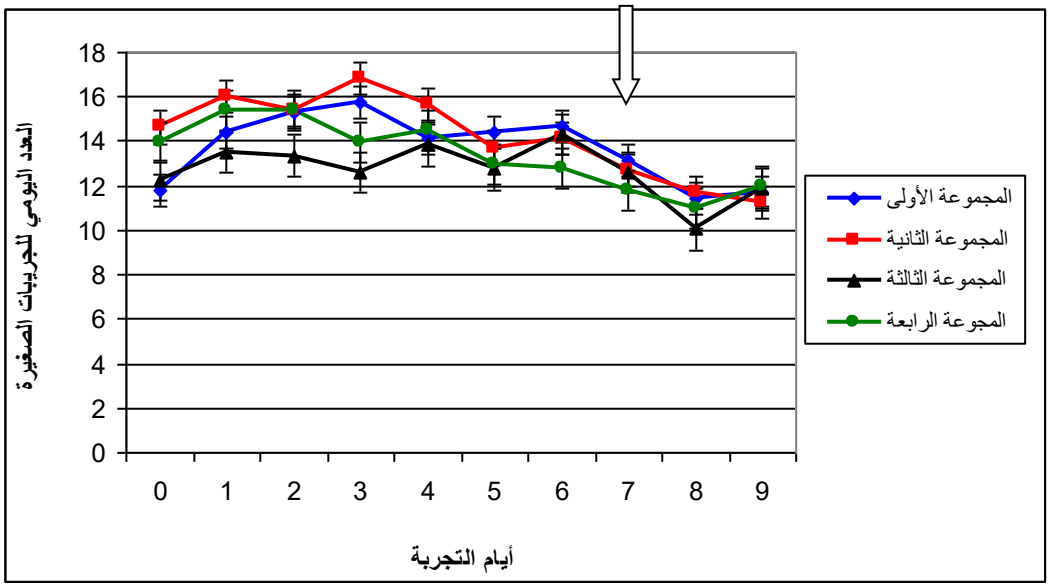
الجدول 3–1 تحليل التغاير لتأثير العوامل المدروسة في ديناميكية الجريبات المبيضية في الأبقار الشامية.

مصدر التباين	درجة الحرية	متوسط المربعات		
		الجريبات الصغيرة	الجريبات المتوسطة	الجريبات الكبيرة
بروتوكول المعاملة الهرمونية	3	22.77**	$0.27^{n.s}$	14.69**
عمر الحيوان (شهر)	1	$1.18^{n.s}$	$0.001^{n.s}$	$0.0001^{n.s}$
الخطأ التجريبي الأول	21	4.26	0.19	0.25
أيام التجربة	9	$3.98^{n.s}$	$0.91^{n.s}$	0.52**
أيام التجربة × البروتوكول	27	8.21*	$0.29^{n.s}$	0.51**
أيام التجربة × العمر	9	$2.41^{n.s}$	$0.90^{n.s}$	$0.20^{n.s}$
الخطأ التجريبي الثاني	189	4.85	0.93	0.11

** $p < 0.01$، * $p < 0.05$





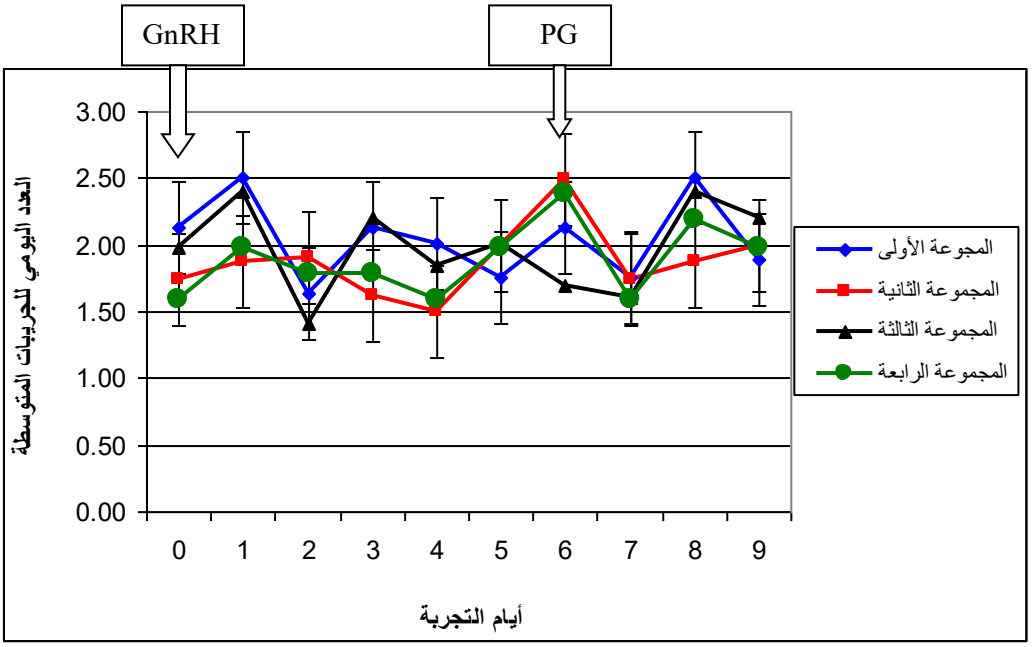


الشكل 3–1. متوسط أدنى المربعات لعدد الجريبات المبيضية الصغيرة ± الخطأ القياسي في الأبقار الشامية وفق بروتوكول المعاملة الهرمونية خلال فترة التجربة ﴿حقن هرمون GnRH في اليوم 5 (المجموعتين 1، و3)، أو اليوم9 (المجموعتين 2، و4) من دورة الشبق، وأودعت اللوالب CIDR في مهابل أبقار المجموعتين 1، و2 أثناء حقن GnRH لمدة 7 أيام، وحُقن البروستاغلاندين$F2\alpha$ بعد 7 أيام من حقن GnRH في المجموعات كافة﴾.

أشارت نتائج التحليل الإحصائي (الشكل 3–1) أن عدد الجريبات الصغيرة (2–5 مم) كان في اليوم 5 بعد الإباضة 0.73±11.77، و0.92±12.22 جريب في المجموعتين 1، و3، على التوالي، وهو أقل ($p<0.05$) مما هو عليه في اليوم 9 بعد الإباضة في المجموعتين 2 و4 فكان نحو 0.73±14.63، و0.92±13.97، على التوالي، وبدأت تظهر نزعة في زيادة عدد الجريبات الصغيرة بعد يوم واحد من الحقن وكانت معنوية ($p < 0.05$) في كل المجموعات، عدا المجموعة الثالثة (1: 0.73±4.40، 2: 0.73±16.05، 3: 0.92±13.52، 4: 0.92±15.37)، وبشكل عام بقي الاتجاه في أن العدد اليومي كان أكبر خلال الأيام 1–4 من اليوم 0 (يوم حقن GnRH)، ولوحظ نزعة في انخفاض العدد بعد يوم واحد من حقن $PGF2\alpha$ في كل المجموعات.

لم يلحظ تأثير معنوي بين المجموعات المدروسة (المعاملات) أو عمر البقرة أو يوم التجربة أو التفاعلات بينهما (الجدول 3–1) في عدد الجريبات المتوسطة (5–9 مم)، ورغم أن هذا العدد في اليوم 5 بعد

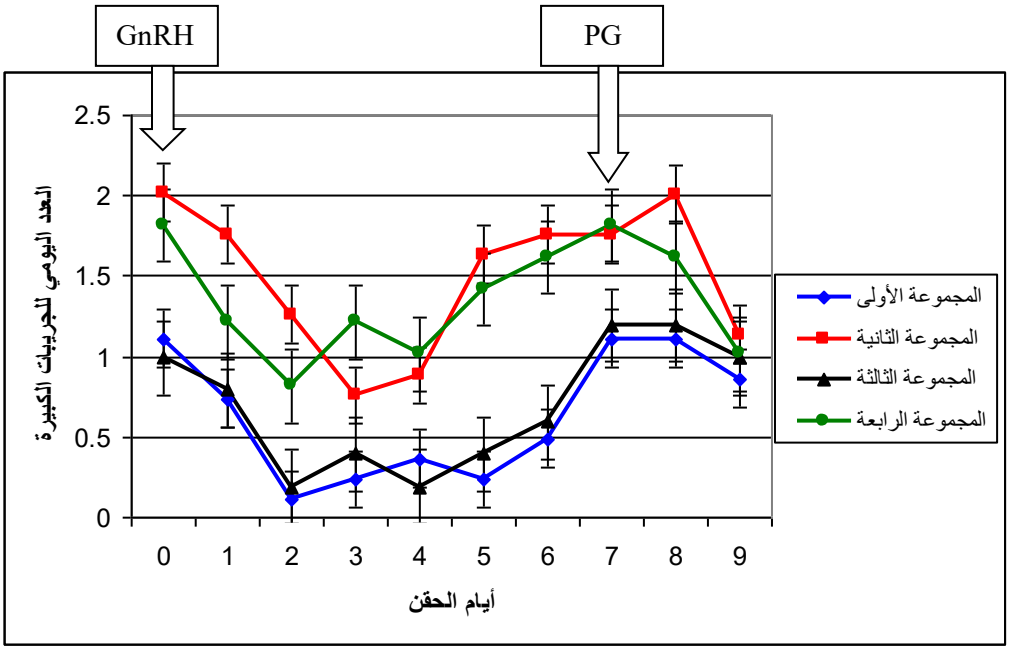
الإباضة (يوم حقن GnRH) في المجموعتين 1 و3 (1: 2.14±0.35، 3: 1.98±0.44) كان أعلى منه في المجموعتين 2 و4 (2: 1.74±0.35، 4: 1.59±0.44) إلا أن ذلك لم يكن معنوياً، وبقي هناك نزعة في كافة المجموعات إلى زيادة العدد بعد يوم واحد من حقن GnRH، ثم لوحظ تذبذباً غير معنوي بين الارتفاع والانخفاض في العدد اليومي حتى نهاية التجربة (الشكل 3-2).



الشكل 3-2. متوسط أدنى المربعات لعدد الجريبات المبيضية المتوسطة± الخطأ القياسي في الأبقار الشامية وفق بروتوكول المعاملة الهرمونية ﴿حقن هرمون GnRH في اليوم 5 (المجموعتين 1، و3)، أو اليوم9 (المجموعتين 2، و4) من دورة الشبق، وأودعت اللوالب CIDR في مهابل أبقار المجموعتين 1، و2 أثناء حقن GnRH لمدة 7 أيام، وحُقن البروستاغلاندين$F2\alpha$ بعد 7 أيام من حقن GnRH في المجموعات كافة﴾.

ومن جهة أخرى كان عدد الجريبات المبيضية الكبيرة (≤ 9 مم) أثناء حقن GnRH في المجموعتين 2 و4 (2: 2.20±0.18، 4: 1.82±0.23) أعلى منه ($p < 0.01$) في المجموعتين 1 و3 (1: 1.11±0.18، 3: 0.99±0.23). بدأ الانخفاض في العدد اليومي($p < 0.01$) بعد 1 يوم من حقن GnRH في كافة المجموعات، وبقي العدد منخفضاً حتى اليوم 4 في المجموعتين 2 و4، واليوم 6 في المجموعتين 1 و3، ثم ازداد العدد اليومي للمجموعات الأربع في اليومين 7 و8 ولوحظت نزعة في

تناقص العدد بعد يومين من حقن البروستاغلاندينF2α . ويلاحظ من(الشكل 3-3) أن العدد اليومي كان أعلى في المجموعتين 2 و4 من المجموعتين 1 و3.



الشكل 3-3. متوسط أدنى المربعات لعدد الجريبات المبيضية الكبيرة ± الخطأ القياسي في الأبقار الشامية وفق بروتوكول المعاملة الهرمونية ﴿حقن هرمون GnRH في اليوم 5 (المجموعتين 1، و3)، أو اليوم9 (المجموعتين 2، و4) من دورة الشبق، وأودعت اللوالب CIDR في مهابل أبقار المجموعتين 1، و2 أثناء حقن GnRH لمدة 7 أيام، وحُقن البروستاغلاندينF2α بعد 7 أيام من حقن GnRH في المجموعات كافة﴾.

أظهرت نتائج الدراسة (الجدول3-2) وجود تأثير معنوي ($p < 0.01$) لبروتوكول المعاملة الهرمونية في قطر الجريب المبيضي السائد، وفي معدل الإباضة وموعدها أثناء حقن GnRH، وفي موعد الإباضة وقطر الجريب السائد عند الإباضة ($p < 0.05$) بعد حقن PGF2α، ولم يكن هناك تأثير معنوي بعد حقن البروستاغلاندينF2α في موعد الشبق، وفي قطر الجريب السائد عند الشبق، كما يتضح من الجدول السابق عدم وجود تأثير معنوي لعمر البقرة في أي من المؤشرات المدروسة.

الجدول 3-2. تحليل التغاير لتأثير بروتوكول العوامل المدروسة في قطر الجريب السائد وفي موعدي الشبق والإباضة.

متوسط المربعات								
مصدر التباين	درجة الحرية	بعد حقن GnRH			بعد حقن PGF2α			
		قطر الجريب السائد	معدل الإباضة	موعد الإباضة	الشبق (ساعة بعد الحقن)	موعد الإباضة	قطر الجريب السائد	
							عند الشبق	عند الإباضة
مجموعة التجربة	3	17.33**	0.73**	262.72**	66.45	90.10*	1.17	2.14*
العمر (شهر)	1	3	0.03	4.01	0.36	5.52	0.06	0.2
الخطأ التجريبي	21	1.07	0.13	•78.27	31.3	26.31	0.72	0.69

** p<0.01، * p<0.05، •: درجة الحرية 15

الجدول 3-3. متوسط أدنى المربعات لمواصفات الجريب السائد±الخطأ القياسي، وموعد الشبق والإباضة للأبقار الشامية حسب بروتوكول المعاملة الهرمونية.

المجموعة	بعد حقنGnRH			
	قطر الجريب السائد عند الحقن (مم)**	معدل الإباضة **	موعد الإباضة (ساعة بعد الحقن)**	قطر الجسم الأصفر المساعد (مم)
1	0.37 ± 10.60^{a}	$8/8^{b}$ (%100)	3.02 ± 32.99^{a}	0.58 ± 17.16^{a}
2	0.37 ± 13.84^{b}	$8/2^{a}$ (%25)	3.84 ± 36.02^{a}	1.16 ± 18.50^{a}
3	0.47 ± 10.86^{a}	$5/5^{b}$ (%100)	3.80 ± 36.00^{a}	0.73 ± 17.08^{a}
4	0.47 ± 13.34^{b}	$5/2^{a}$ (%40)	6.01 ± 48.01^{b}	1.16 ± 18.65^{a}
	بعد حقنPGF2α			
المجموعة	قطر الجريب السائد عند الشبق(مم)	موعد الشبق (ساعة بعد الحقن)	قطر الجريب السائد عند الإباضة(مم)*	موعد الإباضة (ساعة بعد الحقن)*
1	0.31 ± 14.06^{a}	2.03 ± 46.05^{a}	0.30 ± 14.83^{ba}	1.77 ± 68.96^{a}
2	0.30 ± 13.95^{a}	2.00 ± 48.97^{a}	0.30 ± 14.36^{a}	1.77 ± 72.02^{ba}
3	0.38 ± 14.11^{a}	2.52 ± 52.83^{a}	0.38 ± 14.98^{ba}	2.21 ± 74.38^{ba}
4	0.39 ± 14.94^{a}	2.55 ± 52.74^{a}	0.38 ± 15.70^{b}	2.21 ± 76.85^{b}

تشير الأحرف المختلفة في العمود الواحد إلى وجود فرق معنوي **p<0.01، *p<0.05

راوح قطر الجريب السائد عند حقن هرمون GnRH بين 10.60±0.37، و13.84±0.37، وكان في المجموعتين 2 و4 (الحقن في اليوم 9) أعلى منه ($p < 0.01$) في كل من المجموعتين 1 و3 (الحقن في اليوم 5) (الجدول 3-3). وبلغ معدل الإباضة بعد حقن هرمون GnRH 100% بالنسبة للمجموعتين 1 و3، وكان أعلى ($p < 0.01$) منه في المجموعتين 2 (25%)، و4 (40%). وحدثت الإباضة بعد نحو 32.99±3.02، و36.02±3.84، و36.00±3.80 ساعة من حقن GnRH في المجموعات 1، و2، و3، على التوالي، وتأخرت ($p < 0.01$) إلى نحو 48.01±6.01 ساعة في المجموعة الرابعة. راوح متوسط قطر الجسم الأصفر المساعد المتشكل بعد 7 أيام من حقن GnRH بين 17.05±0.73مم و18.65±1.16مم في المجموعات الأربع، مع عدم ملاحظة تأثير معنوي بين المجموعات.

استجابت جميع الأبقار الشامية المعاملة لبروتوكولات توقيت الشبق المنفذة في هذه الدراسة، إذ حدث الشبق بعد مرور نحو 49.54±1.15 ساعة من حقن البروستاغلاندينF2α، وحدثت الإباضة بعد نحو 72.46±1.05 ساعة من حقن PGF2α (الجدول 3-3).

أشارت النتائج (الجدولين 3-2، و3-3) أن نوع المعاملة لم تؤثر في كل من **موعد ظهور الشبق** بعد حقن PGF2α الذي راوح بين 46.05±2.00، و52.83±2.55 ساعة، وفي **قطر الجريب السائد** عند الشبق الذي راوح بين 13.95±0.30 و 14.94±0.39 مم ، وبالمقابل كان قطر الجريب السائد عند الإباضة أعلى مايمكن ($p < 0.05$) في المجموعة 4 (15.70±0.38)، وأقل مايمكن في المجموعة 2 (14.36±0.30) كما تأخر موعد الإباضة ($p < 0.05$) بعد حقن هرمون PGF2α في المجموعة 4 إلى 76.85±2.21 ساعة مقارنة مع المجموعة 1 (68.96±1.77 ساعة) أما المجموعتين 2، و3 فلم يلحظ فرق معنوي بينهما.

3-4-2. الجزء الثاني:

أظهرت نتائج التحليل (الجدول 3-4) وجود تأثير معنوي ($p < 0.05$) لعمر البقرة في عدد الجريبات المتوسطة إلا أن قيمة معامل الانحدار كانت صغير جداً (0.007±0.004)، ووُجد أيضاً تأثير معنوي ($p < 0.05$) ليوم التجربة في عدد الجريبات الكبيرة، كما لوحظ تأثيراً معنوياً ($p < 0.01$) لتفاعل يوم التجربة مع المجموعة التجريبية في العدد اليومي للجريبات المبيضية الصغيرة، وبمقدار ($p < 0.05$) بالنسبة للجريبات المتوسطة، والكبيرة.

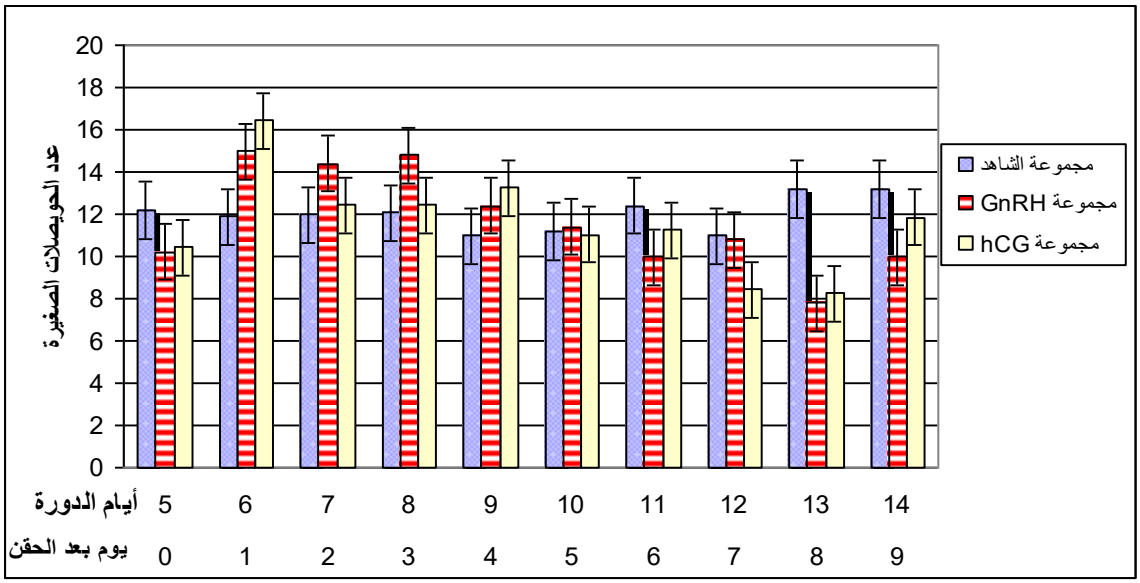
الجدول 3-4. تحليل التغاير لتأثير العوامل المدروسة في العدد اليومي للجريبات المبيضية.

العوامل المؤثرة	درجة الحرية	M.M.S متوسط مجموع مربع انحرافات		
		الجريبات الصغيرة	الجريبات المتوسطة	الجريبات الكبيرة
البروتوكول	2	$0.38^{n.s}$	$2.78^{n.s}$	$0.19^{n.s}$
عمر الحيوان (شهر)	1	$4.85^{n.s}$	$10.36^{*(A)}$	$0.70^{n.s}$
الخطأ التجريبي الأول	11	13.20	1.45	0.38
أيام التجربة	9	$10.12^{n.s}$	$0.39^{n.s}$	0.32*
أيام التجربة × البروتوكول	18	21.35^{**}	1.26*	0.30*
أيام التجربة × العمر	9	$6.72^{n.s}$	$0.30^{n.s}$	$0.16^{n.s}$
الخطأ التجريبي الثاني	99	8.47	0.70	0.16

$^{n.s}$: تأثير غير معنوي، * تأثير على مستوى 0.05 ، ** تأثير على مستوى 0.01

(A) قيمة معامل الانحدار 0.007±0.004

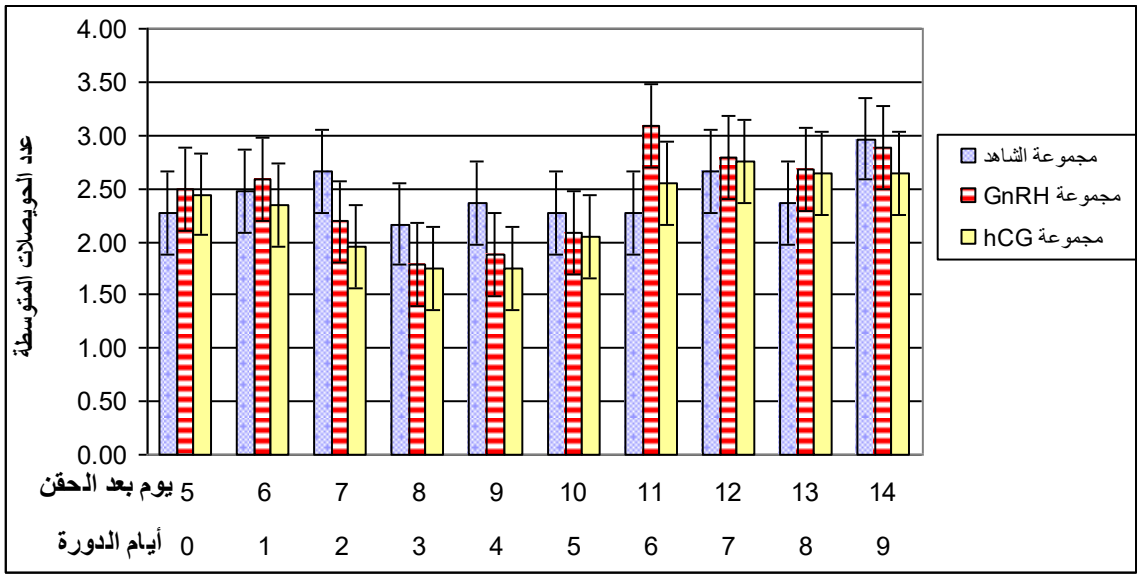
كما أشارت النتائج (الشكل 3–4) أن عدد **الجريبات الصغيرة** (2–5 مم) بلغ في اليوم 5 بعد الشبق 1.33±12.18 جريب في مجموعة الشاهد، و1.33±10.19 في المجموعة المحقونة بهرمون GnRH (المجموعة 2)، و1.33±10.43 جريب في المجموعة المحقونة بهرمون hCG (المجموعة 3) دون وجود فرق معنوي في عددها بين المجموعات المدروسة، وازداد هذا العدد بصورة معنوية ($p<0.05$) في اليوم 6 من الدورة (اليوم 1 بعد الحقن) ليصل إلى 1.33±14.99، و1.33±16.43 في المجموعتين المحقونتين بهرموني GnRH وhCG، على التوالي، مقارنة مع الشاهد (1.33±11.88)، ولوحظت نزعة في زيادة عدد الجريبات الصغيرة حتى اليوم 9 (اليوم 4 بعد الحقن) في مجموعتي التجربة. وكان عدد الجريبات المبيضية (2–5 مم) في مجموعة الشاهد خلال الفترة 12–14 يوماً بعد الشبق أعلى ($p<0.05$) منه في المجموعتين الباقيتين عدا اليوم 12 في المجموعة 2، واليوم 14 في المجموعة 3.



الشكل 3–4. متوسط أدنى المربعات لعدد الجريبات المبيضية الصغيرة ± الخطأ القياسي في الأبقار الشامية خلال فترة التجربة حسب المعاملة الهرمونية.

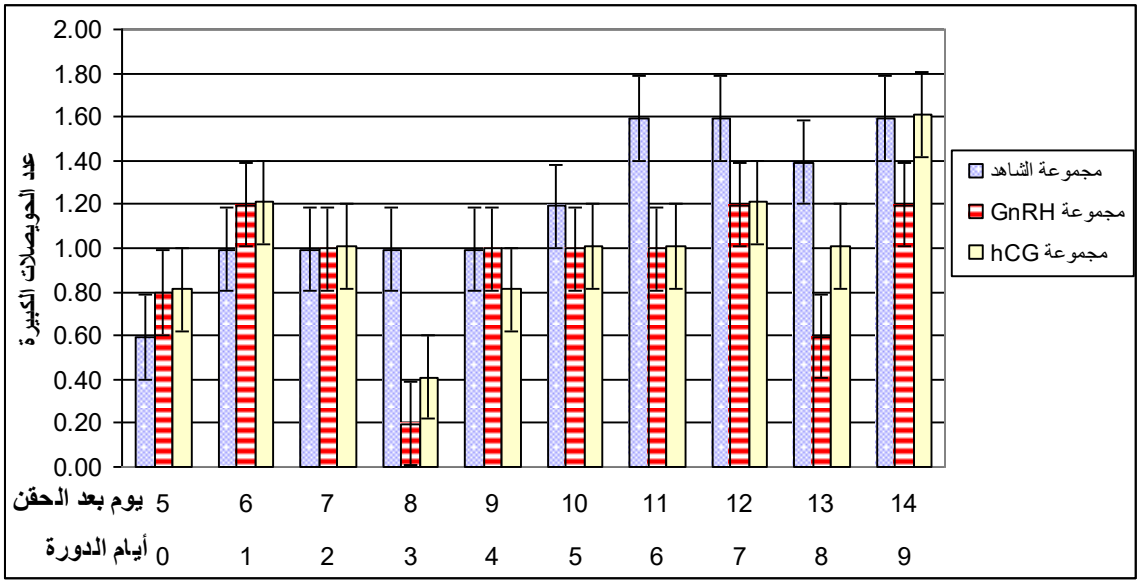
وكان عدد **الجريبات المتوسطة** (5–9 مم) في اليوم 5 بعد الإباضة (يوم الحقن) نحو 0.39±2.23، و0.39±2.63، و0.39±2.38 في المجموعات 1، و2، و3، على التوالي (الشكل 3–5) وتناقص العدد

(p < 0.05) في اليوم الثاني من الحقن في مجموعتي المعاملة الهرمونية (2، و3) مقارنة مع الشاهد (1: 0.39±2.83، 2: 0.39±2.19، 3: 0.39±1.78)، واستمر التناقص في عدد الجريبات المتوسطة حتى اليوم 4 بعد الحقن، ليصبح العدد متقارباً في الأيام 5–9 بعد الحقن بين المجموعات الثلاث عدا اليوم 6 الذي تفوق العدد في المجموعة 2 (p < 0.05) على نظيريه في المجموعتين 1 و3.



الشكل 3–5. متوسط أدنى المربعات لعدد الجريبات المبيضية المتوسطة ± الخطأ القياسي في الأبقار الشامية حسب المعاملة الهرمونية.

من جهة أخرى كان عدد **الجريبات المبيضية الكبيرة** (≤ 9 مم) متقارباً في المجموعات الثلاث خلال الأيام 0–1 يوم من الحقن (الشكل 3–6)، وكان العدد في اليوم 7 بعد الشبق (اليوم 2 بعد الحقن) نحو 0.19±0.98 في مجموعة الشاهد، وانخفض بصورة معنوية (p < 0.05) نتيجة تأثره بالحقن بهرمون GnRH إلى نحو 0.19±0.21 وإلى نحو 0.19±0.39 عند الحقن بهرمون hCG. وبشكل عام كان لتأثير الحقن الهرموني سبباً في تناقص عدد الجريبات المبيضية الكبيرة (p < 0.05) في الأيام 2 و3 و6 و7 و8 من الحقن بالنسبة للمجموعة الثانية، والأيام 2 و3 و6 للمجموعة الثالثة مقارنة مع الشاهد.



الشكل 6.3 متوسط أدنى المربعات لعدد الجريبات المبيضية الكبيرة ± الخطأ القياسي في الأبقار الشامية حسب المعاملة الهرمونية.

كما أظهرت النتائج (الجدول 3–5) وجود تأثير معنوي لمجموعات التجربة ($p < 0.05$) على قطر الجريب السائد، بينما لم يكن لها تأثير معنوي على الخصائص الأخرى للجريبات المبيضية والجسم الأصفر.

الجدول 3–5. تحليل التغاير لتأثير العوامل المدروسة في مواصفات الجريبات المبيضية والجسم الأصفر

مصدر	درجة	متوسط المربعات

التباين	الحرية	القطر الأعظمي للجريب السائد	موعد الإباضة	معدل النمو اليومي للجريب السائد	جسم أصفر أصلي	جسم أصفر مساعد
البروتوكول	2	7.79*	31.09$^{n.s}$ *درجة الحرية (1)*	$^{n.s}$0.005	1.69$^{n.s}$	2.90$^{n.s}$ *درجة الحرية (1)*
عمر البقرة	1	0.17$^{n.s}$	29.17$^{n.s}$	0.011$^{n.s}$	0.17$^{n.s}$	2.60$^{n.s}$
الخطأ التجريبي	10	1.38	86.34 *درجة الحرية (6)*	0.007	4.70	1.87 *درجة الحرية (6)*

$^{n.s}$ تأثير غير معنوي، * تأثير معنوي على مستوى 0.05

وتشير النتائج (الجدول3–6) إلى أن قطر الجريب السائد في مجموعة الشاهد كان 14.05±0.53 مم وهو أعلى ($p < 0.05$) مما وجد في المجموعتين الثانية (11.87±0.53 مم)، والثالثة (11.92±0.53 مم). وكان معدل النمو اليومي للجريب السائد متقارباً بين المجموعات الثلاث. حدثت الإباضة بمعدل 100% و80% بعد نحو 33.66±4.16، و29.92±4.65 ساعة في المجموعتين المحقونتين بهرمون GnRH أوhCG، على التوالي. ولم يتأثر قطر الجسم الأصفر بنوع المعاملة إذ تراوح في اليوم 14 من الشبق بين 22.40±0.97 و23.60±0.97 مم في المجموعات الثلاث، ولم يلحظ تأثير معنوي نتيجة الحقن الهرموني على قطر الجسم الأصفر المساعد المتشكل في المجموعتين 2: 17.60±0.61 مم، و3: 18.70±0.68 مم. وظهرت الموجة المبيضية في المجموعتين 2، و3 بعد نحو 2.60±0.27، و2.49±0.30 يوماً من الحقن، على التوالي.

الجدول 3-6. متوسط مواصفات الجريبات المبيضية والجسم الأصفر للأبقار الشامية المعاملة بهرموني GnRH وhCG في مرحلة نمو الجريب المبيضي السائد في الموجة المبيضية الأولى.

الخصائص	مجموعة الشاهد	مجموعة GnRH	مجموعة hCG
قطر الجريب السائد (مم)	^{a}0.53±14.05	^{b}0.53±11.87	^{b}0.53±11.92
وقت الإباضة (ساعة بعد الحقن)	-	^{a}4.16±33.66	^{a}4.65±29.92
معدل النمو منذ اليوم 5 حتى الوصول للقطر الأعظمي (مم/يوم)	^{a}0.04±1.15	^{a}0.04±1.15	^{a}0.04±1.01
قطر الجسم الأصفر في اليوم 14 (مم)	^{a}0.97±23.60	^{a}0.97±22.83	^{a}0.97±22.40
قطر الجسم الأصفر المساعد في اليوم 14 (مم)	-	^{a}0.61±17.60	^{a}0.68±18.70

تشير الأحرف المختلفة في السطر الواحد إلى وجود فرق معنوي ($p < 0.05$) بين المتوسطات.

3-5. المناقشة:

3-5-1. مناقشة الجزء الأول:

أظهر الفحص اليومي لمبايض الأبقار الشامية أن ديناميكية نمو الجريبات المبيضية وتراجعها تحدث على شكل أمواج يتراوح عددها بين 1–5 موجات خلال دورة الشبق، وهذا يتوافق مع ما وجده الدكاك (2008) في بكاكير الأبقار الشامية، ومشابه لما يحدث في بقية عروق الأبقار الأخرى، كالفريزيان (Sirois وFortune، 1988)، والجير (*Bos Indicus*) (Viana وزملاؤه ،2000)، والراشي (*Bos indicus*) (Gaur وPurohit، 2007)، والهولشتاين (Enright وزملاؤه، 2002)، والهيرفورد (Gong وزملاؤه ،1991)، وعروق البراهما والأنجس والسينيبول (Alvarez وزملاؤه، 2000). وبغض النظر عن عدد الموجات المبيضية في الدورة التناسلية، أظهرت النتائج أن الجريب المبيضي في الموجة المبيضية الأولى يدخل مرحلة السيادة بعد 3–4 أيام من الإباضة السابقة، بينما يبدأ تدهوره في الأيام 7–10 من الشبق رغم أنَّ الموجة المبيضية الثانية يمكن أن تظهر في اليوم 6 من الشبق، والجريب المبيضي السائد الآخر يظهر في اليوم 8 من الشبق.

تبيّن أن استعمال بروتوكولين بوقتين مختلفين من الدورة (البروتوكول Synch المحدد، والبروتوكول CIDR-PGF2α) في هذه الدراسة أديا إلى إحداث إباضة في الجريب السائد، وتشكل موجة مبيضية تزامن فيها نمو الجريبات المبيضية الكبيرة أثناء تهدم الجسم الأصفر صناعياً بالبروستاغلاندينF2α، وإحداث الشبق لاحقاً.

يساعد هرمون GnRH في إحداث إباضة للجريب السائد وتشكل لجسم أصفر مساعد، ما يزيد من تركيز البروجسترون في الدم كما يساعد في تشكل موجة مبيضية جديدة، وبالتالي حدوث الإباضة بوقت متقارب بين الأبقار سواء عند استخدام طريقة PGF2α+GnRH في توقيت الشبق (Pursley وزملاؤه، 1995)، أو عند استخدام طريقة (PGF2α+CIDR+GnRH) (Ando وزملاؤه، 2005).

ظهرت نزعة في زيادة عدد الجريبات المبيضية الصغيرة بعد 1–4 أيام من حقن هرمون GnRH في المجموعات الأربع، وفي تزايد عدد الجريبات المتوسطة بعد يوم واحدٍ من الحقن، بينما انخفض عدد

الجريبات المبيضية الكبيرة (≤ 9 مم) بعد يوم واحد من الحقن في المجموعات كافة، ما يجعلنا نستنتج أن الموجة الجريبية المبيضية تبدأ بالظهور بعد يوم واحد إلى يومين من الحقن سواء خلال نمو الجريب المبيضي السائد أو أثناء تراجعه في الموجة المبيضية الأولى. ويعزى السبب في زيادة عدد الجريبات الصغيرة بعد يوم واحد **من حقن GnRH** إلى أن هذا الهرمون يسبب إما إباضة الجريب المبيضي السائد أو لوتنته مما يساعد الجريبات التي قطرها أصغر من 2 مم على النمو والتزايد في الحجم كي يُرشّح منها عدد آخر من الجريبات للإباضة، بينما يعود السبب في عدم وجود تأثير واضح بين المجموعات في عدد الجريبات المبيضية المتوسطة إلى أنها إما تتدهور أو تتحول إلى جريبات كبيرة، أما بالنسبة للجريبات الكبيرة فإن الإباضة حدثت بنسبة 100% في المجموعتين 1 و3 بعد نحو 33 و36 ساعة بعد حقن GnRH، وبالتالي ملاحظة تناقص حاد في عددها بعد يومين من الحقن، وبالنسبة للمجموعتين 2 و4 لوحظ أن معدل الإباضة كان 25 و40% فيهما بعد نحو 36 و48 ساعة من الحقن، على التوالي، مع ملاحظة وجود موجة أخرى ظهر فيها جريب سائد زاد من عدد الجريبات الكبيرة.

توافق هذه النتائج ما أشار إليه Amaya-Montoya وزملاؤه (2007) في أبقار الهولشتاين بالنسبة لعدد الجريبات المبيضية الصغيرة (3–6 مم) الذي ازداد بعد 24 ساعة من حقن GnRH بوجود جسم أصفر وظيفي أو عدمه، ولم يتأثر عدد الجريبات المتوسطة (6–10 مم) بعد الحقن، بينما ازداد عدد الجريبات الكبيرة (≤10 مم) بعد 5 أيام من حقن GnRH عند غياب الجسم الأصفر الوظيفي، وهذا يوافق ما وجد في المجموعتين 2، و4 ويخالف ما وجد في المجموعتين 1، و3 في هذه الدراسة، وذلك وفقاً لبروتوكول المعاملة الهرمونية.

لوحظ في هذه الدراسة أيضاً تناقص في عدد الجريبات الصغيرة في اليومين 8، و9 وهذا قد يعزى لما أشار إليه Peralta-Torres وزملاؤه (2010) من أن نزع اللوالب وبالتالي نقص هرمون البروجسترون

يسبب زيادة في هرموني الإستراديول وLH، وزيادة عدد الجريبات الكبيرة التي تخمد نمو الجريبات المبيضية الصغيرة وتسبب تراجعها.

وجد Dirandeh وزملاؤه (2009) في أبقار الهولشتاين زيادة عدد الجريبات (4–≥7 مم) بعد يومين من حقن GnRH (اليوم 6)، ونقص عدد الجريبات (<7 مم) منذ الحقن حتى اليوم9.

كان قطر الجريب السائد عند حقن هرمون GnRH في المجموعتين 2، و4 (مرحلة ثبات أو تراجع نمو الجريب السائد) أعلى مماهو عليه في المجموعتين 1، و3 (مرحلة نمو الجريب السائد).

أوضحت النتائج أيضاً أن حقن هرمون GnRH في اليوم 5 (نمو الجريب السائد)، واليوم 9 (تراجع الجريب السائد) من دورة الشبق في الأبقار الشامية في حال وجود لولب (المجموعتين 1، و2) أو عدمه (3، و4) كان سبباً في تحرر كمية من هرمون LH من النخامية الغدية، ما أدى إلى حدوث الإباضة بمعدل 8/8، و8/2، و 5/5، و5/2 في المجموعات 1، و2، و3، و4، على التوالي.

إن النمو المستمر للجريب المبيضي السائد بوجود كمية قليلة من هرمون البروجسترون يعطيه القدرة على الإباضة بعد حقن هرمون LH (Rajamahendran و Taylor، 1991)، حيث ينمو الجريب السائد في الموجة الأولى بوجود كمية قليلة من البروجسترون (الدكاك، 2008) وكميات كبيرة من مستقبلات هرمون LH (Cupp وزملاؤه، 1993)، ويكون تركيز هرمون الإستراديول في الجريب المبيضي السائد بوجود كمية قليلة من هرمون البروجسترون أكبر مقارنة مع مرحلة نمو الجريب السائد نفسها بوجود كمية كبيرة من البروجسترون (De la Sota وزملاؤه، 1993).

وجد Atkins وزملاؤه (2008) أن إعطاء GnRH في اليوم 5، أو10 بعد الشبق في بكاكير لحم خليطة أدى إلى حدوث الإباضة بمعدل 92%، و31%، على التوالي. لأن استجابة الأبقار للإباضة نتيجة حقن GnRH تحدث في طور نمو الجريب السائد لاحتواء خلاياه الحبيبية على العدد الأعظمي من مستقبلات

LH، بينما تكون هذه المستقبلات قليلة في حال حقنها خارج مرحلة النمو بغض النظر عن رقم الموجة المتشكلة في الدورة التناسلية (Bodensteiner وزملاؤه، 1996a،b). إن إعطاء GnRH في اليوم 11–13 من بدء دورة الشبق يحرر هرموني LH وFSH خلال 2–4 ساعات من النخامية الغدية وبشكل مشابه لما يحدث من ذروة لهما قبل الإباضة خلال دورة الشبق (Rettmer وزملاؤه، 1992). وتحصل ذروة هرمون LH بعد نحو 90 دقيقة من حقن GnRH (Atkins وزملاؤه، 2008).

أشارت الدراسات المرجعية أن مستوى هرمون البروجسترون يزيد بعد اليوم 3 من حقن هرمون GnRH سواء في حال وجود لولب (Xu وزملاؤه، 2000) أو عدمه (Atkins وزملاؤه، b2010) بسبب تشكل جسم أصفر مساعد يزيد من تركيز البروجسترون في الدم (Beltran وVasconcelos، 2008)، بينما يزيد تركيز هرمون الإستراديول بعد 0–2 يوماً من الحقن نتيجة وجود جريب سائد قبل الإباضة (Ando وزملاؤه، 2005).

فشلت الإباضة في 75% ، و60% من أبقار المجموعتين 2، و4 بعد حقن هرمون GnRH بسبب أن الجريبات المبيضية أثناء الحقن إما كانت صغيرة وبالتالي عدم حدوث استجابة في ارتفاع هرمون LH نتيجة الحقن (Sartori وزملاؤه، 2001)، أو بسبب أن الجريبات السائدة كانت في مرحلة التراجع، أو بسبب أن الجريب السائد لم يصل لقطره المعياري أو نضجه وهذا يمنع وجود عدد كاف من مستقبلات هرمون LH وبالتالي من دوره في حدوث الإباضة (Atkins وزملاؤه، 2010 b). على أية حال، وجد أن موجة الجريبات المتراجعة التي لا يحدث فيها إباضة عند حقن هرمون GnRH تبدأ بإظهار موجة مبيضية جديدة متزامنة مع ظهور الموجة عند الجريبات التي حدث لها إباضة رغم أن أغلب الجريبات المتراجعة حدث لها لوتنة. ولذلك فإن حقن هرمون GnRH يسبب إما إباضة الجريب السائد أو لوتنته حسب مرحلة ظهوره، ويسبب في ظهور موجة جديدة بعد 1–2 يوماً من الحقن. وهذا يتوافق مع ماوجده Wolfenson وزملاؤه (1994) في أبقار الهولشتاين.

وجد Atkins وزملاؤه (a2010) أن الأبقار (اللحم) التي حدث فيها إباضة نتيجة حقنها بهرمون GnRH كان فيها قطر الجريب السائد بعد 48 ساعة من حقن PGF2α أعلى مما هو عليه في الأبقار التي لم يحدث لها إباضة، وهذا يخالف ما وجدناه في المجموعة 4 التي كان فيها قطر الجريب السائد عند الإباضة (بعد حقن PGF2α) أعلى من بقية المجموعات، وربما يعزى ذلك إلى وجود زيادة ظاهرية في كل من قطر الجريب عند الشبق وفي موعد الشبق، إضافة إلى ذلك فإن وجود اللولب يقلل من قطر الجريب السائد وبالتالي فإن نزعه يسرع من تحرر هرمون LH مما يبكّر في حدوث الإباضة مقارنة مع المجموعة التي لايوجد فيها لولب، كما أن الارتفاع في هرمون الإستراديول في هذا العرق مقارنة مع العروق الأخرى (الدكاك، 2008) يمكن أن يثبط إفراز هرمون LH بسبب التغذية العكسية للاستراديول على المحور الدماغي والنخامية (Gasser وزملاؤه، 2006).

وجد Martinez وزملاؤه (2002) في أبقار اللحم أن 50% منها حدث فيها إباضة عند حقن GnRH بنفس وقت إيداع اللولب في المهبل في أوقات عشوائية من الدورة، بينما وجد Ando وزملاؤه (2005) في الأبقار السوداء اليابانية أن 3 من أصل 4 أبقار حدث فيها إباضة بعد الحقن (يوم إيداع اللولب هو اليوم 7 بعد الشبق) لأن البقرة التي لم يحدث فيها إباضة كان فيها الجريب السائد بمرحلة التراجع.

حدثت الإباضة في هذه الدراسة بعد نحو 32.99±3.02، و36.02±3.84، و36.00±0.80 ساعة من حقن GnRH في المجموعات 1، و2، و3، على التوالي، وهو أقل من المجموعة 4 (48.01±6.01 ساعة)، تشابه النتائج في المجموعات الثلاث الأولى مع ما وجده Martinez وزملاؤه (2002) في أبقار اللحم من أن الإباضة حدثت بعد 1.5±0.3 يوماً عند حقن GnRH بنفس يوم إيداع اللولب (أوقات غير معلومة من الدورة)، ومع ما وجده Ando وزملاؤه (2005) في الأبقار اليابانية السوداء (34 ساعة) عند حقن GnRH وإيداع اللولب في اليوم 7 من الشبق، وما وجده Amaya-Montoya وزملاؤه (2007) في أبقار الفريزيان بعد 24–48 ساعة من الحقن بسبب وجود جريب مبيضي ≥10 مم عند الحقن. ووجد

Martinez وزملاؤه (1999) أن الإباضة تحدث بعد 36 ساعة بنسبة 56%، في عجلات اللحم بعد حقنها في اليوم 6 من دورة الشبق بـGnRH.

كانت نسبة حدوث الشبق 100% في المجموعات الأربع، وهو أعلى مما وجده Tadesse وزملاؤه (2011) في أبقار البوران والهولشتاين فريزيان (54.8%) عند استخدام طريقة (CIDR+GnRH+ PGF2α) بأوقات غير معلومة من الدورة ووجود بعض الأبقار بحالة خمول مبيضي، بينما وجد Wolfenson وزملاؤه (1994) أن هذه النسبة كانت 100% في أبقار الهولشتاين (نظام GnRH+ PGF2α) في اليوم 12 من الدورة، و100% في العرق نفسه والنظام السابق ولكن بأوقات غير معلومة من الدورة (Pursley وزملاؤه، 1995).

وجد الدكاك (2008) أن طول فترة حياة الجسم الأصفر الوظيفي في بكاكير الأبقار الشامية كان 9، و12، و15 يوماً في الدورات التناسلية التي طولها 18.1، و22.1، و26.5 يوماً، على التوالي، فإنه من المتوقع أن تكون نسبة الاستجابة لحقن هرمون البروستاغلاندينF2α مرة واحدة في أوقات عشوائية من الدورة نحو 49.7%، و53.3%، و56.6%، حسب طول الدورة، على التوالي.

حدث الشبق في الأبقار الشامية بعد 46–53 ساعة من حقن PGF2α، وهو يقارب ماوجده Ando وزملاؤه (2005) في الأبقار اليابانية السوداء (بعد 36–72 ساعة من نزع اللولب بعد يوم واحد من حقن PGF2α)، وأقل مما وجده Tadesse وزملاؤه (2011) من أن الشبق يحدث في أبقار البوران والهولشتاين فريزيان بعد 78.5±4 ساعة من حقن PGF2α عند تطبيق نظام (CIDR+GnRH+ PGF2α) ، وقريب مما وجده Wolfenson وزملاؤه (1994) في أبقار الهولشتاين (2.6±0.4 يوم) (طريقة PGF2α + GnRH).

راوح موعد الإباضة بعد حقن PGF2α في المجموعات المدروسة بين77−69 ساعة، وتأخر موعد الإباضة في المجموعة 4 عما هو عليه في المجموعة 1، ويعود السبب في ذلك إلى زيادة قطر الجريب السائد عند الإباضة في المجموعة 4 مما استغرق وقتاً أطول للانفجار مقارنة مع المجموعة 1 (P=0.09)، وباعتبار وجود بروجسترون أعلى في المجموعتين 1، و2 نتيجة إيداع اللوالب لهما فمن المحتمل أن وجود اللولب يقلل من قطر الجريب السائد وبالتالي فإن نزعه يسرع من تحرر هرمون LH مما يبكر في حدوث الإباضة مقارنة مع المجموعة التي لايوجد فيها لولب، وكان موعد الإباضة أقل مما وجده Ando وزملاؤه (2005) عند اتباع نظام (PGF2α+CIDR−GnRH) الذي نزع فيه اللولب بعد 1 يوم من حقن PGF2α (72− 84 ساعة من نزع اللولب)، وأقل مما أشار إليه Amaya-Montoya (2007) (طريقة PGF2α+ GnRH) (بعد 4−5 يوم من حقن PGF2α).

3−5−2. الجزء الثاني:

أظهرت النتائج أن الموجة الجريبية الأولى في الأبقار الشامية ظهرت يوم الإباضة أو بعدها بيوم واحد في المجموعات الثلاث المدروسة، وهذا يوافق ما وجده Sartoreli وزملاؤه (2005) في أبقار النيلور. وبين Dirandeh وزملاؤه (2009) أن الموجة المبيضية الأولى في دورة الشبق يمكن أن تظهر قبل الإباضة بسبب حدوث زيادة كبيرة في هرمون FSH في نهاية دورة الشبق السابقة.

بيّنت النتائج أيضاً أن عدد الجريبات المبيضية الصغيرة ازداد في المجموعتين 2، و3 بعد 1 يوم من الحقن بـGnRH وhCG مقارنة مع الشاهد، ونقص عدد كل من الجريبات المتوسطة والكبيرة بعد 2−4 أيام وبعد 2−3 أيام من الحقن، على التوالي، كما ظهرت الموجة المبيضية بعد الحقن بـ2−3 أيام في المجموعتين 2، و3، بينما وجد Dirandeh وزملاؤه (2009) أن عدد الجريبات (4−≥7 مم) ازداد منذ حقن GnRH (اليوم 6) إلى اليوم8 في أبقار الهولشتاين، ونقص عدد الجريبات (≤7 مم) منذ الحقن حتى اليوم9. وأشار Amaya-Montoya وزملاؤه (2007) أن عدد الجريبات المبيضية (3−6 مم) في أبقار

الهولشتاين ازداد بعد 24 ساعة من حقن GnRH بوجود جسم أصفر وظيفي أو عدمه، ولم يتأثر عدد الجريبات المتوسطة (6–10 مم)، بينما ازداد عدد الجريبات الكبيرة (≤10 مم) عند غياب الجسم الأصفر الوظيفي مقارنة مع وجوده.

كما أوضحت النتائج أن حقن هرموني GnRH وhCG في اليوم 5 من دورة الشبق في الأبقار الشامية أدى إلى حدوث الإباضة بمعدل 5/5، و5/4، مما يشير إلى تحرر كمية من هرمون LH من النخامية الغدية استجابة لحقن GnRH وhCG، ساهمت في انفجار الجريبات المبيضية الكبيرة (≤ 9مم) بعد 33.66±4.16، و29.92±4.65 ساعة من الحقن، في المجموعتين 2، و3، على التوالي، وقد يعود السبب في عدم حدوث إباضة في إحدى البقرات التي حقنت بهرمون hCG إلى عدم وجود جريب مبيضي سائد (≤ 9 مم). تتوافق هذه النتائج مع ما وجده Amaya-Montoya وزملاؤه (2007) من أن نسبة الإباضة كانت 100% بعد حقن أبقار الفريزيان بـGnRH وحدثت بعد 24–48 ساعة من الحقن بسبب وجود جريب مبيضي ≤10 مم عند الحقن. ووجد Martinez وزملاؤه (1999) أن الإباضة تحدث بعد 36 ساعة بنسبة 56%، و100% في بكاكير اللحم بعد حقنها في اليوم 6 بـGnRH، وLH على التوالي. ووجد Fricke وزملاؤه (1993) أن إعطاء hCG لخليط من أبقار اللحم في اليوم 6 بعد الشبق يحدث الإباضة لكل البكاكير، ويزيد من تركيز البروجسترون في الأيام 8–13 من دورة الشبق.

تشير العديد من الدراسات أن الإباضة تحدث في الأبقار استجابة لحقن الهرمونات المحررة لموجهات القند (منشطات المناسل) في طور نمو الجريب السائد، بينما تكون الاستجابة قليلة أو معدومة في حال حقنها خارج مرحلة النمو بغض النظر عن رقم الموجة المتشكلة في الدورة، فقد أشار Silcox وزملاؤه (1993) إلى أن إعطاء GnRH سبب حدوث الإباضة للبكاكير بنحو 100%، و 33%، و0% في مرحلة نمو، وثبات، وتراجع الجريب السائد، على التوالي. وجد Geary وزملاؤه (2001) في أبقار لحم خليطة أن الحقن بهرموني GnRH وhCG في أوقات غير معلومة من الدورة سبب حدوث الإباضة بنسبة 31%،

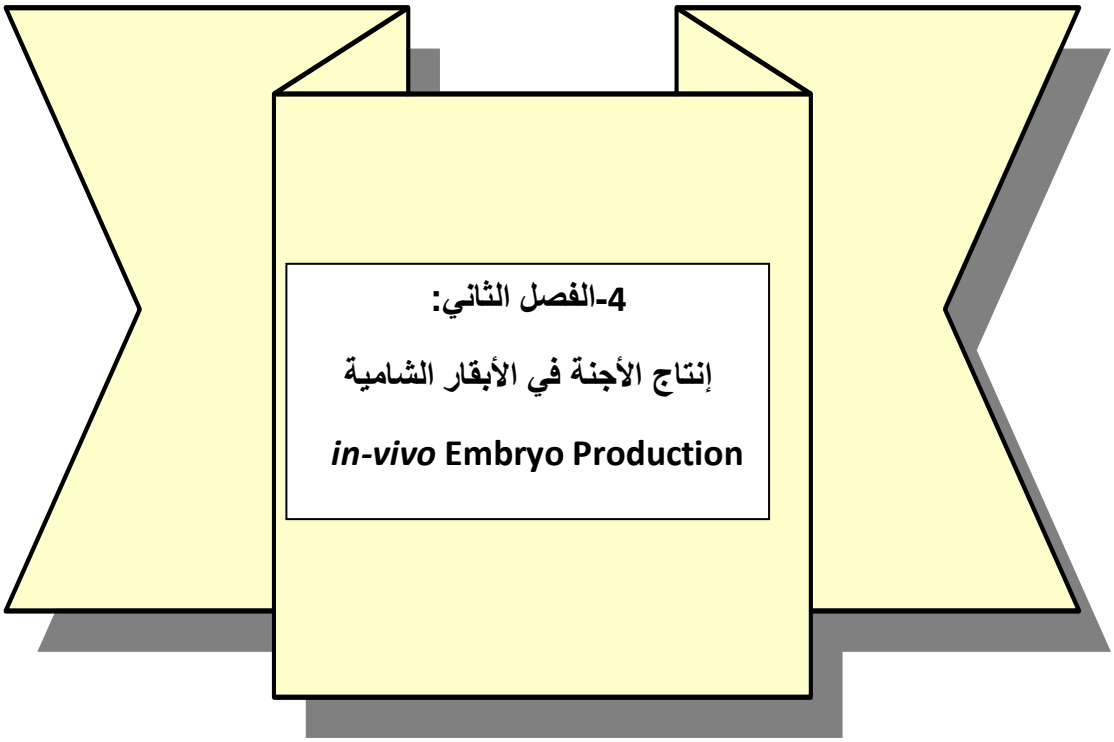
و39%، على التوالي. وتمكّن Crowe وزملاؤه (1993) من الحصول على معدل إباضة قدره 100% لأبقار خليطة (فريزيان×ليموزين) عند إعطاء البوسيريلين buserelin (GnRH) في طور نمو الجريب السائد بعد الولادة، وبنسبة 70% في طور التراجع من دون ملاحظة علائم شبق قبل الإباضة. وأشار Pursley وزملاؤه (1995) أن نحو 90% من أبقار الهولشتاين استجابت للحقن بـGnRH من خلال حدوث إباضة للجريب السائد بفترات مختلفة من الدورة. ووجد Atkins وزملاؤه (2008) أن إعطاء GnRH لباكير لحم خليطة في اليوم 5 بعد الشبق (مرحلة نمو الجريب السائد) أدى إلى حدوث إباضة بمعدل 92%. وإذا أعطي GnRH عندما يكون الجريب السائد غير ناضج أو بعد مرحلة النضج فلا تحصل إباضة ولا تظهر موجة مبيضية في بكاكير اللحم (Martinez وزملاؤه، 1999).

تتوافق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه Dirandeh وزملاؤه (2009) من أن الحقن بـ GnRH يقود إلى تشكل جريب مبيضي سائد أصغر حجماً عند الإباضة، ولكن تخالفه بأن معدل النمو اليومي للجريب السائد يقل بعد الحقن حتى الإباضة. وبيّنت النتائج أن GnRH يقلل من فترة نمو الجريبات المبيضية ويسبب لها إباضة خلال 2–4 أيام من الحقن، وهذا يشابه ماوجده Bleach وزملاؤه (2004) في أبقار الحليب. أما فيما يتعلق بالقطر الأعظمي للجريب المبيضي السائد فكان أقل عند الحقن من الشاهد. ووجد Atkins وزملاؤه (2008) أن إعطاء GnRH في اليوم 5 بعد الشبق في بكاكير لحم خليطة أدى إلى حدوث الإباضة بنسبة 92%. بينما وجد Amaya-Montoya وزملاؤه (2007) أن قطر الجريب السائد بعد حقن GnRH في أبقار الهولشتاين كان 21.2±1.5 مم، و15.9±1.4 مم في حال وجود جسم أصفر، أو عدمه، على التوالي. بينما كان في بكاكير الهولشتاين نحو 15.2±0.87 مم (Pursley وزملاؤه، 1995). وظهرت الموجة المبيضية الثانية والثالثة في هذه الدراسة في الأيام 7.60±0.27، و16.10±0.65، والأيام 7.49±0.30، و17.40±0.68 من دورة الشبق في المجموعة الثانية، والثالثة، على التوالي. وبشكل مشابه تظهر الموجة الثانية والثالثة عند أبقار الهولشتاين في اليوم

8، و18 من دورة الشبق بعد حقنها في اليوم 6 بهرمون GnRH (Dirandeh وزملاؤه، 2009). وتوافق نتائج هذه الدراسة ماوجده Pursley وزملاؤه (1995) من أن الموجة المبيضية تظهر بعد 2–4 أيام من الحقن بـGnRH لعجلات وأبقار الهولشتاين بمتوسط قدره 2.5 يوماً.

لوحظ في هذه الدراسة أن إعطاء GnRH وhCG في مرحلة نمو الجريب المبيضي السائد يسبب تشكل جسم أصفر ثانوي يكون قطره بعد 9 أيام من الحقن نحو 17.60±0.61 مم، و18.70±0.68 مم، على التوالي. وبشكل مشابه لنتائج هذه الدراسة، وجد Pursley وزملاؤه (1995) أن حجم الجسم الأصفر الثانوي المتشكل بعد 7 أيام من حقن أبقار الهولشتاين بـGnRH كان نحو 17.7±0.33 مم، لكنه أقل من قطر الجسم الأصفر الأصلي 27.6±1.75 مم. ووجد Beltran وVasconcelos (2008) أن إعطاء GnRH وhCG في اليوم الخامس بعد الشبق في أبقار الفريزيان يؤثر على خلايا الجريبات المبيضية من خلال تحولها لاحقاً إلى خلايا لوتيئينية تكوّن جسم أصفر ثانوي يزيد من كمية البروجسترون في الدم ومن معدل الحمل بعد التلقيح الصناعي، وهذا يضيف أهمية تطبيقية لهذا البحث إضافة لأهميتها في زيادة معدل الحمل عند تطبيق تقانة نقل الأجنة، فعلى سبيل المثال وجد أن إعطاء هرمون GnRH في اليوم الخامس بعد الشبق للأبقار المستقبلة يزيد معدل الحمل من 69.8% إلى 75% في بكاكير الحليب (Ideta وزملاؤه، 2005)، ومن 45% إلى 67% عند إعطاء hCG في اليوم السادس بعد الشبق عند الأبقار اليابانية السوداء (Nishigai وزملاؤه، 2002). ومن الممكن أيضاً توقيت بداية ظهور موجة مبيضية جديدة في برامج الإباضة المتعددة المخصصة لانتاج الأجنة، فقد وجد Sato وزملاؤه (2005) أن إعطاء أبقار الهولشتاين GnRH (25 ميكروغرامfertirelin acetate) في اليوم 6 بعد الشبق عند تطبيق إحدى برامج الإباضة المتعددة أدى إلى زيادة عدد الأجنة القابلة للنقل إلى 10.8 جنين مقارنة مع 5.1 جنين عند عدم استخدام GnRH للتحكم في بداية ظهور الموجة المبيضية.

واستنتج أن حقن الأبقار الشامية في اليوم الخامس من دورة الشبق بـGnRH أوhCG يساهم في ظهور موجة مبيضية، ويسبب تغيراً في ديناميكية الجريبات المبيضية من خلال حدوث تغير في عددها، وتحدث الإباضة بعد 24–48 ساعة من الحقن شريطة وجود جريب مبيضي سائد، كما يتكون جسم أصفر ثانوي لاحقاً. كما أن حقن هرمون GnRH عند بدء تنفيذ برنامج توقيت الشبق سواء في بداية ظهور الموجة المبيضية أو خلال تراجعها مهم جداً في إباضة الجريب السائد أو لوتنته وبالتالي تشكل مادة لوتيئينية تزيد من تركيز هرمون البروجسترون في الدم، كما يفيد في تشكل موجة مبيضية لاحقة يسود فيها جريب حجمه أكبر من 10 مم عند حقن PGF2α وبالتالي يزيد من فرصة إباضة جريب سائد كبير الحجم.



4-1. مقدمة:

يعتمد انتاج الأجنة حقلياً *in vivo* على إحداث الإباضة المتعددة في الإناث المانحة عن طريق حقنها بمنشطات المناسل لزيادة عدد الجريبات المبيضية الكبيرة والبويضات المتحررة منها، وتلقيحها صناعياً بسائل منوي من ذكر مختبر وذو صفات وراثية عالية تتوافق مع رغبة المربي، ومن ثم جمع

الأجنة بعد أسبوع من تاريخ التلقيح، وزرعها في حيوانات مستقبلة، أو تجميدها وتخزينها (Quaresma وزملاؤه، 2003)، وتعد تقانة نقل الأجنة embryo transfer وسيلة فاعلة لحفظ الأنواع والسلالات النادرة (Solti وزملاؤه، 2000)، ويبحث المزاولون لها عن إنتاج عال من الأجنة ونوعية ممتازة منها. وتلعب عدة عوامل إضافة إلى البروتوكولات المتبعة للإباضة المتعددة في نوعية الأجنة، ويشمل ذلك حيوية النطاف (Newcomb، 1980)، ومصدر هرمون FSH (Lindsell وزملاؤه، 1986)، والإجهاد الحراري (Page وزملاؤه، 1985)، والتغذية (McEvoy وزملاؤه، 1995)، والسلالة (Donaldson، 1984) وفصل السنة (Hasler وزملاؤه، 1983)، وعمر الحيوان المانح (Lerner وزملاؤه، 1986). على أية حال، يُقاس إنتاج الأجنة بواسطة الإباضة المتعددة بعدد الأجنة القابلة للنقل، ووجد Lerner وزملاؤه (1986) أن هناك تأثيراً سلبياً لعمر البقرة المانحة في الإستجابة للإباضة المتعددة، إذ تُنتج الأبقار المانحة الصغيرة في العمر أجنة أكثر حيوية من نظيراتها المتقدمة في العمر نتيجةً لنقصان معدلات الإباضة والإخصاب في الأبقار الكبيرة. كما يؤثر قطر الجريب السائد في موجة الإباضة على معدلات الحمل للأبقار المستقبلة، إذ وجد Sartori وزملاؤه (2006) أن نسبة الحمل تزداد مع زيادة القطر الأعظمي للجريب السائد في أبقار الفريزيان عند تطبيق تقانة نقل الأجنة. ووجد Sartori وزملاؤه (2002) أن هناك ارتباط ايجابي بين حجم جريب الإباضة وتركيز هرمون البروجسترون في اليوم السادس والسابع بعد الإباضة.

استخدم الباحثون هرمون FSH المختلط بنسب مختلفة من هرمون LH وأعطت نتائج متباينة وفقاً لحجم الجرعة المستخدمة (Lerner وزملاؤه، 1986؛ Mapletoft وزملاؤه 1988، Takagi وزملاؤه، 2001)، ووُجد أن الزيادة في جرعة الـFSH (Folltropin®) من 5 إلى10 مغ أدى إلى ارتفاع معدل الإباضة وزيادة عدد الأجنة القابلة للنقل، بينما لم يزداد عددها عند زيادة الجرعة إلى أكثر من 20 مغ في بكاكير اللحم (Gonzalez وزملاؤه، 1990). وجد Donaldson و Darrell (1985) ارتباطاً سلبياً بين

كمية FSH النقية وبين عدد الأجنة القابلة للنقل. ووجد Souza وزملاؤه (2007) أن زيادة جرعة FSH يمكن أن تحسن من عدد الجريبات المبيضية الكبيرة لكنها تؤثر سلباً في نوعية الأجنة.

يستخدم هرمون FSH النقي أيضاً بشكل واسع في برامج الإباضة المتعددة، رغم ارتفاع سعره بسبب استجابة الأبقار بشكل فعال له (Souza وزملاؤه، 2007)، كما يجب حقنه مرتين يومياً لمدة 4–5 أيام لنجاح الإباضة المتعددة في الأبقار لأن نصف عمره يقدر بنحو 5 ساعات (Monniaux وزملاؤه، 1983). وبالتالي فإن استخدامه مكلف ومجهد لمزاولي هذه التقانة.

كما يستخدم هرمون مصل الفرس الحامل (PMSG) في برامج الإباضة المتعددة نظراً لقلة تكاليفه، وحقنه لمرة واحدة فقط، إضافة لتوافره بكثرة وخاصة في البلدان التي تمنع استخدام منتجات الخنزير (Alfuraiji وزملاؤه، 1993)، وهو عبارة عن مركب غليكوبروتيني معقد له تأثير كل من FSH و LH (Murphy وMartinuk، 1991)، وعندما يعطى للأبقار يكون نصف عمره الفعّال نحو 40 ساعة (Dieleman وزملاؤه، 1993)، ويستمر وجوده في الدم حتى 10 أيام بعد الحقن، وهذا ما يفسر حقنه مرة واحدة ويعطى بعده البروستاغلاندينF2α بنحو 48 ساعة (Dieleman وزملاؤه، 1993). إن العمر الحيوي الطويل لهرمون PMSG يسبب تحريضاً مستمراً للمبايض ويزيد من عدد الجريبات الكبيرة غير القادرة على الإباضة، ويغير من مستوى بعض الهرمونات في الدم، وينقص من نوعية الأجنة، ويولد أضداداً له (Moor وزملاؤه، 1985)، ويمكن الحد من تلك المشاكل من خلال إعطاء أجساماً مضادة له أثناء التلقيح الصناعي (Gonzalez وزملاؤه، 1994).

تختلف استجابة مبايض الأبقار للإباضة المتعددة باختلاف مصدر الهرمون، وكمية الجرعة المستخدمة (Mapletoft وزملاؤه، 2002)، وطول فترة النشاط الحيوي للهرمون (Murphy و Martinuk، 1991). استخدمت ثلاث أنواع من منشطات المناسل لإحداث الإباضة المتعددة في الأبقار، هي: المنشطات المستخرجة من مستخلص الغدة النخامية للخنزير أو الأبقار أو الأغنام، وهرمون مصل الفرس الحامل، والهرمون الحيضي البشري الموجه للمناسل human menopausal

gonadotrophin (hMG) (Alkemade، وزملاؤه، 1993)، ويكون دور البروستاغلاندينF2α المعطى لاحقاً للأبقار في برنامج الإباضة المتعددة تهديم الجسم الأصفر وإحداث الشبق (Mapletoft وزملاؤه، 2002).

أشارت بعض الدراسات إلى أنه يمكن تطبيق عدة نماذج من برامج توقيت الإباضة للتأثير في ديناميكية نشاط الجريبات المبيضية والجسم الأصفر عند الأبقار المانحة متبوعة بالتلقيح الصناعي ومن ثم نقل الأجنة، فقد بيّن Nasser وزملاؤه (2004) أن إعطاء هرمون مصل الفرس الحامل للأبقار في اليوم الثامن بدل اليوم الخامس من وجود لوالب تحتوي على البروجستوجين progestogens في مهابلها يقلل من معدلات الإخصاب والحمل، وقد عزي هذا الانخفاض إلى وجود الجسم الأصفر مع مصدر صناعي لهرمون البروجسترون الذي يثبط نمو الجريب السائد (Rathbone وزملاؤه، 2001).

إن الأبقار عالية الإنتاج يرافقها غالباً انخفاض في أدائها التناسلي، إذ تزداد احتياجاتها العلفية واستقلابها العام الذي بدوره يؤثر على تراكيز الهرمونات الجنسية، ومن هنا فإن تقانة نقل الأجنة تكون مهمة لتعويض هذا الانخفاض في أدائها التناسلي، والاستفادة منها في التحسين الوراثي وتسريعه (Sangsritavong وزملاؤه، 2002). كما تلعب العديد من العوامل دوراً مهماً في إنجاح تقانة نقل الأجنة في الأبقار، فقد لاحظ Moreira وزملاؤه (2002a، b) أن إعطاء هرمون النمو البقري الصنعي (منشط الخلايا الجسمية البقري) (bST) يحسّن نوعية الأجنة، كما أنه يزيد من معدل الحمل (Santos وزملاؤه 2004). وبيّن Nishigai وزملاؤه (2002) أن إعطاء هرمون hCG في اليوم السادس من الحمل يقلل من فقدان الأجنة. وتعدّ الأحماض الدهنية غير المشبعة ذات تأثير إيجابي في الأداء التناسلي في الأبقار إذ تساهم في تحسين نوعية الأجنة (Mattos وزملاؤه، 2003). ومن العوامل المهمة في إنجاح نقل الأجنة للأبقار المستقبلة هو وجود جسم أصفر فعال خلال دورة الشبق (Thatcher وزملاؤه، 2001). كذلك فإن إعطاء الأبقار هرمون الأوكسيتوسين في اليوم 5–8 بعد التلقيح الصناعي يقلل نسبة الحمل في

الأبقار من 80% إلى 33% ولكن يزول هذا التأثير عند إعطاء عامل مضاد للبروستاغلاندين (Leemaster وزملاؤه، 1999). وأوضح Elli وزملاؤه (2001) أن إعطاء عامل مضاد للبروستاغلاندين يزيد معدل الحمل من 56% إلى 82% عند إجراء عملية نقل للأجنة. ووجد Quaresma وزملاؤه (2003) أن الجرعات العالية لهرمون LH لها تأثير سلبي في معدل الإخصاب وإنتاج الأجنة الحيوية القابلة للنقل في أبقار الميرتولينجا Mertolenga.

إن معرفة مواعيد الإباضات المختلفة للأبقار المانحة بعد الشبق يساعد في الحصول على أكبر عدد ممكن من الأجنة المخصبة والقابلة للنقل فمثلاً، وجد Yadav وزملاؤه (1986) في بكاكير اللحم أن الإباضات تحصل خلال الـ 24 ساعة الأولى من بدء الشبق، وأغلبها خلال 12 ساعة، لذلك لابد من تحديد الوقت المثالي للتلقيح الصناعي عند إحداث الإباضة المتعددة بما يضمن الحصول على معدلات مرتفعة من الإخصاب ونوعية جيدة من الأجنة، ووجد Sales وSouza (2005) أنه لم يؤثر وقت التلقيح الصناعي في عدد الأجنة الكلية والمتدهورة لأبقار الهولشتاين بعد 0، و12 ساعة أو بعد 12 و24 ساعة من بدء الشبق. وأشار Dalton وزملاؤه (2000) أن وقت التلقيح الصناعي الأمثل مازال غامضاً عند استخدام النطاف المجمدة بعد الإذابة التي تؤثر بدورها على نوعية الأجنة.

تدخل نطفة واحدة إلى سيتوبلازم البويضة، وتفشل بقية النطاف في اختراق المنطقة الشفافة zona pellucida (Saacke وزملاؤه، 2000)، بينما تُحتجز بقية النطاف خلفها وتسمى بالنطاف المساعدة التي تعكس عدد النطاف المتنافسة للوصول إلى الإخصاب (Saacke وزملاؤه، 1998)، ووجدت علاقة ارتباط موجبة بين عدد النطاف المساعدة في الإباضات المفردة مع نسبة الإخصاب في الأبقار (HunterوWilmut، 1983) إذ تتحسن نوعية الأجنة مع زيادة عدد النطاف المساعدة (DeJarnette وزملاؤه، 1992)، ويكون عدد النطاف المساعدة أقل في الإباضات المتعددة من الإباضة الفردية، لأن

فرط الإباضة يغير من تأثير بيئة قناة المبيض في نقل النطاف ومن ثم في نسبة الإخصاب (Gordon، 2003).

ونظراً لعدم وجود دراسات خاصة بإنتاج الأجنة في الأبقار الشامية فقد هدفت هذه الدراسة إلى:

1-تحديد الجرعة الأمثل من هرمون FSH لوحده أو مع هرمون LH، ومعرفة فعالية هرمون PMSG، في إحداث الإباضة المتعددة، ومعدل الإباضة، وعدد الأجسام الصفراء، ونوعية الأجنة الناتجة وقابليتها للنقل في الأبقار الشامية.

2- تحديد وقت التلقيح الصناعي الأمثل عند إحداث الإباضة المتعددة للأبقار الشامية، وتأثير ذلك في معدل الإخصاب وعدد الأجنة الناتجة ومواصفاتها في الأبقار الشامية المانحة.

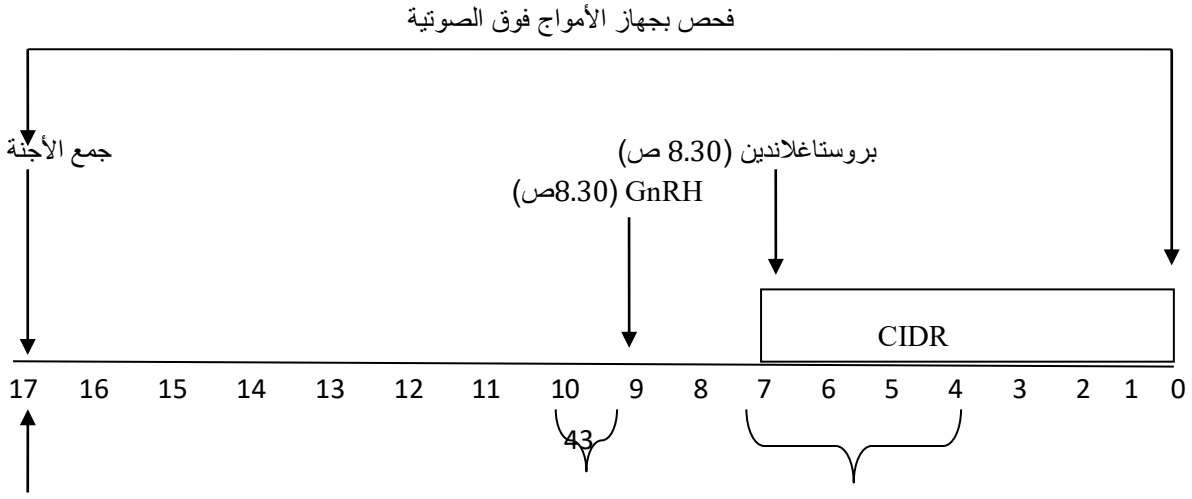
4-2. المواد والطرائق:

خُصّصت 29 بقرة شامية كحيوانات مانحة بهدف إنتاج الأجنة، (استخدمت أبقار المجموعتين 3 و4 في الجزء الأول من التجربة الأولى، وجميع أبقار الجزء الثاني من التجربة الأولى، و4 أبقار أخرى)، واستخدمت 3 مستحضرات مختلفة من هرمون FSH لمقارنة مدى فاعليتها في مؤشرات الإباضة المتعددة ونوعية الأجنة الناتجة. واستخدم هذا الهرمون على شكل مستخلص الغدة النخامية للخنازير والحاوي على نسبة قليلة جداً من هرمون LH (Folltropin) (المجموعتين A وB)، أو بنسبة 50% منه (Pluset) (المجموعتين C وD)، أو بشكل مصل الفرس الحامل (PMSG) الذي يحوي كمية كبيرة من هرمون FSH وقليلة من هرمون LH (المجموعتين E وF). وزعت الأبقار المانحة عشوائياً على 6 مجموعات حسب جرعة الهرمون المحرض الإباضة المتعددة، وكان المتوسط العام لعمرها نحو 56.09±4.40 شهراً، ومتوسط رقم موسمها الإنتاجي 2.61±0.31. أودعت اللوالب CIDR الحاوية على 1.38غ بروجسترون (شركة Pfizer ltd hamilton النيوزلندية) في مهابل أبقار المجموعات الأربع الأولى (A، وB، وC، وD) لمدة 7 أيام وفقاً لتوصيات الشركة الصانعة (استخدمت في المجموعات الأربع الأولى من هذه

التجربة جميع أبقار الجزء الثاني من التجربة الأولى و4 أبقار أخرى، ووزعت بشكل عشوائي)، وحقن الهرمون المحرض للإباضة المتعددة (FSH) في المجموعات الأربع الأولى بدءاً من اليوم 4 حتى اليوم 7 (يوم سحب اللوالب) بفاصل 12 ساعة، بينما حقن الهرمون المحرض (PMSG) في اليوم 9 من الشبق ولمرة واحدة في المجموعتين E وF، وعوملت المجموعات كما يلي:

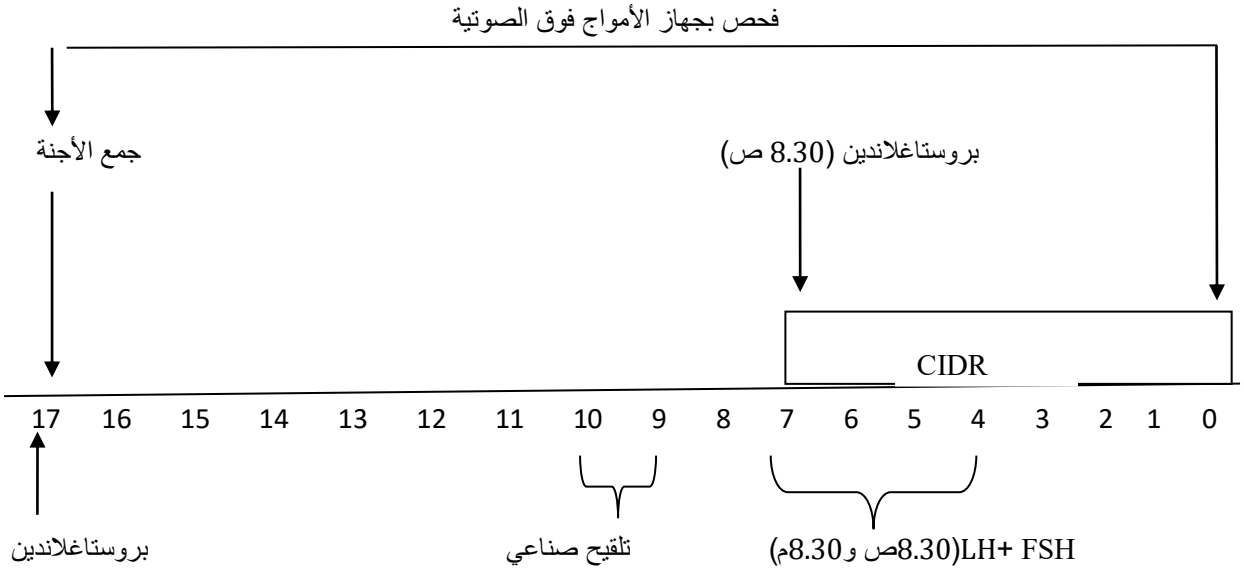
المجموعتين A وB: (المخطط 2.) حقنت أبقار المجموعتين A (n=5) وB (ن=6) عضلياً بـ8 جرعات من هرمون FSH (شركة Bioniche Animal Health الإيرلندية) بجرعة كلية قدرها 400 مغ NIH-FSH-P1 للمجموعة A، و200 مغ NIH-FSH-P1 للمجموعة B (**A:400 مغ:** 4.0، 4.0، 3.0، 3.0، 2.0، 2.0، 1.0، 1.0 مل؛ **B: 200 مغ:** 2.0، 2.0، 1.5، 1.5، 1.0،1.0، 0.5، 0.5 مل). وأعطي GnRH بمعدل 4 مل من مستحضر cystorelin، الذي يعادل 100 ميكروغرام gonadorelin diacetate tetrahydrate (شركة CEVA الفرنسية) بعد نزع اللوالب بـ 36 ساعة.

المجموعتين C وD: (المخطط 3.) حقن 8 جرعات بالعضل بجرعة كلية قدرها 750 وحدة دولية من هرموني FSH وLH (ن=4، ون= 4، على التوالي) (شركة Pluset، إسبانيا).



بروستاغلاندين تلقيح صناعي (8.30م و8.30ص) FSH (8.30ص و8.30م)

المخطط2. يبين بروتوكول الإباضة المتعددة في الأبقار الشامية في المجموعتين A: 400 مغ، وB: 200 مغ من هرمون FSH (FSH: الهرمون المنمي للجريبات المبيضية، CIDR: لوالب بروجسترون زرعت مهبلياً في اليوم0(8.30ص)، ونزعت في اليوم 7(8.30م)، GnRH منشطات المناسل في اليوم 9.



المخطط3. يبين بروتوكول الإباضة المتعددة في الأبقار الشامية التي لقحت صناعياً بعد0، و12 ساعة من ظهور الشبق (المجموعة C)، أو بعد12 و24 ساعة (المجموعةD) (FSH: الهرمون المنمي للجريبات المبيضية، LH هرمون اللوتنة، CIDR: لوالب بروجسترون زرعت مهبلياً في اليوم0(8.30ص)، ونزعت في اليوم 7(8.30م)).

المجموعتين E وF: حقن هرمون PMSG في اليوم التاسع من دورة الشبق (شركة CEVA الفرنسية) قدرها 2000 وحدة دولية (ن=5)، و4000 وحدة دولية (ن=5)، على التوالي (استخدمت أبقار المجموعتين 3 و4 في الجزء الأول من التجربة الأولى ووزعت عشوائياً).

حقن البروستاغلاندين F2α عضلياً بجرعة قدرها 3 مل من مستحضر alfaglandine، الذي يعادل 750 ميكروغرام كلوبروستينول (شركة alfasan الهولندية) قبل 12 ساعة من نزع اللوالب (اليوم7 مساءً) في المجموعات الأربع الأولى، وبعد يومين من حقن هرمون PMSG للمجموعتين الأخيرتين.

فحص كل مبيض يومياً على حدة باستخدام جهاز راسم الصدى (الصورة 1)، ومسح سطحه عدة مرات لمتابعة نمو وتراجع الجريبات والجسم الأصفر ورصدت أقطار الجريبات ≤ 2 مم، طوال فترة الدراسة.

لقحت الأبقار صناعياً مرتين بعد 12، و24 ساعة من ظهور الشبق (الصورة 2) في كافة المجموعات عدا المجموعة C التي لقحت الأبقار فيها صناعياً بعد 0، و12 ساعة من ظهور الشبق باستخدام سائل منوي يتصف بحركة تقدمية للنطاف قدرها 20×10^6 أودع في قرني الرحم. وحددت الإباضة من خلال اختفاء الجريب السائد وتشكل الجسم الأصفر في الموضع نفسه من المبيض (Alvarez وزملاؤه، 2000)، وحددت استجابة الأبقار من البروتوكول المتبع من خلال عدد الجريبات المبيضية (≤8 مم) في يوم التلقيح الصناعي (≤2 جريبة) (الصورة 3)، وعدد الأجسام الصفراء المتشكلة (≤ 15 مم) بعد 4–5 أيام من التلقيح (الصورة 4)، مستخدمين جهاز الأمواج فوق الصوتية لهذا الغرض. جمعت الأجنة بعد 7 أيام من التلقيح باستخدام الطريقة غير الجراحية بواسطة قسطرة ثلاثية الشعب غسل من خلالها الرحم بمحلول الجمع Vigro Complete Flush Solution الحاوي على ملح الفوسفات الواقي Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) ومضافاً له مادة بولي فينيل الكحول polyvinyl alcohol بتركيز 1مغ/مل (شركة Bioniche الأمريكية) بمعدل 350–500 مل لكل قرن رحم ضمن وعاء استقبال مدرج حتى 500 مل، وحقنت الأبقار بعد جمع الأجنة مباشرة بـ2مل من البروستاغلاندينF2α للتخلص من الأجنة الباقية في الرحم إن وُجدت. تركت الأجنة لمدة نصف ساعة حتى ترقد، وأخذ القسم العلوي الذي تمت فلترته بواسطة وعاء فلترة يزيل كافة الشوائب التي قطرها أقل من قطر الجنين بحيث يبقى على الجنين إن وجد فيها ضمن الوعاء، وبعدها بُحث عن الأجنة ضمن الجزء

السفلي وضمن وعاء الفلترة بواسطة المجسام الضوئي stereomicroscope على تكبير 40X (الصورة 5)، وعزلت الأجنة بواسطة ماصة شعرية 10 ميكروليتر، ووضعت في محلول غسيل الأجنة SYNGRO® Holding يحوي على hyaluronan و linear polysaccharide of alternating D-glucaronic acid و N-acetel-D-glucosamine (شركة Bioniche الأمريكية) ضمن أطباق رباعية الحجرات، وصنفت الأجنة وفقاً لمعيار الجمعية العالمية لنقل الأجنة (1998)، وفق مايلي:

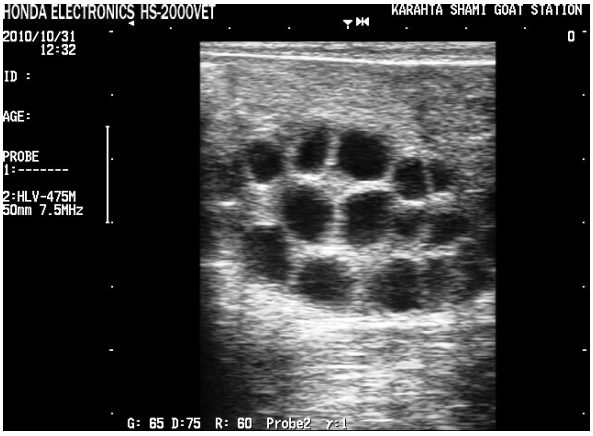
الدرجة الأولى (ممتازة أو جيدة): كتلة الجنين كروية، وخلايا الجنين متماثلة في الحجم واللون والكثافة، غلاف النطاق الشفاف سليماً وخالياً من التشوهات، تحوي 85% على الأقل من كتلة خلوية جنينية منتظمة وقابلة للحياة (الصورتين 6، و7).

الدرجة الثانية (متوسطة): اختلافات متوسطة في حجم خلايا الجنين ولونها وكثافتها، تحوي 50% على الأقل من كتلة خلوية منتظمة وقابلة للحياة (الصورة 8).

الدرجة الثالثة (فقيرة): اختلافات كبيرة في حجم خلايا الجنين ولونها وكثافتها، تحوي 25% على الأقل من كتلة خلوية منتظمة وقابلة للحياة (الصورة 9).

الدرجة الرابعة (ميتة أو متدهورة): كتل خلوية منفصلة ومتباعدة، أو بويضات غير مخصبة، أو عدم وجود انقسام خلوي (الصورة 10).

الصورة 1: فحص المبايض باستخدام جهاز راسم الصدى

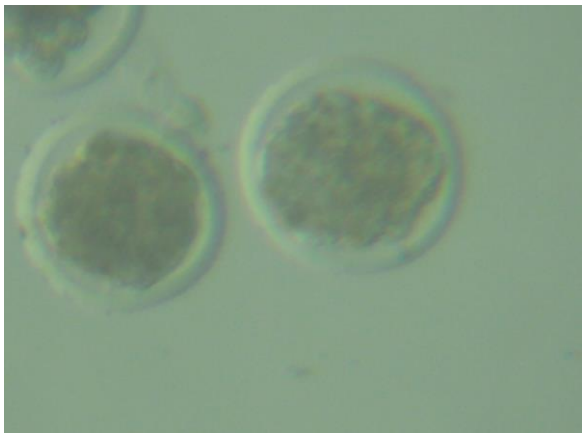


الصورة 2: التلقيح الصناعي في الأبقار الشامية

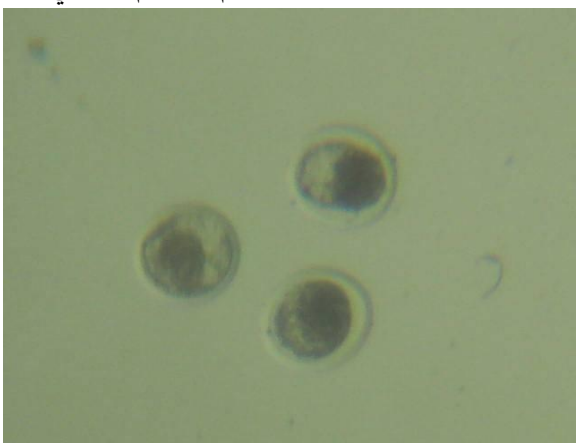
الصورة 3: جريبات محرضة بهرمون الإباضة المتعددة

الصورة 4: أجسام صفراء ناتجة عن انفجار الجريبات المحرضة بالإباضة المتعددة

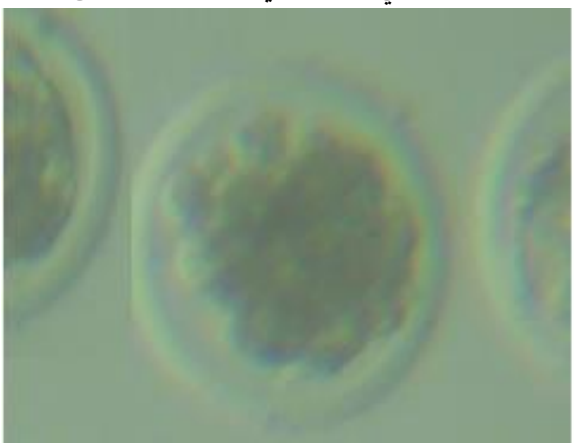
الصورة 5: البحث عن الأجنة باستخدام المجسام الضوئي



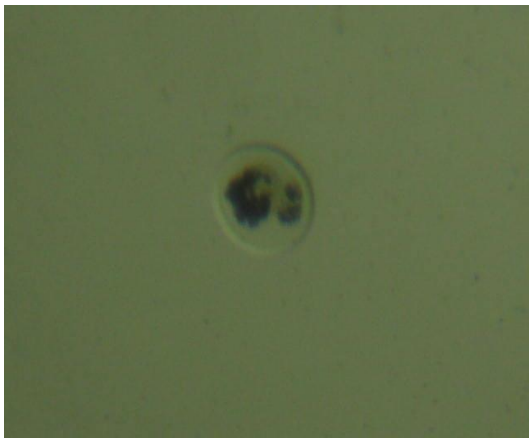
الصورة 6: أجنة في مرحلة التويتة من الدرجة الأولى



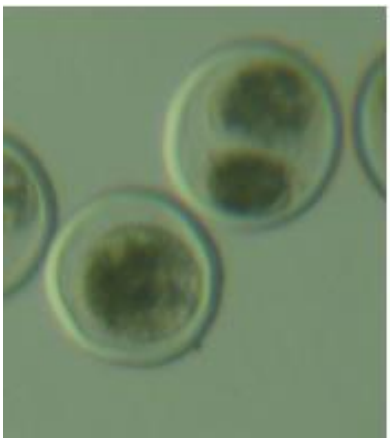
الصورة 7: أجنة في مرحلة الكيس الأرومي



الصورة 8: جنين من الدرجة الثانية



الصورة 9: جنين من الدرجة الثالثة



الصورة 10: أجنة من الدرجة الرابعة

4-3. نقل الأجنة:

نُقلت 5 أجنة طازجة في مرحلة التويتة أو الكيس الأرومي، وجنين مجمد في مرحلة التويتة (وسط التجميد مكون من 10% سيروم دم العجل + 90% PBS أضيف له 16.5% إتيلين غليكول و16.5% داي ميتيل سولفوكسيد و0.5 مول/ليتر سكروز، بينما وسط الإذابة مكون من 10% سيروم دم العجل + 90% PBS) إلى 6 أبقار شامية مستقبلة تمتلك جسماً أصفراً بعمر 7 أيام، إذ عُبئت الأجنة ضمن قشات فرنسية 0.25 مل ضمن الوسط SYNGRO® Holding. نظفت الفتحة التناسلية جيداً بالماء الفاتر، ثم نُشّفت وعُقمت بالكحول 70%. أودعت الأجنة عبر ميل نقل الأجنة إلى منتصف قرن الرحم بجوار المبيض الحاوي على الجسم الأصفر.

4-4. التحليل الإحصائي:

درس تأثير كل من عمر البقرة وبروتوكول تعدد الإباضة في المؤشرات التالية:

عدد الجريبات المبيضية (≤8 مم)، وعدد الأجسام الصفراء، ومعدل الإباضة، وعدد الأجنة والبويضات المجموعة، ونسبة عدد الأجنة والبويضات/عدد الأجسام الصفراء، وعدد البويضات المخصبة، ونسبة

الإخصاب، وعدد البويضات غير المخصبة، وعدد الأجنة القابلة للنقل، ونسبة الأجنة القابلة للنقل%، وعدد الأجنة المتدهورة، ونسبتها.

أخضعت البيانات للتحليل الإحصائي وفقاً للنموذج الخطي العام General Linear Model، حسب توصيف الموديل الإحصائي التالي:

$$Y_{in} = \mu + \alpha_i + \beta(A_{in} - \bar{A}) + \varepsilon_{in}$$

حيث إن:

Y_{in}: الصفة المدروسة (عدد الجريبات المبيضية (≤8 مم)، وعدد الأجسام الصفراء، ومعدل الإباضة، وعدد الأجنة والبويضات المجموعة، ونسبة عدد الأجنة والبويضات/عدد الأجسام الصفراء، وعدد البويضات المخصبة، ونسبة الإخصاب، وعدد البويضات غير المخصبة، وعدد الأجنة القابلة للنقل ونسبتها، وعدد الأجنة المتدهورة، ونسبتها)

μ: المتوسط العام لصفة المدروسة.

α_i: تأثير بروتوكول تعدد الإباضة، i(المجموعات A، وB، وC، وD، وE، وF).

β : معامل انحدار الصفة المدروسة على عمر الحيوان (شهر).

$(A_{in} - \bar{A})$: انحراف عمر الحيوان عن المتوسط العام للعمر.

ε_{tin}: المتبقي (الخطأ العشوائي).

قُدرت المتوسطات بطريقة المربعات الصغرى Least Squares Means مع الانحرافات القياسية (SE)، واستخدمت طريقة Bonferroni لمقارنة المتوسطات، باستخدام حزمة البرامج الإحصائية SAS (version 9) لإجراء عمليات التحليل الإحصائي كافة.

4-5. النتائج:

لم تستجب بقرة واحدة في كل من المجموعات A، وD، وE، وF، وبقرتان من المجموعة B، لبروتوكول تعدد الإباضة المتبع.

أظهرت نتائج التحليل (الجدول 4-1) وجود تأثير معنوي ($p < 0.01$) لمجموعات التجربة في معدل الإباضة، وفي عدد البويضات المخصبة، وفي عدد الأجنة القابلة للنقل، وفي نسبتها، وبمقدار ($p < 0.05$) في عدد الأجسام الصفراء، وعدد الأجنة والبويضات المجموعة، ونسبة الإخصاب، ونسبة الأجنة

المتدهورة. كما يوضح الجدول وجود تأثير معنوي ($p < 0.05$) لانحدار عدد الجريبات المبيضية ≤8مم في عمر البقرة (شهر) إذ كانت قيمة معامل الانحدار 0.25±0.10، وأيضاً وجد تأثير معنوي ($p < 0.05$) لانحدار معدل الإباضة في عمر البقرة (شهر) إذ كانت قيمة معامل الانحدار 0.54±0.20، حيث يؤدي تغير شهر واحد عن متوسط العمر إلى تغير في عدد الجريبات المبيضية بمقدار 0.25 جريبة، وإلى تغير في معدل الإباضة بنحو 0.54%.

الجدول 4-1. تحليل التغاير لتأثير مجموعات التجربة وعمر البقرة (شهر) في مؤشرات الإباضة المتعددة وإنتاج الأجنة للأبقار الشامية.

الصفات المدروسة	متوسط المربعات		
	مصدر التباين		
	العمر/شهر/ (درجة الحرية 1)	المجموعة (درجة الحرية 5)	الخطأ التجريبي (درجة الحرية 16)
عدد الجريبات المبيضية ≤8مم	321.68*(A)	54.93	814.82
معدل الإباضة%	1548.37*(B)	1028.58**	216.84
عدد الأجسام الصفراء	0.41	33.12*	11.44

عدد الأجنة والبويضات المجموعة	0.45	*13.8	4.22
عدد الأجنة والبويضات/عدد الأجسام الصفراء%	10.43	30.68	31.95
عدد البويضات المخصبة	0.90	**11.69	2.32
نسبة الإخصاب%	57.12	*397.14	102.17
عدد البويضات غير المخصبة	0.09	*3.06	0.89
عدد الأجنة القابلة للنقل	1.56	**12.5	0.44
نسبة الأجنة القابلة للنقل%	214.15	**892.46	158.01
عدد الأجنة المتدهورة	0.09	0.86	1.16
نسبة الأجنة المتدهورة %	222.09	*725.42	181.41

* تأثير على مستوى 0.05 ، ** تأثير على مستوى 0.01

قيمة معامل الانحدار (A): 025±0.10، (B): 0.54±0.20

بيّنت النتائج (الجدول4–2) أنه لم يؤثر نوع وحجم جرعة منشط المناسل الحاوي على هرمون FSH يوم التلقيح الصناعي في عدد الجريبات المبيضية (≤8 مم) رغم وجود نزعة في تزايد متوسط العدد مع تزايد حجم الجرعة المستخدمة، فكان متوسط العدد 16.50±2.99، و13.50±2.53، و14.50±2.60، و15.00±3.61، و20.25±7.04، و13.25±4.07 للمجموعات A، وB، وC، وD، وE، وF، على التوالي. وبالمقابل وجد تأثير معنوي بين مجموعات التجربة في عدد الأجسام الصفراء المتشكلة بعد مرور 5 أيام من التلقيح الصناعي فكان متوسط العدد ^{b}11.75±2.32، و^{ba}10.75±1.80، و^{ba}10.50±1.85، و^{b}12.00±2.52، و^{a}6.00±0.71، و^{a}6.50±0.96 للمجموعات السابقة، على التوالي؛ P^{a-b}<0.05)، ونتيجة لهذه الاختلافات وُجد تأثير معنوي في معدل الإباضة بين المعاملات كافة فكان ^{b}70.58±3.59، و^{b}80.34±1.54، و^{b}72.90±2.77، و^{b}81.40±4.30، و^{a}43.54±13.85، و^{ba}61.20±13.94 للمجموعات المدروسة، على التوالي؛ P^{a-b}<0.01)

من جهة أخرى لوحظ تأثير معنوي في كل من عدد الأجنة والبويضات المجموعة (A: 8.75^{c}±1.55، B: 8.00^{cb}±1.08، C: 8.00^{cb}±1.47.، D: 8.76^{c}±1.67، E: 4.25^{a}±0.48، F: 4.50^{ba}±0.65؛ P^{a-c}<0.01) وفي عدد البويضات المخصبة (A: 7.25^{c}±0.95، B: 6.50^{cb}±0.65، C: 5.25^{cb}±1.11، D: 7.00^{c}±1.00، E: 2.75^{a}±0.25، F: 3.75^{ba}±0.25؛ P^{a-c}<0.05)، وفي نسبة الإخصاب (A: 85.10^{b}±5.35، B: 82.32^{b}±3.31، C: 64.70^{a}±3.97، D: 82.14^{b}±3.57، E: 65.42^{a}±3.56، F: 86.67^{b}±8.16؛ P^{a-b}<0.05)، وفي عدد البويضات غير المخصبة (A: 1.50^{ba}±0.65، B: 1.50^{ba}±0.50، C: 2.75^{b}±0.48، D: 1.67^{ba}±0.67، E: 1.50^{ba}±0.29، F: 0.75^{a}±0.48؛ P^{a-b}<0.05)، وفي عدد الأجنة القابلة للنقل (A: 5.50^{d}±0.29، B: 6.00^{d}±0.41، C: 3.50^{c}±0.29، D: 5.67^{d}±0.67، E: 1.50^{a}±0.29، F: 2.50^{b}±0.29؛ P^{a-d}<0.01) وفي نسبة الأجنة القابلة للنقل (A: 66.90^{c}±7.75، B: 76.92^{c}±4.99، C: 46.55^{ba}±5.64، D: 67.06^{c}±4.37، E: 35.83^{a}±6.29، F: 57.92^{cb}±7.92؛ P^{a-c}<0.05)، وفي نسبة الأجنة المتدهورة (A: 21.90^{ba}±6.06، B: 6.70^{a}±3.88، C: 27.08^{cb}±10.42، D: 18.52^{ba}±1.85، E: 45.83^{c}±7.98، F: 33.33^{cb}±5.89؛ P^{a-c}<0.05). وبالمقابل لم يلحظ تأثير معنوي بين المجموعات في كل من عدد الأجنة والبويضات/عدد الأجسام الصفراء% التي راوحت بين 69.79±3.12% و76.52±3.10%، وفي عدد الأجنة المتدهورة التي راوحت بين 0.50±0.29 و1.75±0.85).

كما بينت النتائج (الجدول 4–2) أنه لم يؤثر موعد التلقيح الصناعي (المجموعة C: 0، و12 ساعة بعد الشبق، أو المجموعة D: 12، و24 ساعة) عند استخدام 750 وحدة دولية من هرموني FSH وLH في كل من عدد الأجنة والبويضات المجموعة (8.00±1.08 مقارنة مع 8.67±1.67)، وفي عدد البويضات المخصبة (5.25±1.11 مقارنة مع 7.00±1.00)، وفي عدد البويضات غير المخصبة (2.75±0.48 مقارنة مع 1.67±0.67)، وفي عدد الأجنة المتدهورة (1.75±0.85 مقارنة مع 1.33±0.33)، وفي نسبتها % (27.08±10.42 مقارنة مع 18.52±1.85) في المجموعتين C، وD،

على التوالي. وبالمقابل وجد تأثير معنوي (P <0.05) في كل من نسبة الإخصاب% (64.61±3.88 مقابل 82.27±4.48)، وفي عدد الأجنة القابلة للنقل (3.53±0.26 مقابل 5.63±0.30)، وفي نسبتها (46.41±5.26 مقابل 67.25±5.91) للأبقار الملقحة بعد 0، و12 ساعة (المجموعة C) أو 12، و24 ساعة (المجموعة D) من بدء الشبق.

وفيما يتعلق **بنقل الأجنة** فقد نفقت إحدى البقرات المستقبلة بعد نقل الجنين إليها بـ16 يوماً إذ لم يُتأكد من مدى حملها أم لا، وظهرت حالات الحمل نتيجة لنقل الأجنة (فحصت باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية بعد 25 يوماً من الحمل) في 3 أبقار أرقامها 6330 (ولدت ونفق مولودها بعد أسبوع من ولادته)، و6134 (ولدت مولوداً بصحة جيدة)، و5978 (نفقت وهي حامل بعمر 7 شهر) (الصور 11، 12).

الصورة 11 بقرة شامية مستقبلة حامل بجنين بقرة شامية مانحة أ- حمل بعد نقل الجنين بـ 25 يوماً،

ب: حمل بعد نقل الجنين بـ 35 يوماً.

الصورة 12. ولادة بقرة شامية مستقبلة بطريقة نقل الأجنة زرع فيها جنين من بقرة شامية مانحة.

الجدول 4-2: متوسط ($\bar{X}$ ±SE) مؤشرات الإباضة المتعددة والأجنة القابلة للنقل وفقاً لنوع منشط المناسل وحجم الجرعة في الأبقار الشامية

المؤشرات المدروسة	المجموعة A 400 مغ FSH (4=n)	المجموعة B 200 مغ FSH (4=n)	المجموعة C 750 و.د. ¤ LH وFSH (4=n)	المجموعة D 750 و.د. LH وFSH (3=n)	المجموعة E 4000 و.د. PMSG (4=n)	المجموعة F 2000 و.د. PMSG (4=n)
	وقت التلقيح الصناعي بعد بداية الشبق					
	12-24 ساعة	12-24 ساعة	0-12 ساعة	12-24 ساعة	12-24 ساعة	12-24 ساعة
عدد الجريبات المبيضية ≤8مم	2.99±16.50^{a}	2.53±13.50^{a}	2.60±14.50^{a}	3.61±15.00^{a}	7.04±20.25^{a}	4.07±13.25^{a}
عدد الأجسام الصفراء *	2.32±11.75^{b}	1.80±10.75^{ba}	1.85±10.50^{ba}	2.52±12.00^{b}	0.71±6.00^{a}	0.96±6.50^{a}
معدل الإباضة% **	3.59±70.58^{b}	1.54±80.34^{b}	2.77±72.90^{b}	4.30±81.40^{b}	13.85±43.54^{a}	13.94±61.20^{ba}
عدد الأجنة والبويضات المجموعة *	1.55±8.75^{c}	1.08±8.00^{cb}	1.47±8.00^{cb}	1.67± 8.67^{c}	0.48±4.25^{a}	0.65±4.50^{ba}
عدد الأجنة والبويضات/عدد الأجسام الصفراء% (كفاءة الجمع)	3.48±75.73^{a}	2.44±75.38^{a}	3.10±76.52 ^{a}	2.50±72.97^{a}	1.71±71.13^{a}	3.12±69.79^{a}
عدد البويضات المخصبة *	0.95±7.25^{c}	0.65±6.50^{c}	1.11±5.25^{cb}	1.00±7.00^{c}	0.25±2.75^{a}	0.25±3.75^{ba}
نسبة الإخصاب %*	5.35±85.10^{b}	3.31±82.32^{b}	3.97±64.70^{a}	3.57±82.14^{b}	3.56±65.42^{a}	8.16±86.67^{b}
عدد البويضات غير المخصبة *	0.65±1.50^{ba}	0.50±1.50^{ba}	0.48±2.75^{b}	0.671±1.67^{ba}	0.29±1.50^{ba}	0. 48±0.75^{a}
عدد الأجنة القابلة للنقل في البقرة الواحدة **	0.29±5.50^{d}	0.41±6.00^{d}	0.29±3.50^{c}	0.67±5.67^{d}	0.29±1.50^{a}	0.29±2.50^{b}
نسبة الأجنة القابلة للنقل%*	7.75±66.90^{c}	4.99±76.92^{c}	5.64±46.55^{ba}	4.37±67.06^{c}	6.29±35.83^{a}	7.92±57.92^{cb}
عدد الأجنة المتدهورة	0.75±1.75^{a}	0.29±0.50^{a}	0.85±1.75^{a}	0.33±1.33^{a}	0.25±1.25^{a}	0.25±1.25^{a}
نسبة الأجنة المتدهورة % *	6.06±21.90^{ba}	3.88±6.70^{a}	10.42±27.08^{cb}	1.85±18.52^{ba}	7.98±45.83^{c}	5.89±33.33^{cb}

تشير الأحرف المختلفة ضمن السطر الواحد إلى وجود فرق معنوي *: على مستوى 0.05، **: على مستوى 0.01. ¤و.د. وحدة دولية.

4-6. المناقشة:

تتأثر استجابة مبايض الأبقار لبرنامج الإباضة المتعددة بنوع المستحضر (FSH، أو FSH/LH، أوPMSG)، وبكمية الجرعة المستخدمة، وبوقت التلقيح الصناعي، وبإضافة بعض الهرمونات إلى بروتوكول العمل (Mapletoft وزملاؤه، 2002). وأظهرت نتائج الدراسة أنه رغم معاملة الأبقار الشامية بمستحضرات ومستويات مختلفة من هرمون FSH إلا أن ذلك لم يؤثر معنوياً في **عدد الجريبات المبيضية** (≤8 مم) يوم التلقيح الصناعي مع ملاحظة زيادة هذا العدد عند حقن جرعة 4000 وحدة دولية (و. د.) من هرمون PMSG، وكان المتوسط في المجموعتين A، وB قريب مما أشار إليه Souza وزملاؤه (2007) في بكاكير الهولشتاين (16.8±1.6: 400 مغ، 12.9±1.2: 200 مغ) في ولاية ويسكونسن الأمريكية.

من جهة أخرى كان **عدد الأجسام الصفراء** في هذه الدراسة أقل مايمكن في الأبقار المعاملة بهرمون PMSG (المجموعتين E، وF) مقارنة مع المجموعات الأربع الأولى التي كان العدد فيها متقارباً رغم اختلاف المعاملة. كما وُجد أن متوسط العدد في المجموعة B (200 مغ: 10.75) أقل مما وجده Baruselli وزملاؤه (2003) في أبقار النيلور عند تطبيق برنامج الإباضة المتعددة التي كانت 13.0، و12.1، و14.9 في المجموعات المحقونة بـ100، و133، و200 مغ من هرمون FSH (Folltropin-V) على التوالي، ووجد Ali وزملاؤه (2012) في الأبقار المحلية (بنغلادش) أن عدد الأجسام الصفراء قد اختلف باختلاف جرعة هرمون FSH المحقونة (200 مغ FSH: 8.60±0.60، 280 مغ FSH: 13.60±0.51، 360 مغ FSH: 14.00±0.71)، بينما وجد Son وزملاؤه (2007) في الأبقار الكورية المحلية أن عدد الأجسام الصفراء كان نحو 10.6±1.5، 10.0±1.3 عند حقن الأبقار بـ28، و24 مغ وحدة آرمور قياسية من هرمون FSH النقي على التوالي، وبالمقابل كان عدد الأجسام الصفراء في المجموعتين A، وB نحو 11.75، و10.75، وهو قريب منه في بكاكير الهولشتاين (11.8 و10.2) عند مجموعتي 400 و200 مغ NIH-FSH-P1، على التوالي (Souza وزملاؤه، 2007)، بينما كان متوسط

العدد في الأبقار الشامية المحقونة بـ750 وحدة دولية من هرموني FSH، وLH نحو 11.25، وهو قريب مما وجده Ribeiro Filho وزملاؤه (2004) في أبقار الزيبو عند حقنه 250 وحدة دولية من Pluset (FSH/LH) وتراوح بين 8.50، و11.80، ووجد Yaakub وزملاؤه (1998) أن عدد الأجسام الصفراء في أبقار اللحم كان 11.7، و15.8، و18.0 عند حقنه بـ 400، و600، و800 وحدة دولية من مستحضر Pluset، على التوالي. وكان العدد في المجموعتين الأخيرتين لهذه الدراسة نحو6.00، 6.50، وهو أقل مما وجده Alfuraiji وزملاؤه (1993) في أبقار اللحم عند حقنها بـ 2000 و.د.: 9.4، و4000 و.د.: 9.3 من هرمون PMSG، وما وجده Gonzalez وزملاؤه (1994) عند إعطاء أبقار الهيرفورد 1200، و2400، و3600 و.د. فكان متوسط العدد نحو 3.6±0.8، و8.6±1.8، و18.1±4.8، على التوالي.

وجدت اختلافات ($p<0.01$) في **معدل الإباضة** بين المجموعات التي حقنت بـFSH ونظيراتها التي حقنت بـPMSG نتيجة للاختلافات في عدد الجريبات المبيضية الكبيرة وفي عدد الأجسام الصفراء، فكانت أقل مايمكن في المجموعتين الأخيرتين المحقونتين بـPMSG وخاصة في المجموعة E، وكانت النتائج في المجموعتين A، وB (~70% و80%) متقاربة مع ما وجده Souza وزملاؤه (2007) في بكاكير الهولشتاين من أن معدل الإباضة كان نحو 72.6% عند حقن 400 مغ NIH-FSH-P1 من هرمون FSH و77% عند حقن 200 مغ NIH-FSH-P1، بينما كان متوسط معدل الإباضة للأبقار الشامية المحقونة بمستحضر Pluset نحو 76.55%، أما بالنسبة للمجموعتين الأخيرتين لوحظ وجود انخفاض في معدل الإباضة مقارنة مع بقية المجموعات وخاصة في المجموعة E، وكان هذا المعدل في المجموعتين E، وF قريباً مما وجده Martins وزملاؤه (2006) في أبقار النيلور (58.4%) بعد حقنها بـ2000 و.د. من هرمون PMSG، ووجد Gonzalez وزملاؤه (1994) أن إعطاء أبقار الهيرفورد 1200، و2400، و3600 و.د. من هرمون PMSG سبب الحصول على معدل إباضة قدره 60، و51، و59%، على التوالي.

تبين من هذه الدراسة وجود نزعة في تزايد عدد الجريبات المبيضية (≤2مم) وتناقص في معدل الإباضة مع زيادة جرعة هرمون FSH سواء عند استخدامه بشكل نقي أو على شكل هرمون PMSG، وهذا يوافق ماذكره Callensen وزملاؤه (1987) وKanitz وزملاؤه (2002) من وجود ارتباط بين الجرعات العالية من هرمون FSH وقلة معدلات الإباضة. وبشكل مخالف لهذه الدراسة بيّن Willmott وزملاؤه (1990) أن وجود هرمون LH مع FSH في المستحضر التجاري ينقص في معدلات الإباضة، وعلل بعض الباحثين قلة معدلات الإباضة مع زيادة عدد الجريبات المبيضية الكبيرة في برامج الإباضة المتعددة إلى قلة نسبة ارتفاع هرمون LH مقارنة مع هرمون FSH و/أو نقص عدد الجريبات المبيضية التي انفجرت بعد ارتفاع هرمون LH (Stock وزملاءه، 1995؛ Kanitz وزملاؤه، 2002). ومن المستبعد حدوث أي نقص في ارتفاع هرمون LH في المجموعتين A، وB بسبب حقن أبقار هاتين المجموعتين بـ GnRH قبل التلقيح بـ12 ساعة، كما أن المجموعتين C، وD حقنت بمستحضر يحوي على عدد متماثل من الوحدات الدولية لكل من هرموني FSH و LH، ويمكن تفسير نقص معدلات الإباضة إلى عدم قدرة الجريبات المبيضية على الانفجار الذي قد يعزى بدوره إلى نقص في عدد المستقبلات الخاصة بمنشطات المناسل المبيضية، وتعمل سلسلة إحداث الإباضة ovulation cascade على زيادة كبيرة في تركيز هرمون LH وتحدث ثقباً في جدار الجريبة المبيضية وتحرر البويضة الناضجة (Gonçalves وزملاؤه، 2010) حيث يؤدي أي نقص في بعض أجزاء السلسلة في الجريبات المبيضية المحرضة بهرمون FSH إلى نقص معدل الإباضة (Richards، 2005). ومن غير المحتمل أنه حدث نمو لكافة الجريبات المبيضية في الموجة المبيضية التي بلغ عدد جريباتها المبيضية (≤2مم) نحو 27.12 و26.6 جريبة للمجموعتين الأولى والثانية على التوالي، بينما راوح العدد في بكاكير الأبقار الشامية البالغة بين 19–27 (الدكاك، 2008)، وقريبة مما وجده Ginther وزملاؤه (1996) (24 جريبة≤ 3مم).

لوحظ وجود عدد كبير من الجريبات المبيضية الكبيرة التي لم يحدث لها إباضة نتيجة الحقن بهرمون مصل دم الفرس الحامل، وقد يعود ذلك إلى أن الجريبات الكبيرة تفرز مستويات عالية من هرموني الإستراديول والبروجسترون تعيق الإباضة وتؤثر سلباً في تطور الأجنة (Dieleman وزملاؤه، 1993). ووجد الدكاك (2008) أن مستويات تركيز هرمون الإستراديول في عجلات الأبقار الشامية خلال دورة الشبق كانت أعلى من مستوياته في عروق أخرى، وبالتالي فإن وجود عدد كبير من الجريبات الكبيرة يساهم في حدوث زيادة إضافية في مستوى هرمون الإستراديول وقد تؤثر سلباً على المحور الدماغي النخامي، مما يقلل من إفراز الهرمونات المنشطة للمناسل ويحول دون وصولها إلى مستويات عالية تساعد في إنضاج الجريبات وحدوث الإباضة. ووجد Sudano وزملاؤه (2009) أن معاملة أبقار النيلور بهرمون مصل دم الفرس الحامل يسبب مستويات غير طبيعية في كل من الإستراديول، والبروجسترون، وهرمون LH. وعند حقن هرمون PMSG في الأبقار يُفرَز في الدم أجساماً مضادة تعيق من عمله، وتسبب انخفاضاً في معدلات الإباضة (Alfuraiji وزملاؤه، 1993)، وذكر Gonzalez وزملاؤه (1994) أن إعطاء أبقار الهيرفورد نحو 2500 و.د. من هرمون مصل دم الفرس الحامل أحدث معدل إباضة قدره 55.8%، ولكنه ارتفع إلى نحو 87.9، و88.5% عند حقن الأبقار بمضاد هرمونPMSG بعد 48، و60 ساعة من حقن البروستاغلاندينF2α، على التوالي.

صنّفت البويضات الملقحة ذات الخلية الواحدة على أنها غير مخصبة (Hasler، 1992؛ Souza وزملاؤه، 2007؛ Malhi وزملاؤه، 2007)، وكان **عدد الأجنة والبويضات المجموعة** في الأبقار الشامية المحقونة بهرمون FSH النقي أعلى منها (P <0.05) في الأبقار المحقونة بهرمون PMSG، وراوح هذا العدد بين 8.00، و8.75 في المجموعات الأربع الأولى. لا يتوافق عدد الأجنة والبويضات المجموعة في المجموعتين A، وB مع ما وجده Souza وزملاؤه (2007) في بكاكير الهولشتاين (400 مغ: 5.4±0.8، 200 مغ: 4.9±1.0). لم يؤثر وقت التلقيح الصناعي للأبقار الشامية المعاملة هرمونياً

(FSH/LH) في عدد البويضات والأجنة المجموعة (بعد 0 و12 ساعة: 8.00±1.47؛ بعد 12 و24 ساعة: 8.67±1.67)، وهذه النتيجة متقاربة مع ما وجده Sales وSouza (2005) في أبقار الهولشتاين (بعد 0، و12 ساعة: 8.16؛ بعد 12، و24 ساعة: 6.31) عند حقنها بـ500 وحدة دولية من هرمون FSH (Pluset). وكان عدد البويضات والأجنة المجموعة في الأبقار الشامية المعاملة بهرمون PMSG (4000 و.د.: 4.25، 2000 و.د.: 4.50) وهو أقل مما وجده Alfuraiji وزملاؤه (1993) في أبقار اللحم (5.6، 7.1) عند حقنها بـ 4000، و2000 و.د. من هرمون PMSG، على التوالي. وأقل مما وجده أيضاً Gonzalez وزملاؤه (1994) في أبقار الهيرفورد (2400 و. د.: 5.4±0.9؛ 3600 و.د.: 12.0±1.6).

كان **عدد البويضات المخصبة** في المجموعات الأربع الأولى المحقونة بـFSH بشكل عام أعلى منه في المجموعتين الأخيرتين المحقونة بـPMSG، وكان هذا العدد في المجموعة الأولى (7.25) والثانية (6.50) أعلى مما وجده Souza وزملاؤه (2007) في بكاكير الهولشتاين (400 مغ: 3.9±0.8، 200 مغ: 4.3±1.0)، وبالرغم من أن عدد البويضات المخصبة كان في المجموعة الرابعة أعلى ظاهرياً من المجموعة الثالثة إلا أنه لم يكن معنوياً، بينما وجد Sales وSouza (2005) في أبقار الهولشتاين أن عدد البويضات المخصبة بعد حقنها بـ(FSH/LH) كان 7.51 عند تلقيحها بعد 0، و12 ساعة من بدء الشبق، و5.62 جنيناً بعد 12، و24 ساعة من بدء الشبق، بينما كانت هذه القيم في بكاكير الهولشتاين نحو 5.77، و8.53 على التوالي، أما بالنسبة لهرمون PMSG فقد وجد Gonzalez وزملاؤه (1994) أن حقن أبقار الهيرفورد به أدى إلى الحصول على عدد أكبر من الأجنة المخصبة التي حصلنا عليها (2400 و. د.: 4.8±0.7؛ 3600 و.د.: 5.0±1.1).

وفيما يتعلق **بالبويضات غير المخصبة** فقد تراوح متوسط عددها بين 0.75، و2.75. ووجد Souza وزملاؤه (2007) في بكاكير الهولشتاين أن عدد البويضات غير المخصبة كان أعلى وبصورة معنوية

(p <0.05) عند البكاكير المعاملة بـ 400 مغ من هرمون FSH (1.60±0.5) مقارنة مع البكاكير المعاملة بـ200 مع منه (0.60±0.2)، ولوحظ وجود زيادة ظاهرية لأبقار المجموعة الثالثة في عدد البويضات غير المخصبة وربما يعزى ذلك إلى أن التبكير في التلقيح ووجود العديد من الجريبات المبيضية التي تأخرت بتحرر البويضات منها إضافة إلى عدم تزامن الوصول إلى موقع الإخصاب بين الحيوانات المنوية الإخصابية وبين البويضات المتأخرة، ووجد Sales وSouza (2005) في أبقار الهولشتاين أن عدد البويضات غير المخصبة بعد حقنها بـ(FSH/LH) كان 1.00، و0.81 بعد تلقيحها مرتين بعد 0 و12، أو بعد 12 و24 ساعة من بداية الشبق.

أما **نسبة الإخصاب** فقد راوحت في المجموعات الست المدروسة بين 65 و87% فكانت أقل مايمكن في المجموعتين C، وE، ويمكن عزو ذلك إلى أن الأبقار في المجموعة C أجري التلقيح الصناعي فيها بشكل مبكر مترافقاً مع حدوث نقص في عدد البويضات المخصبة، أما في المجموعة E فيعود السبب إلى قلة عدد الإباضات الحاصلة وفقر نوعية البويضات الناتجة إضافة إلى قلة عدد البويضات المخصبة، وبدت نتائج هذه الدراسة والمتعلقة بنسبة الإخصاب مقبولة مقارنة مع نتائج Souza وزملاؤه (2007) في بكاكير الهولشتاين (74.7%: 400مغ NIH-FSH-P1، 86%: 200مغ NIH-FSH-P1)، بينما وجد Quaresma وزملاؤه (2003) أن نسبة الإخصاب في أبقار الميرتولينجا Mertolenga كانت نحو 92.2% عند معاملتها بـ400 مغ NIH-FSH-P1، ونحو 32.3% عند المعاملة بـ36 مغ وحدة آرمور قياسية). وتوافق نتائج هذه الدراسة المتعلقة بتأثير موعد التلقيح في نسبة الإخصاب مع ماوجده Dalton وزملاؤه (2000) من حدوث زيادة في معدل الإخصاب عند تلقيح أبقار الفريزيان بعد 24 ساعة (81%) من بدء الشبق مقارنة مع 0 ساعة (29%)، أو 12 ساعة (60%)، وعزوا ذلك الاختلاف بسبب التنافس الكبير بين النطاف للوصول إلى موقع الإخصاب واستنزاف قدرتها الإخصابية في حال وصولها إلى مكان الإخصاب قبل الإباضة، وبين Kishida وزملاؤه (2004) أن كل الإباضات في أبقار الحليب تحدث

خلال الـ11 ساعة التي تلي أول إباضة بينما وجد Yadav وزملاؤه (1986) أن كل الإباضات في عجلات اللحم المعاملة بالإباضة المتعددة تحصل خلال الـ37 ساعة من بدء الشبق، ووجد Hunter (1980) أن فترة النشاط الحيوي للنطاف في الجهاز التناسلي الأنثوي هي 24 ساعة، وأن تهيئة النطاف تستغرق من 4–6 ساعات، بينما يكون الوقت المثالي لإخصاب البويضة أقل من 10 ساعات (Brackett وزملاؤه، 1980)، وبشكل مخالف لهذه الدراسة لم يؤثر وقت التلقيح الصناعي بعد الشبق بمعدل الإخصاب في أبقار الفريزيان (Sales وSouza، 2005)، إذ وجد أن التلقيح بعد 0، و12، أو بعد 12، و24 ساعة من الشبق يكفي لتهيئة النطاف ووصولها إلى البويضة وهي نشطة وفعالة. ووجد Dalton وزملاؤه (2000) أن التلقيح الصناعي بعد 24 ساعة من بدء الشبق لأبقار الهولشتاين يزيد من نسبة احتواء الأجنة على نطافٍ مساعدة، ويقلل من عدد النطاف المتدهورة، ويزيد من حياتها الوظيفية مقارنة مع التلقيح بعد 0 أو 12 ساعة. أما نسبة الإخصاب في المجموعتين E، وF فبلغت نحو 65، و87%، على التوالي، بينما وجد Gonzalez وزملاؤه (1994) في أبقار الهيرفورد أن نسبة الإخصاب كانت نحو 72، و89، و41% عند معاملتها بـ1200، و2400، و3600 و.د. من هرمون PMSG، على التوالي. وأشارت بعض الدراسات أن المستويات العالية من هرمون FSH تؤدي إلى نقص في معدل الإخصاب (Donaldson وWard، 1986) كما أنه لا يؤثر وجود هرمون LH مع هرمون FSH في نسبة الإخصاب (Lindsell وزملاؤه، 1986)، وأوضح Donaldson (1984) وجود ارتباط سلبي بين معدلات الإخصاب ومحتوى هرمون LH في المستحضر الحاوي على هرمون FSH.

كان **عدد الأجنة القابلة** للنقل في المجموعات المحقونة بهرمون FSH النقي أعلى منها في المجموعتين المعاملتين بهرمون PMSG، وكان عددها في المجموعتين A:(5.50)، وB:(6.00) أعلى مما وجده Souza وزملاؤه (2007) في بكاكير الفريزيان (2.3: 400 مغNIH-FSH-P1 من هرمون FSH ، 3.3: 200 مغ)، ووجد Ali وزملاؤه (2012) في الأبقار المحلية (بنغلادش) أن عدد الأجنة القابلة للنقل كانت أعلى مايمكن عند إعطائها جرعة 280 مغNIH-FSH-P1 من هرمون FSH (200

مغ FSH: 3.20±0.20، 280 مغ: 6.00±0.32، 360 مغ FSH: 4.40±0.68)، بينما وجد Baruselli وزملاؤه (2003) أن هذا العدد عند أبقار النيلور كان (7.7: 100 مغ NIH-FSH-P1، 5.6: 133 مغ، 6.5: 200 مغ)، ولم يلحظ Nilchuen وزملاؤه (2011) في أبقار Kamphaeng Saen (عرق لحم) وجود فرق معنوي سواء عند تحريضها بـ 200مغ NIH-FSH-P1 (4.00) أوبـ250مغ منه (4.00)، بينما بلغ 2.33 في أبقار الشيورفا Cheurfa عند إعطاءها 40 مغ pFSH منه (Mustapha وزملاؤه، 2008)، وعزي السبب في انخفاض المؤشرات الخاصة بالإباضة ونوعية الأجنة مع زيادة مستويات هرمون FSH المنمي للجريبات المبيضية إلى زيادة مستوى هرمون الإستراديول قرب الإباضة (Kanitz وزملاؤه، 2002) أو انخفاض في نوعية البويضات بسبب تهدم الغلاف النووي للبويضة قبل أوانه (Revah وButler، 1996)، أو التحريض الزائد للجريبات المبيضية (Alfuraiji وزملاؤه، 1993). وأوضح Souza وزملاؤه (2007) أن زيادة جرعة هرمون FSH يمكن أن تؤثر سلباً في نوعية البويضات أو على بيئة الجهاز التناسلي مما يؤدي إلى نقص في معدلات الإخصاب وربما يؤثر سلباً في تطور الأجنة.

وبالمقابل ازداد عدد الأجنة القابلة للنقل (P <0.05) في المجموعة D مقارنة مع المجموعة C (C: 3.50±0.29، D: 5.67±0.67). وبالعكس من ذلك وجد Sales و Souza (2005) أن عدد الأجنة القابلة للنقل في أبقار الهولشتاين المعاملة بـ500 وحدة دولية من هرمون FSH كان نحو 6.33 بعد تلقيحها صناعياً بفترة 0، و 12 ساعة وتناقص العدد بشكل معنوي (P <0.05) إلى نحو 5.18 بعد تلقيحها بفترة 12، و24 ساعة من بدء الشبق. توافق نتائج هذه الدراسة ماوجده Donaldson (1985) من أن عدد الأجنة ذات الحيوية العالية تكون أعلى مايمكن بعد تلقيح الأبقار بـ12 و24 ساعة من بدء الشبق. وبين Sales وSouza (2005) أن حيوية الأجنة بعد 0، و12 ساعة من التلقيح تكون أقل في العجلات من الأبقار بسبب أن بيئة الرحم في العجلات تملك وقتاً غير مناسب لتهيئة النطاف ونضجها. كان عدد الأجنة القابل للنقل في المجموعة F (2.50±0.29) أكبر منه في المجموعة E (1.50±0.29)،

وهو أقل بكثير مما وجده Martins وزملاؤه (2006) عندما حقنت أبقار النيلور بـ 2000 و2500 و.د. من هرمون PMSG الذي بلغ عدد الأجنة القابلة للنقل نحو6.9±1.0، 4.4±0.7. ووجد Gonzalez وزملاؤه (1994) أن عدد الاجنة القابلة للنقل كان 2.1±1.0 عند إعطاء أبقار الهيرفورد 2500 و.د. من هرمون PMSG، وارتفع هذا العدد إلى 4.0±1.6، و5.3±1.3 بعد حقنها بمضاد هرمون PMSG بنحو 48، و60 ساعة من إعطاء البروستاغلاندينF2α . ووجد Supriatna وزملاؤه (1998) أن إعطاء 2500 و.د. من هرمون PMSG في أبقار الحليب كان عدد الأجنة القابل للنقل 2.4 وارتفع إلى 9.6 عند حقنها بمضاد هرمون PMSG.

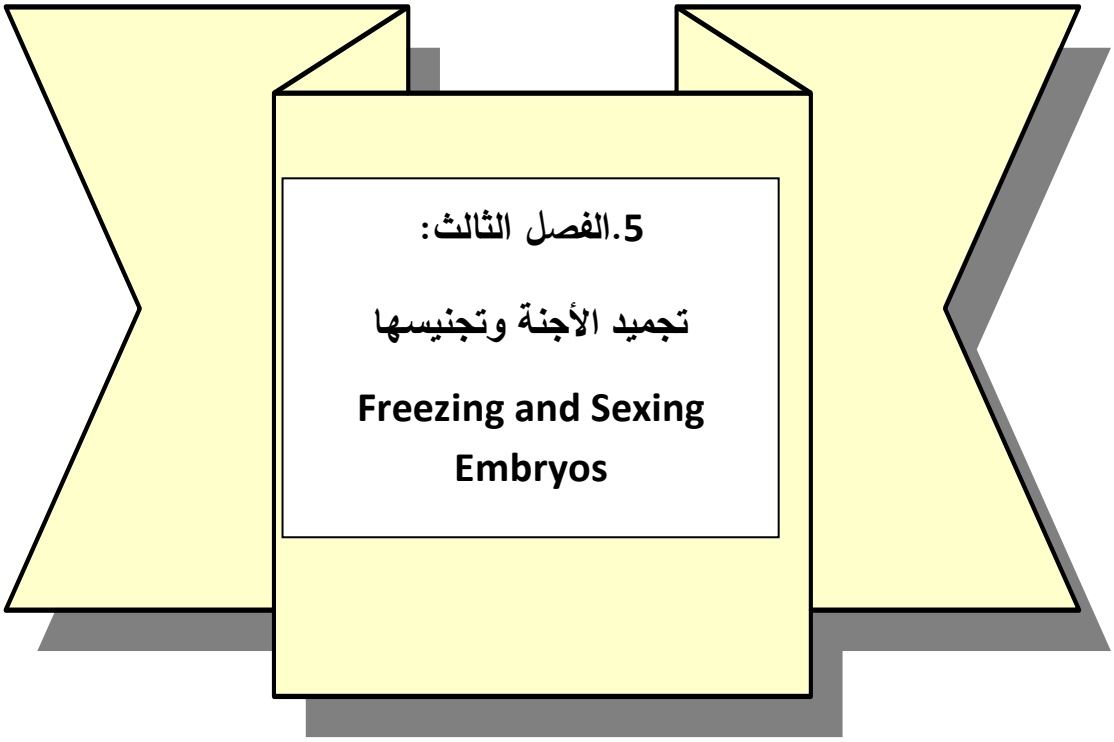
بالرغم من أن نوع المعاملة أعطى نتائج متباينة في **عدد الأجنة المتدهورة** إلا أنه لم يكن هناك فرق معنوي بينها، ولم يؤثر موعد التلقيح الصناعي في عدد الأجنة المتدهورة في الأبقار الشامية، وهذا يوافق ما وجده Sales وSouza (2005) من أن وقت التلقيح بعد 0، و12 أو بعد12، و24 ساعة من بدء الشبق لم يؤثر في عدد الأجنة المتدهورة والكلية لأبقار الهولشتاين بسبب وجود عدد كاف من النطاف المهيئة في موقع الإخصاب (الأمبولا)، ومع ما وجده Donaldson (1985) من أن تلقيح الأبقار بعد 12 ساعة من الشبق لايؤثر على عدد الأجنة المتدهورة مقارنة مع تلقيحها بعد 24 ساعة من الشبق. وبالعكس من ذلك وجد Schiewe وزملاؤه (1987) في أبقار اللحم، وDalton وزملاؤه (2000) في أبقار الهولشتاين زيادة في عدد الأجنة المتدهورة مع حدوث تأخر بالإخصاب عند التلقيح المبكر وعللوا ذلك بأن البويضة المنفجرة مبكراً تكبر بالعمر قبل اكتمال انتقال النطاف والإخصاب. وبيَّن Sales وSouza (2005) أن الإباضات التي تحصل متأخرة تسبب زيادة في عدد الأجنة المتدهورة بسبب التفاعلات بين النطاف والرحم، أو بسبب أن البويضات التي تخصب أبكر يمكن أن تصرف وقت أكثر لتتأقلم مع بيئة الرحم. وراوحت نسبة الأجنة المتدهورة في الأبقار المعاملة بهرمون مصل الفرس الحامل بين 33.3، و45.8% وهي نسبة مرتفعة، وربما يعزى ذلك إلى أن نصف عمر هرمون PMSG يكون كبيراً في الدم بعد حقنه بما يؤثر سلباً في نوعية الأجنة عن طريق زيادة مستويات هرمون الإستراديول، أو

زيادة نشاط هرمون LH التي تسبب انفجار الجريبات النامية قبل أوانها، أو تكيسها مبكراً، أو أن تحدث اضطراباً في اصطناع الهرمونات الجنسية في المبيض، أو خللاً في نضج البويضة (Greve وزملاؤه، 1995)، وتشير بعض الدراسات المتعلقة بنوعية الأجنة (نسبة التدهور، نسبة الأجنة القابلة للنقل، عدد الأجنة القابلة للنقل) أن معاملة الأبقار بالجرعة الأقل من هرمون FSH تعطي نتائج ظاهرية أفضل بالرغم من عدم وجود تأثير معنوي (Souza وزملاؤه، 2007 ؛ Kanitz وزملاؤه ،2002).

أشار Barros وزملاؤه (2003)، وBarati وزملاؤه (2006) أن كمية هرمون FSH التي تعطى للأبقار في برامج الإباضة المتعددة تكون أعلى بمقدار 30–50% في العروق الأوربية منها في العروق الهندية، وعلل بعضهم ذلك إلى صغر حجم التراكيب المبيضية (الجريبات المبيضية والجسم الأصفر) في عروق الزيبو مقارنة مع العروق الأخرى (Figueiredo وزملاؤه، 1997)، وفيما يتعلق بهذه الدراسة فقد استخدمت الجرعة الموصى بها عند استخدام (FSH/LH) وبالتالي نوصي باستخدام جرعات مختلفة من هذا المستحضر.

وفي الخلاصة نجد أن الأبقار الشامية لا تختلف عن غيرها من العروق في استجابتها للمعاملة الهرمونية بهدف الإباضة المتعددة وإنتاج الأجنة، كما أنه يمكن التحكم في بدء ظهور الموجة المبيضية في الأبقار الشامية من خلال إيداع اللوالب المحتوية على هرمون البروجسترون داخل المهبل، ويمكن

تقليل كمية هرمون FSH إلى (200 مغ) في برنامج الإباضة المتعددة دون أن يؤثر سلباً على أي من المؤشرات المدروسة، بل يعطي تحسناً ظاهرياً في عدد الأجنة ونوعيتها مقارنة مع (400 مغ) وهذا بالطبع ينقص من تكاليف المعالجة، وأن معاملة الأبقار الشامية بجرعتين مختلفتين من هرمون PMSG يقود إلى انخفاض في عدد الأجسام الصفراء ومعدل الإباضة، وبالرغم من أن تقليل كمية الهرمون بمقدار 50% يزيد من عدد الأجنة القابلة للنقل في برنامج الإباضة المتعددة إلا أن هذا العدد يبقى دون المستوى المطلوب، لذلك ينصح بعدم استخدام هذا الهرمون لوحده في برنامج الإباضة المتعددة، كما استنتج أن أفضل وقت للتلقيح الصناعي في الأبقار الشامية عند استخدام برامج الإباضة المتعددة وانتاج الأجنة يكون بعد 12، و24 ساعة من بدء الشبق وذلك لزيادة نسبة الإخصاب والحصول على أكبر عدد ممكن من الأجنة الحيوية القابلة للنقل، واستنتج أيضاً إمكانية نجاح تقانة نقل الأجنة في الأبقار الشامية كبقية عروق الأبقار الأخرى.



5-1. مقدمة:

ازداد انتشار حفظ الأجنة بالتجميد في السنوات الأخيرة لكون معدلات بقاءها مقبولة بعد الإذابة (Shaw وزملاؤه، 2000)، وتوجد طريقتان لتجميد الأجنة: التجميد التقليدي classical freezing والتزجيج

vitrification. يحدث التجميد التقليدي أضراراً مختلفة للأجنة، إذ تتشكل بلورات ثلجية داخلية وخارجية تحدث أضراراً مختلفة خلال التجميد لقنوات الاتصال بين خلايا الطبقة المغذية Trophoblast (Tb)، وفي أغلفة المتقدرات الحيوية، والأغشية والبلازما النووية، وتكسرٍ في الغلاف الشفاف، وأضراراً سيتوبلازمية. وهذا يقود لانخفاض العدد الكلي للخلايا وتراكم البقايا الخلوية في الفراغ المحي وموت خلايا الكتلة الداخلية (Kaidi وزملاؤه، 2001). استخدمت طريقة التزجيج (تبريد عالي السرعة باستخدام تراكيز مرتفعة من موانع التجميد) لتجميد الأجنة والتغلب على قلة حيويتها بعد عملية التجميد حيث تقود لتغير شكلي للأجنة دون تشكل بلورات ثلجية (Massip وزملاؤه، 1995). وقسّمت موانع التجميد إلى نوعين: **نفوذة** (تدخل إلى خلايا الأجنة) مثل الغليسرول، وداي ميثيل سولفوكسيد dimethyl sulphoxide (DMSO)، وايثلين غليكول، و1، 2 البروبانيدل، **وغير نفوذة** (لاتدخل إلى خلايا الأجنة) مثل السكروز واللاكتوز والغلوكوز (JLTA، 1995).

يمكن أن يسبب التجميد بعض التغيرات الاستقلابية داخل الخلايا الجنينية للكيس الأرومي مثل انخفاض عام في المواد الغذائية واستقلابها في الخلايا (Khurana و Niemann، 2000) إضافة إلى عدم انتظام الغلاف الداخلي للمتقدرات الحيوية (Gardner وزملاؤه، 1996)، ويمكن أن تعمل الأجنة في هذه الحالة على التعويض بزيادة التحلل السكري (Rieger وزملاؤه، 1993).

يفيد تحديد جنس المولود قبل نقله في الأبقار في تحسين القدرة الوراثية الكامنة في القطيع، وعادة نستطيع الحصول على 6–8 مواليد خلال الحياة التناسلية للأبقار، ومن الممكن زيادة عدد الأجنة المستحصل عليها عن طريق تطبيق تقانة الإباضة المتعددة ونقل الأجنة. وفي حال جنّست الأجنة قبل نقلها، يمكن الحصول على الجنين المفضّل من الأبقار ذات القدرة الوراثية المتميزة، الأمر الذي يزيد من الفاعلية الاقتصادية لبرامج نقل الأجنة (Willett وHillers، 1994)، ومن معدل الربح الوراثي للقطيع

(Colleau، 1991)، وبالتالي تسريع وتيرة التحسين الوراثي للأنواع الحيوانية (Lopatarova وزملاؤه، 2008).

استخدمت العديد من الطرق لتحديد الجنس في الحيوانات كالتحاليل الوراثية الخلوية cytogenetic analysis (Rall وLeibo، 1987)، والمقايسة المناعية immunological assay (Booman وزملاؤه، 1989)، وتحديد الاختلافات الاستقلابية metabolic differences بين أجنة الذكور والإناث (Monk وHandyside، 1988)، وتحليل الاختلافات في معدلات الانقسام cleavage rates (Avery وزملاؤه، 1989)، أو استخدام مسابر خاصة ترتبط بنقطة معينة بالصبغي Y- chromatin with Y specific DNA probes (Kobayashi وزملاؤه، 1998)، أو طريقة التهجين في الموضع التألقي Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) (Cenariu وزملاؤه، 2011)، وكانت أفضل الطرق باستعمال تقنية تفاعل البوليميريز التسلسلي PCR إذ تتميز هذه الطريقة بسهولة استخدامها وسرعة إجرائها نسبياً، ودقتها مقارنة مع الطرق الأخرى (Pomp، وزملاؤه، 1995).

تتألف الصيغة الصبغية للأبقار من 58 صبغي جسمي ومن صبغيين جنسيين حيث يكون الذكر ذو صيغة صبغية (58 +XY)، والأنثى (58 + XX) (Gallagher و Womach، 1992)، ويمكن الحصول على خلية أو عدة خلايا من الجنين بغرض الكشف عن الصبغيات الخاصة بالجنس (X أو Y) باستخدام شفرة حادة رفيعة جداً تركب على المجهر المقلوب (Lopatarova وزملاؤه، 2008)، أو عن طريق سحب خلية أو خلايا من الجنين باستخدام إبرة رفيعة خاصة (Chrenek وزملاؤه، 2001)، أو حتى من خلال حك الطبق البتري لتثبيت الجنين في قعره ثم استخدام شفرة حادة جداً لتقسيم الجنين (Ekici وزملاؤه، 2006) باستخدام المجسام الضوئي Steriomicroscope.

ونظراً لعدم وجود دراسات تتعلق بتجميد أجنة الأبقار الشامية وتجنيسها فقد هدف هذا الجزء من الدراسة إلى معرفة تأثير التجميد في معدل بقاء الأجنة خلال التجميد والإذابة في كل من مرحلتي التويتة والكيس الأرومي، واختيار فاعلية عدة برايمرات primers (بادئات–مستهلات) تستخدم في عروق أبقار مختلفة

لتحديد المناسب منها في تحديد جنس أجنة الأبقار الشامية بهدف التحكم بجنس المولود في هذا العرق المحلي كمؤشر جزيئي يساعد في اختيار جنس الأجنة المثمرة قبل نقلها بما يتوافق ورغبة المربي.

5-2. المواد والطرائق:

5-2-1. تجميد الأجنة:

جُمّد 48 جنيناً من الدرجة الأولى والثانية (20 في مرحلة التويتة ، و28 في مرحلة الكيس الأرومي) بطريقة التزجيج vitrification، وحُضر وسط التجميد وفق Lopatarova وزملاؤه (2006) إذ وضعت الأجنة في محلول احتفاظ مرحلي holding medium (HM) مكون من 10% سيروم دم العجل + 90% PBS (Phosphate Buffer Saline) (شركة Egg Technology البريطانية) أضيف له 7.5% إتيلين غليكول و7.5% داي متيل سولفوكسيد DMSO (شركة Sigma الامريكية) لمدة ثلاث دقائق، وبعدها نقلت الأجنة لمحلول HM آخر يحوي 16.5% إتيلين غليكول و16.5% داي ميتيل سولفوكسيد و0.5 مول/ليتر سكروز. فلترت الأوساط باستخدام فلتر دقيق 0.22 ميكرومتر. وتم اتزان المحاليل في درجة حرارة الغرفة (22 -30 م°).

عبئت 2-3 أجنة في قشات 0.25 مل مرقمة بواسطة قلم خاص مع وسط التجميد أغلقت القشات باستخدام عصا الإغلاق بعد تعبئتها بالأجنة، ثم غمرت مباشرة في السائل الآزوتي لمدة لا تتجاوز 30 ثانية، وحفظت في خزانات السائل الآزوتي حتى وقت الإذابة.

5-2-2. إذابة الأجنة وتقييمها:

بعد تخزين الأجنة لنحو 1-4 أشهر، أذيبت القشات الحاملة للأجنة في ماء دافئ 37 م° لمدة 30 ثانية. وفرغت محتويات كل قشة في طبق بتري، ونقلت إلى محلول HM الحاوي على السكروز بتركيز 0.25 مول/ل لمدة 1 دقيقة، ومن ثم بتركيز 0.15 مول/ل لمدة 5 دقائق، وبعدها بتركيز 0 مول/ل لمدة 5 دقائق

أخرى (Lopatarova وزملاؤه، 2006)، ثم غُسلت ثلاث مرات في وسط مفلتر مكون من 10% سيروم دم العجل + 90% PBS، ثم وضعت في حجرة تحوي 0.5 مل من الوسط السابق في حاضنة درجة حرارتها 38.5 مْ في جو رطب ونسبة غاز Co2 5%. لمدة 4 ساعات ثم أخرجت من الحاضنة وقيمت الأجنة شكلياً إلى أجنة صالحة للنقل وأخرى غير صالحة للنقل (JLTA، 1995).

5-2-3. تجنيس الأجنة:

سحبت 1-2 خلية من 13 جنيناً أعيد تذويبها (وفق الفقرة السابقة) وتتصف بحيوية جيدة، باستخدام المجهر المقلوب (شركة Nikon اليابانية) والحقن المجهري الليزري (شركة Eppendorf الألمانية) في طبق بتري يحوي وسط التقسيم من شركة Cook الاسترالية، وسحبت عينات دموية من الوريد الوداجي من 5 ذكور و5 إناث أبقار شامية لاستخدامها كشاهد للتأكد من نجاح التجنيس.

استخلاص المادة الوراثية من الأجنة: استخلصت المادة الوراثية من خلايا الأجنة باستخدام الطريقة الإنزيمية وفق Wan وزملاؤه (2003)، إذ نُقلت 1-2 خلية من الخلايا المسحوبة من الأجنة (الصورة 13) إلى أنبوب PCR سعة 0.5 مل، ومن ثم أُضيف إليها 20 ميكروليتر من محلول التحطيم lysis solution المكون من 100ميكروغرام/مل k proteinase، و0.5 ميكروليتر من Triton X-100 لمدة 30 دقيقة على درجة الحرارة 55مْ. وُضعت الأنابيب في حمام مائي على درجة حرارة 100مْ لمدة 5 دقائق، ثم ثُقّلت العينات بسرعة 1200 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق. استخدم المزيج النهائي كقالب لـ DNA بأخذ 20 ميكروليتر منه ونقلها إلى أنابيب PCR ومن ثم أُضيف مزيج التفاعل الخاص بالـPCR.

الصورة 13: سحب خلية من جنين الأبقار الشامية

<u>استخلاص المادة الوراثية من الدم:</u> استخلصت المادة الوراثية من دم حيوانات التجربة باستخدام طريقة الـCTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide) (Saghai-Maroof وزملاؤه، 1984) مع بعض التعديلات الطفيفة (Sayed وزملاؤه، 2002)، إذ أُخذ 5–20 مل من الدم المجمد المسحوب مسبقاً من الوريد الوداجي لأبقار معروفة الجنس بعد تذويبه في درجة حرارة الغرفة، وأضيف له 5–23 مل من محلول الفوسفات الواقي PBS. حرِّكت الأنابيب جيداً، ثم ثفلت لمدة 30 دقيقة، بسرعة 4000 دورة في الدقيقة(د) وحرارة 4˚ مئوية. رمي الطافي، وكررت العملية مرتين ولكن بإضافة3–5 مل من محلول PBS والتثفيل لمدة 15د. ثم أضيف 5–10 مل CTAB وخلطت لمزج الراسب، ثم حُضنت في حمام مائي عند درجة حرارة 56 م˚ مع الهز القوي لمدة 30 د. أُخرجت العينات من الحاضنة ثم وُضعت في الثلج لمدة 5 دقائق، وأُضيف إليها 5–10 مل كلوروفورم–آيزوأميل الكحول وحُرِّكت لمدة 10د، وُثفلت بسرعة 4000 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة. أدى ذلك إلى تشكل ثلاثة طبقات سحبت الطبقة العلوية وكررت العملية مرة أخرى لضمان التخلص من البروتينات، ثم سُحب السائل الطافي ونُقل إلى أنبوب جديد، ثم أضيف إليه ضعفي حجمه من الآيزوبروبانول. حُرِّكت العينات بلطف حتى تكثَّف الـ DNA، ثُفّلت الأنابيب لمدة 10 دقائق بسرعة 4000 دورة في الدقيقة وبدرجة حرارة 4°م بغية ترسيب الـ DNA في قعر الأنبوب. غسلت الـ DNA

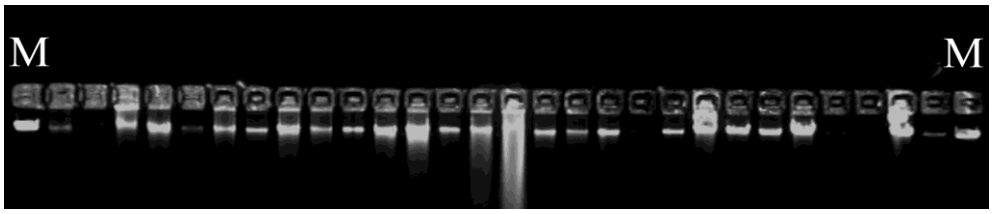
الجينومية المترسبة في قعر الأنبوب بـ 5 مل من الإيتانول 75%، ثم ثفلت بسرعة 4000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق. تُرك الراسب ليجف ضمن المجففة، ثم أضيف 100−300 ميكرولتر من المحلول الواقي 1X TE (مكون من 10 ميلي مول Trise base، و1 ميلي مول EDTA ، 8=PH) إلى الـ DNA لحلها وحفظها من التقطع، ثم ُحضنت على الحرارة 56مº لمدة أربع ساعات، فيكون الـ DNA انحلَّ وأصبح جاهزاً للتمديد.

5−2−3−1. تقدير جودة المادة الوراثية الـ DNA:

قدرت درجة جودة المادة الوراثية الـDNA باستخدام جهاز الرحلان الأفقي Agarose gel electrophoresis وذلك بتحميل عينات الـ DNA المستخلصة على هلامة آغار بتركيز 1%، إذ أن عينات الـ DNA ذات الوزن الجزيئي العالي والجيدة تبدو كحزم واضحة Band تحت الأشعة فوق البنفسجية، أما عينات الـ DNA غير الجيدة والمتكسرة فتبدو كخطوط متدرجة من الأطول إلى الأقصر ممتدة على طول مسار العينة، وفي حال ظهور حزمة مضيئة ذات وزن جزيئي منخفض بالقرب من نهاية مسار العينة فهذا يدل على وجود RNA ضمن العينة .

أما تركيز المادة الوراثية فيمكن تقديرها بشكل تقريبي من خلال مقارنة كثافة حزم العينات المختبرة مع كثافة حزم السلالم العيارية DNA Ladders المعلومة التركيز في الحفرة الأولى والأخيرة (Sambrook وزملاؤه، 1989).

كما تُستعمل هذه الطريقة لقياس كمية الـ DNA في محاليله التي يتعذر قياسها بطريقة الامتصاص بالـ UV لقلة كميتها إذ تتحسس كمية ضئيلة من الـ DNA تقل عن 50 نانو غرام/مل (الصورة 14).



الصورة **14**: مقارنة كثافة حزم العينات المختبرة مع كثافة حزم السلالم المعيارية **DNA Ladders** المعلومة التركيز في المسار الأول والأخير، تستخدم هذه العملية للتأكد من جودة الـ**DNA** فالحزم الواضحة تدل على نجاح عملية الاستخلاص، بينما تدل الحزم غير الواضحة على عدم نجاحها.

5-2-3-2. تقدير كمية المادة الوراثية الـ DNA:

استخدم جهاز المطياف الضوئي لتقدير كمية الحمض النووي الـ DNA في العينات بشكل دقيق، ويعتمد في عمله على قياس كمية الحمض النووي المستخلصة عن طريق امتصاصها للأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet، أُخذ 2 ميكروليتر من DNA المذاب في 98 ميكروليتر من المحلول الواقي TE، ثم قيست امتصاصية العينة المحددة للأشعة الضوئية عند طول الموجة 260 نانومتر، إذ تسمح قراءة كمية الامتصاص (الكثافة الضوئية Optical density:OD) على طول الموجة 260 نانومتر بحساب تركيز الحمض النووي Nucleic Acid في العينة بحيث أن القيمة واحد للكثافة الضوئية (OD) عند طول الموجة 260 نانومتر تقابل 50 ميكرو غرام / مل لسلاسل الـ DNA المضاعفة ونحو 40 ميكروغرام/مل لسلاسل الـ DNA المفردة وسلاسل الـ RNA، ونحو 20 ميكروغرام/مل للسلاسل المفردة من قليلات النيكليوتيدات Oligonucleotides (Maniatis وزملاؤه، 1982). وتحسب كمية (تركيز) الحمض النووي من المعادلة الآتية:

$$\text{(DNA conc.) } \mu g/\mu l = (OD_{260} \times \text{dilution factor}) \times 100 \times (50\ \mu g/ml)/\ 1000$$

حيث أن OD260 تمثل قيمة الامتصاص على الموجة 260 نانومتر، dilution factor هو عامل التمديد.

أما قراءة كمية الامتصاص عند طول الموجة 320 نانومتر فتسمح بتقدير كمية التلوث Contamination بالبروتينات أو مواد الاستخلاص الأخرى، لذلك يجب أن تكون قريبة من الصفر أو تساويه في حال جودة استخلاص عينات الـ DNA. أما النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر إلى الموجة 280 نانومتر OD280 / OD260 تساعد في تقييم نقاوة الحمض النووي وبالتالي جودته ويجب

أن تُراوح هذه النسبة بين 1.8 و2 لكل من الـ DNA والـ RNA على التوالي. فإذا كانت العينة تحوي الحمض النووي بالإضافة إلى بروتينات فستكون النسبة أقل من الحد الطبيعي (Maniatis وزملاؤه، 1982). بعد حساب تركيز DNA لكل العينات، حُضّر محلول ممدد للـ DNA لكل عينة بتركيز 50 ميكروليتر /نانوغرام لاستخدامه في تفاعلات الـ PCR.

5-2-3-3. التفاعل التسلسلي البوليميرازي PCR مع زوجين من البادئات:

أ: مواد التفاعل:

استخلص DNA من خلايا 10 أجنة من أصل 13 نجح منها عزل الخلايا، وأجريت اختبارات تمهيدية على الدم باستخدام العديد من البادئات (المستهلات Primers) لتحديد المناسب منها في عملية التجنيس في البقر الشامي. وعند تحديد البادئ المناسب أجريت عملية التجنيس السابقة على خلايا الأجنة المعزولة، واستخدمت في عملية التجنيس مواد التفاعل التالية:

dNTPs: deoxynucleoside triphsphate 100mM (Invitrogen 10297-018, USA)
10xPCR Buffer and MgCl2 (Invitrogen 18067-017, USA)
Taq DNA Polymerase (Invitrogen 18038-042, USA)

واستخدمت البادئات التالية (الجدول 5-1):

الجدول 5-1 البادئات المستخدمة في تحديد جنس جنين الأبقار الشامية:

Refernces	Oligonucleotide sequence (5'3')	Primers	No.
Ekici وزملاؤه (2006)	TCC AAT CCC AAA GAA AGG C	Bovine Y-Sense	1
Ekici وزملاؤه (2006)	TGT CAT CCA CAC AGT CAA AAC C	Bovine Y-Anti-sense	2
Ekici وزملاؤه (2006)	AAC GGG AAG CTC GTC ATC AAT GG	Bovine G3PDH- Sense	3
Ekici وزملاؤه (2006)	ATC ATA CTT GGC AGG TTT CTC CAG GCG G	Bovine G3PDH- Anti-sense	4
Prashant وزملاؤه (2008)	CGA AGA CGA AAG **K**TG GCT CT	SRY-1F	5

Prashant وزملاؤه (2008)	TGT GCC TCC TCA AAG AAT GG	SRY-1R	6
Prashant وزملاؤه (2008)	CCA ACG TGT CTG TTG TGG ATC TGA	GAPDH-1F	7
Prashant وزملاؤه (2008)	GAG CTT GAC AAA GTG GTC GTT GAG	GAPDH1R	8
Matthews و Reed (1992)	CCC TTC CAG CTG CAG TGT CA	Y-specific-F	9
Matthews و Reed (1992)	GAT CTG TAA CTG CAA ACC TGG C	Y-specific-R	10
Matthews و Reed (1992)	TGG AAG CAA AGA ACC CCG CT	Bovine DNA specific- F	11
Matthews و Reed (1992)	TCG T**G**A GAA ACC GCA CAC TG	Bovine DNA specific- R	12
Park وزملاؤه (2001)	GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT	P1 SEX	13
Park وزملاؤه (2001)	GCT ATG CTA ACA CAA ATT CTG	P2 SEX	14
Park وزملاؤه (2001)	TGG AAG CAA AGA ACC CCG CT	P1 AUT	15
Park وزملاؤه (2001)	TCG T**C**A GAA ACC GCA CAC TG	P2 AUT	16

اختُبر فعالية كل من الأزواج (1، و2) و(3، و4) و(5، و6)، و...و(15، و16) من البادئات الـ16 لتحديد الجنس في عينات الدم، وتبين أن الزوجان (13، و14)، و(15، و16) هي التي أظهرت فعالية في تحديد الجنس في عينات الدم ومن ثم اعتمدت هذه البادئات لاستخدامها في تحديد جنس الأجنة فكانت النتائج متطابقة تماماً.

ب: تحضير العينات:

تم تفاعل الـPCR على مرحلتين وفي كل مرحلة أضيف زوج من البادئات:

المرحلة الأولى: استخدم الزوج الأول من البادئات (P1 SEX، P2 SEX) الخاص بالصبغي الجنسي Y، حيث حُضّرت الخلطة الخاصة بهذه المرحلة على النحو التالي:

المادة	الكمية
10x PCR Buffer	2ميكروليتر
dNTPs 2.5 ميلي مول	2ميكروليتر
$MgCl_2$ 25 ميلي مول	4ميكروليتر
Forward Primer (10 µM)	2ميكروليتر
Reverse Primer (10 µM)	2ميكروليتر
Taq DNA polymerase	2ميكروليتر

مُزجت هذه الخلطة مع 2 ميكروليتر من الـDNA المستخلصة بالطريقة المذكورة آنفاً والمضبوط تركيزها عند 50نغ/ميكروليتر ليصبح الحجم الداخل في تفاعل الـPCR الأول 2ميكروليتر، وبعد خلطها جيداً أدخلت هذه العينات في تفاعل الـPCR الأول ضمن البرنامج التالي:

المرحلة	الدنترة الأولية لشريطي DNA	تطويع البادئ			الاستطالة النهائية	
		الدنترة	التطويع	الاستطالة		
عدد الدورات الحرارية	---	10دورات			---	
درجة الحرارة (C^o)	95	72	57	95	72	4
المدة(دقيقة)	7	0.5	0.5	30	7	∞

وأثناء هذا التفاعل ُحضرت الخلطة الثانية المؤلفة من زوج البادئات الثاني (P1 AUT/P2 AUT)

المادة	العينة/الكمية
Forward Primer (10 µM)	2ميكروليتر
Reverse Primer (10 µM)	2ميكروليتر

وعند انتهاء تفاعل PCR الأول أضيفت الخلطة الثانية إلى كل عينة ومزجت جيداً لتدخل بعدها في تفاعل الـ PCR الثاني المؤلف من:

المرحلة	الدنترة الأولية لشريطي DNA	تطويع البادئ	الاستطالة النهائية

		الاستطالة	التطويع	الدنترة		
عدد الدورات الحرارية	---	25دورة			---	
درجة الحرارة (Cº)	95	72	57	95	72	4
المدة (دقيقة)	7	0.5	0.5	0.5	7	∞

ويكون الحجم النهائي بعد إنتهاء تفاعلي الـPCR (الأول والثاني) في كل عينة مساوياً 18.2ميكروليتر.

ج_تحميل العينات على هلامة الآغار:

حُضرت هلامة الآغار التي تركيزها 3% بإذابة 1.8غرام من الآغار في 60 مل من المحلول الواقي 1xTBE، وذلك بالغلي لعدة دقائق حتى تجانس المحلول، ومن ثم بُرِّد المحلول حتى الـ60 ْم وعندها أُضيف 5ميكروليتر من الإثيديوم بروماید (10مغ/مل) لرؤية جزيئات DNA المفصولة، وحرّكت المحتويات جيداً قبل صبها ضمن الصينية المُخصصة لجهاز الرحلان الكهربائي الأفقي وتُركت الصينية بعد صب هذا المحلول لمدة نصف ساعة على درجة حرارة الغرفة حتى تصلب الهلامة. وبعدها نُقلت إلى جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي الحاوي على محلول 1xTBE وحُمّلت العينات ضمن الفراغات التي تركها المشط بعد إزالته من الهلامة المكتملة التصلب، حيث مُزجت العينات مع 3 ميكروليتر من محلول التحميل (بروموفينول وغليسرول)، كما حُمّلت 3.5 ميكروليترمن الـladder(50bp) المستخدم كسلم معياري لأحجام القطع على يمين وشمال العينات للاستفادة منه في تحديد أحجام القطع المضخمة.

مُرّر التيار الكهربائي في جهاز الرحلان الكهربائي على الاستطاعة (V70) لمدة ساعة، وبعدها تم التحقق من اكتمال فصل القطع المضخمة بتعريض الهلامة للأشعة فوق البنفسجية حيث ظهرت القطع المضخمة على شكل قطع ملونة بلون برتقالي، وفي حال عدم ظهور الفصل بين القطع، أُعيدت الهلامة إلى جهاز الرحلان الكهربائي وتتابعت عملية الترحيل لمدة 10 دقائق ومن ثم فُحصت الهلامة مجدداً وهكذا حتى تنفصل القطعتين عن بعضهما.

5-3. التحليل الإحصائي:

حللت البيانات الخاصة بتجميد الأجنة إحصائياً باستخدام اختبار كاي مربع (الجداول 2×2 الإحتمالية) برنامج STATISTICA الإصدار 6.

5-4. النتائج:

5-4-1. تجميد الأجنة:

لم يلحظ وجود تأثير معنوي لمرحلة الجنين أو نوعيته اعتماداً على حجم كتلة الجنين المتماسكة المجمدة في معدل بقاء الأجنة (%) وكان هذا المعدل في التويتة نحو 66.7%، و50.0% عندما كانت درجة جودته 1، و2 ، على التوالي، بينما كان المعدل في مرحلة الكيس الأرومي 73.3% للنوعية 1، و53.8% للنوعية 2 للأجنة المجمدة.

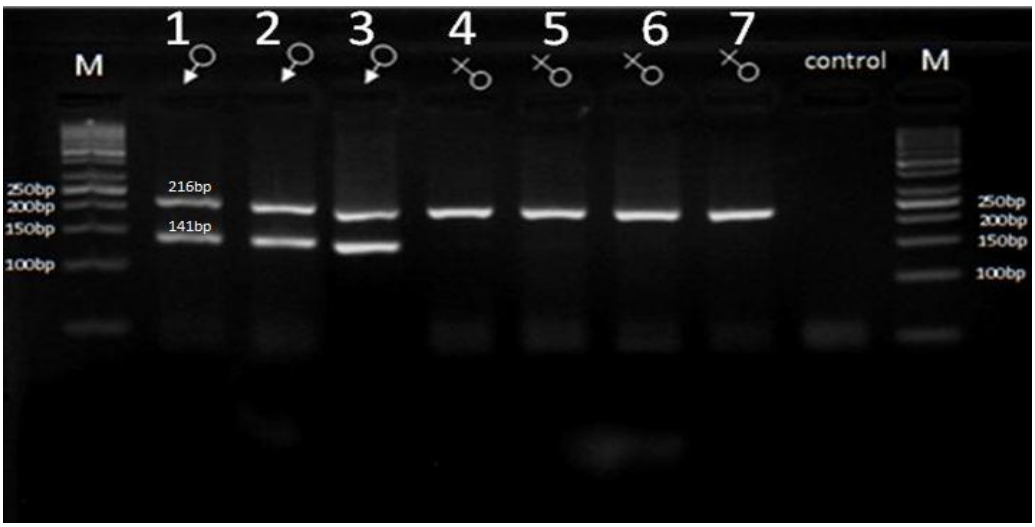
الجدول 5-2. نسبة الأجنة الحية بعد التجميد والإذابة بطريقة التجميد السريع حسب مرحلة تطور الجنين.

مرحلة التطور	النوعية	العدد	عدد (نسبة) الأجنة الحية بعد التجميد والإذابة %
التويتة	1	12	(66.7[a])8
	2	8	(50.0[a])4
الكيس الأرومي (مبكر وعادي)	1	15	(73.3[a])11
	2	13	(53.8[a])7

تشير الأحرف المتشابهة في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي بين النسب حسب مرحلة تطور الجنين.

5-4-2. تجنيس الأجنة:

أظهرت النتائج أن البادئات 13-14-15-16 (الجدول 5-1) فقط أظهرت فعاليتها في تحديد الجنس في دم حيوانات معروفة الجنس (ذكور وإناث أبقار شامية)، اختُبرت هذه البادئات على الخلايا المعزولة من الأجنة فكانت النتائج متطابقة تماماً، إذ ميّز زوجي البادئات المستخدمة بنسبة نجاح 100% في تحديد جنس الخلايا المعزولة من الأجنة وذلك من خلال ارتباط زوجي البادئات (P2SEX,P1SEX، P2Aut,P1Aut) لقطعة DNA من الصبغي الجنسي Y الخاص بالذكور وعدم ارتباطها مع أي قطعة من المادة الوراثية عند الإناث. وكان لظهور حزمة DNA على هلامة الآغار حجمها 141bp (bp: base pair قاعدة مزدوجة) في أي جنين بمثابة مؤشر دلّ عن صفة الذكورة، كما أن غياب مثل هذه القطعة عند أي جنين من الأبقار تدل بأن الجنين أنثى. أما قطعة DNA التي حجمها 216bp فهي متماثلة وموجودة على الصبغيات الجسمية في كلا الجنسين(الصورة 15)، وبالتالي فإن استخدامها مع حزمة DNA التي حجمها 141bp المميزة لجنس الذكر ساعدت في التأكد من نجاح التقنية بالإضافة إلى الشاهد السلبي. وكانت نسبة نجاح تقنية عزل الخلايا 13/10 (77%)، ودقة التجنيس 10/7 (70%).



الصورة 15: العينة 1، و2، و3 تمثل جنين ذكر (لاحظ ظهور القطعة المضخمة على الصبغي الجنسي Y وحجمها 141bp)، العينة 4، و5، و6، و7 تمثل جنين أنثى (لاحظ غياب القطعة ذات الحجم 141bp الخاصة بالصبغي الجنسي Y)، وبجانب هذه العينات تم تحميل عينة شاهد سلبي للتأكد من عدم حدوث تلوث في مكونات التفاعل (حيث تم وضع جميع المكونات واتباع جميع الخطوات السابقة عدا وجود المادة الوراثية الـ DNA في التفاعل)، وإلى يمين ويسار العينات تم تحميل سلم قياسي لأحجام القطع المضخمة (50bp).

5-5. المناقشة:

5-5-1. التجميد:

بالرغم من أن النزعة تشير إلى زيادة معدل بقاء الأجنة حية بعد التجميد والإذابة عندما يكون نوعية الجنين من الدرجة 1 مقارنة مع الدرجة 2 سواء في مرحلة التويتة أو مرحلة الكيس الأرومي (الجدول 5-2) إلا أنه لم يلاحظ تأثير معنوي بينها في هذا العدد القليل من الأجنة المستخدمة، وكانت نسبة بقاء الأجنة حية بعد إذابة التجميد في هذه الدراسة أقل مما وجده Lopatarova وزملاؤه (2002) عند

استخدامهم الوسط (16.5% إتيلين غليكول و16.5% داي ميتيل سولفوكسيد) والذي بلغ نحو 92.9%، و77.4% عندما كانت درجة جودة الجنين 1، و2، على التوالي، كما وجدوا أن هذه النسبة في مرحلة التويتة (نوعية 1) كانت نحو 90.5%، وفي مرحلة الكيس الأرومي (نوعية 1) نحو 90.2%، وربما يعزى حصولهم على نسب أعلى نتيجة استخدامهم بعض هرمونات وعوامل نمو في وسط الزرع عند الإذابة التي تزيد من معدل البقاء (Mtango وزملاؤه، 2003)، إضافة إلى استخدامهم قشات Open pulled straw (OPS) التي تقل ثخانة قطرها الداخلي نتيجة تعرضها للحرارة مما يسرع من معدل التجميد ويقلل من تعرضها للسمية (Lopatarova وزملاؤه، 2006) إضافة إلى تقليل انكسار غلاف الزونا (Vajta وزملاؤه، 1999).

وجد Donnay وزملاؤه (1998) أن معدل بقاء الأجنة بعد 72 ساعة من التجميد والإذابة كانت 67% في مرحلة الكيس الأرومي عند استخدامهم لوسط التجميد (25% غليسرول + 25% ايثلين غليكول) وهذه النتيجة قريبة مما وجد في هذه الدراسة، ولكنها أقل مما وجده Kaidi وزملاؤه (2001) في مرحلة الكيس الأرومي المبكر 80% عند استخدامهم الوسط السابق ذاته. كما أن معدل بقاء الأجنة في هذه الدراسة كان أقل مما ذكره Dinnyes وزملاؤه (1995) والمقدر بنحو 81 % بعد 48 ساعة من الإذابة. ومع ما وجده Vajta وزملاؤه (1995) والمقدر بنحو 84 % بعد 24 ساعة من إذابة الأجنة. وقد يعزى هذا التفاوت الملاحظ في نسبة بقاء الأجنة إلى الاختلافات في موانع التجميد المستخدمة، واختلاف تراكيزها، إضافة إلى وجود بعض المواد المغذية المضافة إلى أوساط التجميد والإذابة التي تزيد من معدل البقاء.

استخدم Lopatarova وزملاؤه (2006) المحلول (16.5% إتيلين غليكول و16.5% داي ميتيل سولفوكسيد) كوسط لحفظ أجنة أبقار الهولشتاين فريزيان بالتزجيج، وبعد إذابة الأجنة ونقلها لأبقار مستقبلة خلال 1 ساعة بعد الإذابة وجدوا أن معدل الحمل كان نحو 54.5%، و53.3% في مرحلتي التويتة، والكيس الأرومي المبكر، على التوالي.

استنتج أن حفظ أجنة الأبقار الشامية بالتزجيج يمكن أن ينفذ بسهولة وبتكلفة قليلة لموانع التجميد دون أية تأثيرات سلبية في نوعيتها.

5-5-2. التجنيس:

إن الإجراءات المعتمدة على تضخيم تتابع DNA النوعي للصبغي Y والمستخدمة لتحديد جنس أجنة الأبقار قبل الانغراس تمثل نموذجاً جيداً للتطبيق السريع لتقنيات البيولوجية الجزيئية في الحقل (Lopatarova وزملاؤه، 2007)، ومن الضروري عزل خلايا الأرومية blastomere من الجنين دون التسبب في أذى الجنين وفقده حيويته، وهذا يعتمد على المهارة والخبرة (Yu وزملاؤه، 2006).

نجح سحب الخلايا (1-2 خلية) في 10 أجنة (77%)، بينما تأذت باقي الأجنة (3) ولم يُستطع سحب الخلايا منها، وربما يعود ذلك لأخطاء فنية في عزل الخلايا وكسر بعض الإبر عند محاولة السحب، وحُدّد الجنس في الخلايا المعزولة بنسبة 70%، إذ فشلت عملية عزل DNA في 3 أجنة نتيجة حدوث تلوث بالبروتينات أو مواد الاستخلاص الأخرى (Maniatis وزملاؤه، 1982)، أو نتيجة وجود غباشة في صورة للشرائط Bands الخاصة بالصبغي Y بسبب عدم اكتمال تضاعف تفاعل البوليميراز نتيجة استخدام خلية واحدة صغيرة جداً، أو عينة متدهورة والتي قد تتعرض للدنترة (للتمسخ) denaturated وبالتالي تؤثر سلباً في تفاعلات التضاعف، ومن الممكن أحياناً عدم ملاحظة العصابات بسبب تلوث DNA أو الهجرة غير المنتظمة للشرائط عند الرحلان الكهربائي، أو عند عدم حدوث تضاعف تفاعل البوليميراز، أو عند الفشل في توزيع عينات الخلايا إلى أنابيب التفاعل (Lopes da Costa وزملاؤه، 2002).

وبالرغم أن أخذ كمية كبيرة من خلايا القسيم الأرومي يزيد من دقة التجنيس إلا أنه يؤثر سلباً في تطور الجنين (Lopatarova وزملاؤه، 2007)، ويرتبط عدد الخلايا المسحوبة من الجنين بمرحلة تطور

المتعضية، فعلى سبيل المثال عزل Tominaga وHamada (2004) 1–2 خلية من أجنة أبقار عدد الخلايا فيها 8–16 وحدد الجنس بنسبة 90% من الحالات باستخدام تقانة الـ PCR، واستمرت الانقسامات في الأجنة إلى مرحلة الكيس الأرومي بنسبة 65.1% مقارنة مع 74.5% للشاهد. بينما وجد Shea (1999) أن إزالة 10–20% من خلايا الجنين لاستخدامه في تحديد الجنس لم يؤثر سلباً في معدل الحمل بعد النقل، ووجد Lee وزملاؤه (2004) أن إزالة جزء كبير من الجنين يفقده الكثير من حيويته وبالتالي لا يمكن تجميده أو إذابته، بينما وجد (Lopatarova وزملاؤه، 2007) أن عزل 6–12 خلية من جنين جيد النوعية بعمر 7 أيام لا يؤثر سلباً في سلامة الجنين، وحُدّد الجنس في 90% من الأجنة. تتوافق نتائج هذه الدراسة مع ما وجده Machaty وزملاؤه (1993)، وPrashant وزملاؤه (2008) من أن تحديد جنس جنين الأبقار باستخدام تقانة PCR تعد وسيلة جيدة للكشف عن جنس الجنين دون الإضرار به. أما تطور الجنين بعد التجنيس فقد وثّق من قبل العديد من الباحثين، إذ زرع Cenariu وزملاؤه (2011) أجنة أبقار مجنسة لعرق السيمنتال في أرحام أبقار مستقبلة، ووجدوا نحو 38% منها كانت حاملاً، وأن دقة تحديد الجنس باستخدام جهاز PCR تتجاوز 96%، وكان معدل الحمل بعد نقل أجنة مجنسة نحو 52.6% في مرحلة التويتة (Machaty وزملاؤه، 1993)، بينما لم يلحظ Lopes وزملاؤه (2001) وجود فرق معنوي بين معدل حمل الأجنة المجنسة (60%)، والأجنة غير المجنسة الطازجة (61%)، ومما لاشك فيه أن تطور تقنيات سحب الخلايا دون التسبب في أذى الأجنة يزيد من معدل حدوث الحمل (Cenariu وزملاؤه، 2011)، و**تكمن أهمية هذه النتائج في أنها تحدث لأول مرة في القطر وتسمح بتجنيس الأجنة قبل نقلها كأساس لإكثار هذا العرق وتسريع وتيرة التحسين الوراثي فيه، وتوصي هذه الدراسة بزرع الأجنة المجنسة في أرحام أبقار مستقبلة لمعرفة مدى نجاح الحمل.**

6. الاستنتاجات:

* لا تختلف الأبقار الشامية عن غيرها من العروق في استجابتها للمعاملة الهرمونية بهدف الإباضة المتعددة وإنتاج الأجنة.

* تحدث الإباضة بعد 24-48 ساعة من الحقن بهرموني GnRH أوhCG شريطة وجود جريب مبيضي سائد، ويتكون جسم أصفر ثانوي لاحقاً.

*** إمكانية نجاح تقانة نقل الأجنة في الأبقار الشامية كبقية عروق الأبقار الأخرى.**

*** يمكن تقليل كمية هرمون FSH إلى نصف توصيات الشركة الصانعة في برنامج الإباضة المتعددة للأبقار الشامية دون أن يؤثر سلباً في أي من المؤشرات المدروسة، ولايفضل استخدام هرمون PMSG بمفرده في هذا المجال.**

***أفضل وقت للتلقيح الصناعي في الأبقار الشامية عند استخدام برامج الإباضة المتعددة وانتاج الأجنة يكون بعد 12، و24 ساعة من بدء الشبق لزيادة نسبة الإخصاب والحصول على أكبر عدد ممكن من الأجنة القابلة للنقل.**

*** إمكانية تجميد أجنة الأبقار الشامية بطريقة التزجيج دون تأثيرات سلبية كبيرة في نوعيتها.**

*** إمكانية استخدام بادئات نوعية لتجنيس أجنة الأبقار الشامية بما يفيد في تقنيات نقل وتقسيم الأجنة المرغوبة في التحسين الوراثي.**

7. التوصيات:

- **إجراء مزيد من الدراسات المتعلقة باستخدام الهرمونات في توقيت الشبق خلال أيام مختلفة من دورة الشبق أثناء نمو الجريب السائد وتراجعه، وتأثير ذلك في معدلات الحمل للأبقار الشامية، أو نقل الأجنة، ومدى استجابة برنامج الإباضة المتعددة المتبع لهذا الإجراء.**
- **إجراء مزيد من الدراسات المتعلقة بتجميد أجنة الأبقار الشامية بطريقة التزجيج باعتبارها طريقة فاعلة وقليلة التكاليف.**

- **إجراء دراسات تتعلق بتجنيس النطاف، وتلقيح بويضات منها ضمن الأبقار الحية أو مخبرياً حتى الوصول لمرحلة التويتة أو الكيس الأرومي.**
- **التوسع باستخدام تقانة نقل الأجنة، واختيار الأجنة المجنسة أنثوياً كمنطلق لإكثار هذه الحيوانات.**
- **إنشاء بنك وراثي خاص بالأبقار الشامية.**
- **إجراء تجارب على الاستنساخ (التنسيل) Cloning بغية إكثار العروق المحلية المهددة بالانقراض.**

المراجع:

الدكاك، ماجد. 2008. تحديد بعض المؤشرات التناسلية وتحليلها في عجلات الأبقار الشامية النامية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

العوا، أسامة. 1965. مبادئ تربية الحيوان والدواجن. منشورات جامعة دمشق.

المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية. 2010. مديرية الإحصاء والتخطيط, وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي.

Alfuraiji, M. M., T. Atkinson, P. J. Broadbent and J. S. M. Hutchinson. 1993. Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG monoclonal antibodies. *Anim. Reprod. Sci*, **33**:99-109.

Ali, M. S., M. A. M. Y. Khandoker, M. A. Afroz and A. K. F. H. Bhuiyan. 2012. Ovarian response to different dose levels of follicle stimulating hormone (FSH) in different genotypes of Bangladeshi cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. **25**(1):52-58

Alkemade, S. J., B. D. Murphy. and R. J. Mapletoft. 1993. Superovulation in the cow; Effects of biological activity of gonadotropins. In: Proc 12th Ann. Conv. *Am Embryo Assoc Portland, Portland, Maine*.

Alvarez, P., L. J. Spicer, C. C. Chase, Jr., M. E. Payton, T. D. Hamilton, R. E. Stewart, A. C. Hammond, T. A. Olson and R. P. Wettemann. 2000. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J. Anim. Sci*., **78**: 1291–1302.

Amaya-Montoya, C., M. Matsui, C. Kawashima, K. G. Hayashi, G. Matsuda, E. Kaneko, K. Kida, A. Miyamoto and Y. I. Miyake. 2007. Induction of ovulation with GnRH and PGF2α at two different stages during the early postpartum period in dairy cows: ovarian response and changes in hormone concentrations. *J. Reprod. Dev*., **53** (4): 867–875.

Ando, T., S. Kamimura, K. Hamana, G. Watanabe and K. Taya. 2005. GnRh treatement at CIDR insertion influences ovarian follicular dynamics in Japanese Block cows. *J. Vet. Med. Sci*., **67**(3): 275-280.

Atkins, J. A., D. C. Busch, J. F. Bader, D. H. Keisler, D. J. Patterson, M. C. Lucy and M. F. Smith. 2008. Gonadotropin-releasing hormone-induced ovulation and luteinizing hormone release in beef heifers: Effect of day of the cycle. *J. Anim. Sci.*, **86**:83–93.

Atkins, J. A., M. F. Smith, K. J. Wells and T. W. Geary. 2010a. Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter and ovulation rate to GnRH in postpartum beef cows Part I: Anestrous cows. *J. Anim. Sci*., **88**:2300–2310.

Atkins, J. A., M. F. Smith, K. J. Wells and T. W. Geary. 2010b. Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part II: Anestrous cows. *J. Anim. Sci*., **88**:2311–2320.

Austin, E. J., M. Mihm, A. C. O. Evans, J. L. H. Ireland, J. J. Ireland and J. F. Roche. 2002. Effects of estradiol and progesterone on secretion of gonadotrophins and

health of first wave follicles during the estrous cycle of beef heifers. *Reprod*., **124**: 531-541.

Avery, B., A. Bak and M. Schmidt. 1989. Different cleavage rates and sex determination in bovine embryos. *Theriogeno.*, **32:**139–147.

Ayres, H., L. Penteado, J. R. Torres-Júnior, A. H. Souza and P. S. Baruselli. 2006**.** Taxa de concepção de vacas nelore lactantes sincronizadas com implante auricular de progestágeno associado ao benzoato ou ao cipionato de estradiol**.** *Acta. Sci. Vet.*, **34**:410. (abstract).

Ball, P. J. H. and A.R. Peters. 2004. Artificial Control of the Oestrous. In: Cycle Reproduction in Cattle. Third edition, Blackwell Publishing. pp. 110-123.

Barati, F., A. Niasari-Naslaji, M. Bolourchi, F. Sarhaddi, K. Razavi, E. Naghzali and W. W. **Thatcher**. 2006. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. *Theriogeno.*, **66**:1149-1155.

Barros, C. M., L. P. C. Porto and M. F. G Nogueira. 2003. Dose-response trial in *Bos taurus* vs. *Bos indicus* cows superovulated with FSH, associated with controlled LH surge and fixed time artificial insemination. *Theriogeno.*, **59**:524. (abstr.).

Baruselli, P.S., M. O. Marques, E. L. Reis, L. F. T. Nasser, R. C. P. Silva and J. A. Menegatti, 2003. Adequac¸a˜o da dose de FSH (Folltropin-V) em protocolos de superovulac¸a˜o de vacas nelore (Bos taurus indicus) com inseminac¸a˜o artificial em tempo fixo. *Acta. Sci. Vet*., **31**(Suppl 1): 244-245. (abstr.).

Beltran, M. P. and J. L. M. Vasconcelos. 2008. Conception rate in Holstein cows treated with GnRH or hCG on the fifth day post artificial insemination during summer. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.,* **60** (3):580-586.

Bleach, E. C. L., G. Glencross and P. G. Knight. 2004. Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous estrous cycles. *Reprod*., **127**: 621-629.

Bó, G. A., G. P. Adams, M. Caccia, M. F. Martinez, R. A. Pierson and R. J. Mapletoft. 1995a. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci*., **39**:193-204.

Bó, G. A., G. P. Adams, R. A. Pierson and R. J. Mapletoft. 1995b. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogeno*., **43**: 31-40.

Bodensteiner, K. J., K. Kot, M. C. Wiltbank and O. J. Ginther. 1996a: Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogeno.,* **5**: 115-1128.

Bodensteiner, K. J., Wiltbank, M. C., Bergfelt, D. R. and O. J. Ginther, 1996b: Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogeno.*, **45**: 499-512.

Booman, P., L. Kruijt, R. Veerhuis, A. M. Hengst, M. Tiemann and F. E. Ruch.1989. Sexing bovine embryos with monoclonal antibodies against the H-Y antigen. *Liv. Prod. Sci.*, **23**: 1–16.

Brackett, B. G., Y.K. Oh, J. F. Evans and W. J. Donawick. 1980. Fertilization and development of cow ova. *Biol. Reprod*. **23**:189-205.

Bülbül, B., M.Kirbas, M. Kose and S. Dursun. 2010. Investigation of superovulation response in Brown Swiss cows after synchronization using progesterone and oestradiol valerate. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg*., **16** (3): 463-468.

Callensen, H., T. Greve and P. Hyttel. 1987. Premature ovulations in superovulated cattle. *Theriogeno.,* **28**:155-166.

Cenariu, M., I. Groza, P. Emoke, L. Bogdan, I. Morar, S. Ciupe, R. Pop. 2011. Sexing of bovine embryos using polymerase chain reaction (PCR) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Romanian Biotech.* Letters, **16**(2): 6055-6061.

Chrenek, P., L. Boulanger, Y. Heyman, P. Uhrin, J. Laurincik, Bulla J. and J. P. Renard. 2001. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogeno.,* **55**: 1071–1081.

Colazo, M. G., J. P. Kastelic and R. J. Mapletoft. 2003. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogeno.,* **60**:855-865.

Colleau, J. J. 1991. Using embryo sexing within closed mixed multiple ovulation and embryo transfer schemes for selection on dairy cattle. *J. Dairy Sci*., **74**:3973-3984.

Crowe, M. A., D. Goulding, A. Baguisi, M. P. Boland, and J. F. Roche. 1993. Induced ovulation of the first postpartum dominant follicle in beef suckler cows using a GnRH analogue. *J. Reprod. Fertil*., **99**:551–555.

Cupp, A., M. Garcia-Winder, A. Zamudio, V. Mariscal, M. Wehrman, N. Kojima, K. Peters, E. Bergfeld, P. Hernandez, T. Sanchez, R. Kittock and J. Kinder. 1993.

Concentration of progesterone (P4) in circulation has different effects on biochemical characteristics of dominant follicles in cows. *J. Anim. Sci.*, **71**(Suppl.1): 211(Abstr.).

Dalton, J. C., S. Nadir, J. H. Bame, M. Noftsinger, R. G. **Saacke**. 2000. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. *J. Anim. Sci*., **78**:2081-2085.

De la Sota, R. L., E. Schmitt, F. A. Simmen and W. W. Thatcher. 1993. Endocrine changes associated with ovarian follicular dominance in cattle. *Biol. Reprod.*, **48**(Suppl. 1): 255 (Abstr.).

DeJarnette, J. M., R. G. Saacke, J. Bame, and C. J. Vogler. 1992. Accessory sperm: Their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. *J. Anim. Sci.*, **70**:484–491.

Dieleman, S. J., M. M. Bevers, P. Vos and F. de Loos. 1993. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment? *Theriogeno.,* **39**: 25-41.

Dinnyes, A., G. A. Wallace and W. F. Rall. 1995. Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification or slow freezing methods. *Mol. Reprod. Dev*., **40**: 429-435.

Dirandeh, E., H. Kohram and A. Z. Shahneh. 2009. GnRH injection before artificial insemination (AI) alters follicle dynamics in Iranian Holstein cows. *Afr. J. Biotech.* **8** (15): 3672-3676.

Donaldson, L. E. 1984. Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. *Theriogeno.,* **22**:205-212.

Donaldson, L. E. 1985. Effect of insemination regimen on embryo production in superovulated cows. *Vet. Rec*., **117**:35-37.

Donaldson, L. E. and D. N. Ward. 1986. Effects of luteinizing hormone on embryo production in superovulated cows. *Vet. Rec*., **119**:625-626.

Donaldson, L. E. and N. W. Darrell. 1985. Superovulation in cattle: dose response to FSH-W with and without LH contamination. *Theriogeno.,* **23**:189. (abstract).

Donnay, I., P. H. Auquier, S. Carolan, P. Lonergan, P. Mermillod and A. Massip. 1998. Vitrification of in vitro produced bovine blastocyst: methadological studies and developmental capacity. *Anim. Rep. Sci*., **52**: 93-104.

Dw, S., N. Pilon, R. Behdjani, A. Boyer, I. Daneau and J. Lussier. 2001. Genetic manipulation of sex differentiation and phenotype in domestic animals. *Theriogeno.,* **55**: 51-63.

Ekici, H., N. Turan, B.H. Sontas, C.R. Helps, A. Senunver and H. Ylmaz. 2006. Sex determination of bovine embryos using polymerase chain reaction (PCR). *Revue Med. Vet.*, **157**: 441–444.

Elli, M., B. Gaffuri, A. Frigerio, M. Zanardelli, D. Covini, M. Candiani and M. Vignali. 2001. Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. *Reprod*. **121**: 151–154.

Enright, B. P., M. Taneja, D. Schreiber, J. Riesen, X. C. Tian, J. E. Fortune and X. Yang. 2002. Reproductive Characteristics of Cloned Heifers Derived from Adult Somatic Cells. *Biol. Reprod.* **66**: 291–296.

Ferreira, R. M., C. A. Rodrigues, H. Ayres, R. F. Mancilha, P. H. Franceschini1, C.R. Esper1 and P.S. Baruselli. 2006. Effect of synchronizing ovulation in cattle administered a norgestomet ear implant in association with eCG and estradiol treatments on pregnancy rate after fixed-time embryo transfer. *Anim. Rep*., **3**(3) :370-375.

Figueiredo, R. A., C. M. Barros, O. L. Pinheiro and J. M. P. Soler. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (Bos indicus). *Theriogeno.,* **47**:1489–1505.

Fricke, P. M., L. P. Reynolds and D. A. Redmer. 1993. Effect of human chorionic gonadotropin administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function in cows. *J. Anim. Sci*. **71**:1242-1246.

Gallagher, Jr. D. S. and J. E. Womack. 1992. Chromosome Conservation in the Bovidae. *J. Hered.* **83** (4): 287-298.

Gardner, D. K., M. Pawelczynski and A. Trounson. 1996. Nutrient uptake and utilization can be used to select viable day 7 bovine blastocysts after cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev*., **44**: 472-475.

Gasser, C. L., G. A. Bridges, M. L. Mussard, D. E. Grum, J. E. Kinder and M. L. Day. 2006. Induction of precocious puberty in heifers III: Hastened reduction of estradiol negative feedback on secretion of luteinizing hormone. *J. Anim. Sci*., **84**: 2050–2056.

Gaur, M. and G. N. Purohit. 2007. Follicular dynamics in Rathi (*Bos indicus*) cattle. *Vet. Arhiv.* **77** (2): 177-186.

Geary, T. W., J. C. Whittier, D. M. Hallford, and M. D. MacNeil. 2001. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols. *J. Anim. Sci*. **79**:1–4.

Ginther, O. J., D. R. Bergfelt, M. A. Beg and K. Kot. 2002. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. *Reprod*., **124**:475-482.

Ginther, O. J., M. C. Wiltbank, P. M. Fricke, J. R. Gibbons and K. Kot. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.*, **55**:1187-1194.

Gonçalves, P. R. D., V. M. Poretla, R. Ferreira and B.G. Gasperin. 2010. Role of angiotensin II on follicle development and ovulation. *Anim. Reprod*., **7**(3): 140-145.

Gong, J. G., T. Bramley and R. Webb. 1991. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol. Reprod.,* **45**: 941-949.

Gonzalez, A., H. Wang, T. D. Carruthers., B. D. Murphy. and R. J. Mapletoft. 1994. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effects of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *Can. Vet. J.* **35**: 158–162.

Gonzalez, A., J. G. Lussier, T. D. Carruthers, B. D. Murphy and R. J. Mapletoft. 1990. Superovulation of beef heifers with Folltropin: a new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogeno.,* **33**:519-529.

Gordon, I. 2003. Laboratory production of cattle embryos, 2nd Edition, CABI Publishing UK. pp. 548.

Greve, T., H. Callesen,. P. Hyttel, R. Hoier and R. Assey. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogeno.,* **43**(1): 41-50.

Hasler, J. F. 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J. Dairy. Sci*, **75**:2857-2879.

Hasler, J. F., A. D. McCauley, E. C. Schermerhorn and H. Foote 1983. Superovulatory responses in Holstein cows. *Theriogeno.,* **19**:83-99.

Havlicek, V., M. Lopatarova, S. Cech, R. Dolezel, T.Huber, A. Pavlok, G. Brem and U. Besenfelder. 2005. In vivo culture of bovine embryos and quality assessment of in vivo vs. in vitro produced embryos. *Vet. Med. Czech.,* **50** (4): 149–157.

Hunter, R. H. F. 1980. Mating, sperm transport in the female genital tract, and artificial insemination. *In*: Physiology and technology of reproduction in female domestic animals: Nova York, NY: Academic Press. 105-118.

Hunter, R. H. F. and I. Wilmut. 1983. The rate of functional sperm transport into the oviducts of mated cows. *Anim. Reprod. Sci*., **5**:167–173.

Hyland, A. ,G. E. Seidel,R. M. Enns , R. K. Peel and J. C. Whittier. 2009**.** Intervals of five or seven days between controlled internal drug-release insertion, gonadotropin-releasing hormone, and prostaglandin F2α injections: Effects on pregnancy rate and follicular size. *Prof. Anim. Sci.* **25**: 150–154.

Ideta, A., S. Iwasa, T. Takedomi, M. Konishi, S. Sakai, Y. Okamoto, M. Urakawa, A. Miyamoto and Y. Aoyagi. 2005. Pregnancy rates in recipient heifers after administration of human chorionic gonadotropin or a gonadotropin-releasing hormone agonist on day five of the estrous cycle. *Theriogeno*., **59**:359 (Abstr.).

Islam, R.. 2011. Synchronization of estrus in cattle: A Review. *Vet. World*., **4**(3):136-141.

JLTA, Japan Livestock Technology Association . 1995. Manual of bovine embryo transfer: cryopreservation of embryos. pp. 259-315.

Kaidi, S., S. Bernard, P. Lambert, A. Massip, F. Dessy, and I. Donnay. 2001. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Bio. Rep*., **65**: 1127–1134.

Kanitz, W. 2003. Follicular dynamic and ovulation in cattle – a review. *Arch. Tierz. Dum*., **46** (2): 187-198.

Kanitz, W., F. Becker, F. Schneider, E. Kanitz, C. Leiding, H. Nohner and R. **Pöhland.** 2002. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod. Nutr. Dev*., **42**:587-599.

Khurana, N. K. and H. Niemann. 2000. Effect of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts erived in vitro or in vivo. *Theriogen*o., **54**:313-326.

Kim, H., Son D.S., Yeon S.H., Choi S.H., Park S.B., Ryu I.S., Suh G.H., Lee D.W., Lee C.S., Lee J.H. and J.T. Yoon .2001. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogeno.,* **55**: 937–945.

Kishida, K., T. Nishisouzu, M. Iwata, O. Dochi and H. Koyama. 2004. The onset and duration of ovulation in dairy cows superovulated following synchronization of follicle wave with CIDR and estradiol benzoate. *Reprod. Fertil. Dev.*, **16**:288-289.

Kobayashi, J., A. Sekimoto, H. Uchida, T. Wada, K. Sasaki, H. Sasada, M. Umezu and E. Sato. 1998. Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence in situ hybridization. *Mol. Rep. Dev.*, **51**: 390–394.

Kohram, H., D. Bousquet, J. Durocher and L. A. Guilbault. 1998. Alteration of follicular dynamics and superovulatory responses by gonadotropin releasing hormone and follicular puncture in cattle: a field trail. *Theriogeno.,* **49**: 1165-1174.

Kuwayama, M., 2005. Evidence-based embryo cryopreservation. *J. Mamm. Ova. Res*., **22**: 28-32.

Lamb, G. C., C. R. Dahlen, J. E. Larson, G. Marquezini and J. S. Stevenson. 2010. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: A review. *j. anim. sci.*, **88**:E181-E192.

Lamb, G. C., J. E. Larson, T. W. Geary, J. S. Stevenson, S. K. Johnson, M. L. Day, R. P. Ansotegui, D. J. Kesler, J. M. DeJarnette and D. G. Landblom. 2006. Synchronization of estrus and artificial insemination in replacement beef heifers using gonadotropinreleasing hormone, prostaglandin $F_{2\alpha}$ and progesterone. *J. Anim. Sci*., **84**:3000-3009.

Lee, J. H., J. H. Park, S. H. Lee, C. S. Park and D. I. Jin. 2004. Sexing using single blastomere derived from IVF bovine embryos by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Theriogeno.,* **62**: 1452–1458.

Leemaster, J. W., R. C. Seals, F. M. Hopkins and F. N. Schrick. 1999. Effects of administration of oxytocin on embryonic survival in progesterone-supplemented cattle. *Prostag*., **57**: 259–268.

Leibo S. P. and N. M. Loskutoff. 1993. Cryobiology of in vitro-Derived Bovine Embryos. *Theriogeno.,* **39**:81-94.

Lerner, S. P., W. V. Thayne, R. D. Baker, T. Hensche, S. Meredith, E. K. Inskeep, R. A. Dailey, P. E. Lewis and R. L. Butcher. 1986. Age dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.*, **63**:176-183.

Lindsell, C. E., K. Rajkumar, A.W. Manning, S. K. Emery, R. J. Mapletoft and B. D. Murphy. 1986. Variability in FSH:LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. *Theriogeno.,* **25**:167 (Abstract).

Lopatarova, M., S. Cech, V. Havlicek and L. Holy. 2002. Effect of vitrification in open pulled straws on survival of bovine embryos from superovulated cows. *Acta. Vet. Brun.*, **71**: 93–99.

Lopatarova, M., S.Cech, L. Holy and R. Dolezel. 2006. The effect of vitrificationin open pulled straws on pregnancy rates after transfer of *in vivo* produced bovine embryos. *Vet. Med.*, **51**(9): 454–460.

Lopatarova, M., S. Cech, P. Krontorad, L. Holy, J. Hlavicova and R. Dolezel. 2007. Lower quality bovine embryos may be successfully used for sex determination. *Vet. Med.*, **52**(12): 540–546.

Lopatarova, M., S. Cech, P. Krontorad, L. Holy, J. Hlavicova and R. Dolezel. 2008. Sex determination in bisected bovine embryos and conception rate after the transfer of female demi-embryos**.** *Vet. Med.*, **53**(11): 595–603**.**

Lopes da Costa, L., J. Chagas e Silva, P. Diniz and R. Cidadão. 2002. Preliminary report on sexing bovine pre-implantation embryos. under the conditions of Portugal. *RPCV*, **97** (542) 95-98

Lopes, R. F. F., F. Forell, A. T. D. Oliveira and J. L. Rodrigues. 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogeno.,* **56**:1383–1392.

Machaty, Z., A. Paldi, T. Csaki, Z. Varga, I. Kiss, Z. Barandi and G. Vajta. 1993. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Fert.*, **98**: 467–470.

Macháty, Z., A. Páldi, T. Csáki, Z. Varga, I. Kiss, Z. Bárándi and G. Vajta. 1993. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Rep. Fert.*, **98**:467-470.

Macmillan, K. L. and C. R. Burke. 1996. Effects of estrous cycle control on reproductive efficiency. *Anim. Reprod. Sci.,* **42**:307-320.

Malhi, P. S., G. P. Adams, R. J. Mapletoft and J. Singh. 2007. Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. *Reprod.*, **134**:233-239.

Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: laboratory manual. *Cold Spring Harbor/ NY*.507-520.

Manual of the International Embryo Transfer Society. 1998. A procedure guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. *ed. Savoy, IL: IETS*. 3rd.

Mapletoft, R. J., A. Gonzalez and J. G. Lussier. 1988. Superovulation of beef heifers with Folltropin or FSH-P. *Theriogeno.,* **29**: 274 (Abstract).

Mapletoft, R. J., K. B. Steward and G. P. Adams. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, **42**:601–11.

Martínez, M., D, Bergfelt, G. Adams, J. Kastelic and R. Mapletoft. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.,* **57**: 23-33.

Martínez, M. F., G. P. Adams, J. P. Kastelic, D. Bergfelt and R. J. Mapletoft. 2000. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogeno.,* **54**: 757-769.

Martinez, M. F, J. P. Kastelic, G. P. Adams, B. Cook, W. O. Olson and R. J. Mapletoft. 2002. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogeno.,* **57**:1049-1059.

Martins, C. M., J. R. S. Torres-Junior, L. U. Gimenes, A. H. Souza and P. S. Baruselli. 2006. Superovulação com eCG ou FSH em doadoras Nelore (Bos indicus) inseminadas em tempo fixo. *Acta. Sci. Vet*., **34**:527-537.

Massip, A., P. Mermillod, and A. Dinnyes. 1995. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: Implication for their cryopreservation. *H. Reprod.,* **10**: 3004-3011.

Matthews, M. E. and K. C. Reed. 1992. Sequences from a family of bovine Ychromosomal repeats. *Geno.*, **13**(4) 1267-1273.

Mattos, R. A., A. Guzeloglu, L. Badinga, C. R. Staples and W. W. Thatcher. 2003. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon-tau modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F2 alpha and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-A2 in bovine endometrial cells. *Biol. Reprod*., **69**: 780–787.

McEvoy, T. G. J. J. Robinson, R. P. Aitken, P. A. Findlay, Palmer R. M. and I.S. Roberston. 1995. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in vitro development of their ova. *Anim. Reprod. Sci*, **39**:89-107.

Mikkola, M., P. Mäntysaari, N. Tammiranta,J. Peippo and J. Taponen. 2005. Effect of dietary protein on embryo recovery rate and quality in superovulated heifers. *Anim. Reprod. Sci*., **87**: 193-202.

Monk, M. and A.H. Handyside. 1988. Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. *J. Rep. Fert.*, **82**: 365–368.

Monniaux, D., D. Chupin and J. Saumande. 1983 Superovulatory responses of cattle. *Theriogeno.*,**19**: 55-81.

Moor, R. M., J. C. Osborn and I. M. Crosby. 1985. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after ovulation. *J. Rep. Fert.*,**74**: 167-172.

Moreira, F., F. F. Paula-Lopes, P. J. Hansen, L. Badinga and W.W. Thatcher. 2002a. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogeno.,* **57**: 895–907.

Moreira, F., L. Badinga, C. Burnley and W. W Thatcher. 2002b. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogeno.,* **57**: 1371–1387.

Mtango, N. R., M. D.Varisanga, Y. J. Dong, R. Rajamahendran and T. Suzuki. 2003. Growth factors and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. *Theriogeno.,* **59**:1393–1402.

Murphy, B. D. and S. D. Martinuk. 1991.Equine chorionic gonadotropin. *Endocr. Rev*., **12**: 27-44.

Mustapha, F., I. Gharbi, D. Adel, M. Lafri, K. Touati, R. Kaidi and D. Guetarni. 2008. Production and transfer of embryos in Algerian "Cheurfa" bovine breed. *Afr. J. Agri. Res.,* **3**: (4) 320-323.

Nasser, L. F., E. L. Reisa, M. A. Oliveira, G. A. Bó and P. S. Baruselli. 2004. Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus x Bos taurus* recipients. *Theriogeno.,* **62**:1577-1584.

Newcomb, R. 1980. Investigation of factors affecting superovulation and non-surgical embryo recovery from lactating British Friesian cows. *Vet. Rec*., **106**:48-52.

Nilchuen, P., S. Rattanatabtimtong and S. Chomchai. 2011. Superovulation with different doses of follicle stimulating hormone in Kamphaeng Saen beef cattle. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. **33** (6): 679-683.

Nishigai, M., H. Kamomae, T. Tanaka and Y. Kaneda. 2002. Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. *Theriogeno*. **58**:1597-1606.

Page, R. D., J. E. Jordan and S. K. Johnson. 1985. Superovulation of Holstein heifers under heat stress with FSH-P or Folltropin, *Theriogeno.,* **31**:236. (abstract).

Park, J. H., J. H. Lee, K.M. Choi, S. Y. Joung, J. Y. Kim, G. M. Chung, D. I. Jin and K. S. Im. 2001. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. *Theriogeno.,* **55**: 843–853.

Peralta-Torres, J., J. Ake-Lopez, F. Centurion-Castro and J. Magana-Monforte. 2010. Comparison of estradiol cypionate and estradiol benzoate effects on ovaric activity, estrus and ovulation on anestrus bos indicus cows. *J. Anim. Vet. Adv*., **9**(3): 466-470.

Phua, A. C. Y., Abdullah R. B. and Z. Mohamed. 2003. A PCR-Based sex determination method for possible application in caprine gender selection by simultaneous amplification of the Sry and Aml-X genes. *J. Reprod. Dev*., **49**: 307-311.

Pomp, P., B. A. Good., R. D. Geisert, C. J. Corbin and A. J. Conley 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effect on diameter of day-10 or -11 pig embryos. *J. Anim. Sci.*, **73**: 1408–1415.

Prashant, D., S. Gour, P. P. Dubey, A. Jain, S. C. Gupta, B. K. Joshi, D. Kumar. 2008. Sex determination in 6 bovid species by duplex PCR. *J. Appl. Genet*., **49**(4): 379–381.

Pursley, J. R., M. O. Mee and M. C. Wiltbank .1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2α and GnRH. *Theriogeno.,* **44**: 915–923.

Quaresma, M. A., L. Lopes da Costa and J. Robalo Silva. 2003. Superovulation of Mertolenga cows with two FSH preparations FSH-P and Folltropin. *RPCV*, **98** (546) :81-84.

Rajamahendran, R. and C. Taylor. 1991. Follicular dynamics and temporal relationships among body temperature, oestrus, the surge of luteinizing hormone and ovulation in Holstein heifers treated with norgestomet. *J. Reprod. Fertil*., **92**:461–467.

Rall, W. F. and S. P. Leibo. 1987. Production of sexed bovine pregnancies by cytogenetic analysis of cultured demiembryos. *Theriogeno.,* **27**: 269-279.

Rathbone, M. J., J. E. Kinder and K. Fike. 2001. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Adv. Drug Del. Rev*., **50**:277-320.

Rettmer, I., J. S. Stevenson and L. R. Corah. 1992. Endocrine responses and ovarian changes in inseminated dairy heifers after an injection of a GnRH agonist 11 to 13 days after estrus. *J. Anim. Sci.*, **70**:508-517.

Revah, I. and W. R. **Butler** 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil*., **106**:39-47.

Ribeiro Filho‹ A. de. L.‹ R. F. Bittencourt‹ A. P. M. Portela‹ D. S. Freitas‹ A. K. Almeida‹ A. A. B. Silva‹ R. C. M. Santana and M. Chalhoub. 2004**.** Effect of the estrous synchronization protocol on the superovulatory response in a program of zebus embryo transfer. *Acta Scientiae Veterinariae* **32***(Suplement***)**

Richards, J. S. 2005. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol. Cell Endocrinol*., **234**:75-79.

Rieger, D., J. W. Polard and S. P. Leibo. 1993. The effect of cryopreservation on the metabolic activity of in vitro produced cattle blastocyst. *Cryobiol*., **30**: 631.

Saacke, R. G., J. C. Dalton, S. Nadir, R. L. Nebel and J. H. Bame. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci*., **60/61**, 663–677.

Saacke, R. G., J. M. DeJarnette, J. H. Bame, D. S. Karabinus, and S. S. Whitman. 1998. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle?. *Theriogeno.,* **50**:117–128.

Saghai-Maroof, M.A., K. M. Soliman, R. A. Jorgenson and R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance‹ chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA‹* **81**: 8014-8018.

Sahatpure, S. K. and M. S. Patil .2008. Synchronisation of oestrus with Prostaglandin F2 alpha analogue in non-descript cow. *Vet. World*, **1**(7): 203-204.

Sales, J. N. S. and J. C. Souza. 2005. Timing of artificial insemination and embryo production in superovulated Holstein cattle. *Anim. Reprod.*, **2**(3): 183-186.

Sambrook J.‹ T. Maniatis and E. F. Fritsch. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory‹* New York. pp. 12.

Sangsritavong, S., D. K. Combs, R. Sartori, L. E. Amentano and M. C. Wiltbank. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17_ in dairy cattle. *J. Dairy Sci*. **85**: 2831–2842.

Santos, J. E. P., S. O. Juchem, R. L. A Cerri, K. N. Galvão, R. C. Chebel, W. W. Thatcher, C. Dei and C. Bilby. 2004. Effect of bST and reproductive management on reproductive and lactational performance of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* **87**: 868–881.

Sartoreli, E. S., L. M. Carvalho, D. R. Bergfelt, O. J. Ginther and M. C. Barros. 2005. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogeno*. **63**(9): 2382-2394.

Sartori, R., A. Gümen, J. N. Guenther, A. H. Souza, D.Z. Caraviello and M. C. Wiltbank. 2006. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogeno., **65***: 1311–1321.

Sartori, R., P. M. Fricke, J. C. P. Ferreira, O. J. Ginther and M. C. Wiltbank. 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod*., **65**:1403–1409.

Sartori, R., R. S. Bergfelt, S. A. Mertens, J. N. Guenther, J. J. Parrish and M. C. Wiltbank. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci*., **85**: 2803-2812.

Sato, T., K. Nakada, Y. Uchiyama, Y. Kimura, N. Fujiwara, Y. Sato, M. Umeda and T. Furukawa. 2005. The effect of pretreatment with different doses of GnRH to synchronize follicular wave on superstimulation of follicular growth in dairy cattle., *J. Reprod. Dev*., **51:** (5):573-578.

Sayed, H., H. Kayyal, L. Ramsey, S. Ceccarelli and M. Baum. 2002. Segregation distortion in doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare L*.) detected by simple sequence repeat (SSR). *Euphytica*., **225**: 265-272.

Schiewe, M. C., C. R. Looney, C. A. Johnson, K. G. Hill and R. A. Godke. 1987. Transferable embryo recovery rates following different insemination schedules in superovulated beef cattle. *Theriogeno.,* **28**:395-406.

Shaw, J. M., A. Oranratnachai and A. O. Trounson. 2000. Fundamental cryobiology of mammalianoocytes and ovarian tiissue. *Theriogeno.,* **53**: 59–72.

Shea, B. F. 1999. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. *Theriogeno.,* **51**: 841–854.

Silcox, R. W., K. L. Powell and T. E. Kiser. 1993. Ability of dominant follicles (DF) to respond to exogenous GnRH administration is dependent on their stage of development. *J. Anim. Sci*. **71**(Suppl. 1):219 (Abstr.).

Sirois, J. and J. E. Fortune. 1988. Follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real time ultrasongraphy. *Biol. Reprod.* **39**:308–317.

Solti, L., E. G. Crichton, N. M. Loskutoff and S. Cseh. 2000. Economical and ecological importance of indigenous livestock and application of assisted reproduction to their reservation. *Theriogeno.,* **53**:149-162.

Son, D. S., C. Y. Choe , S. R. Cho , S. H. Choi , H. J. Kim and I. H. Kim. 2007. The effect of reduced dose and number of treatments of FSH on superovulatory response in CIDR-treated Korean native cows. *J. Reprod. Dev*., **53**(6):1299-1303.

Souza, A. H., R. Sartori, J. N. Guenther, D. Caraviello, R. Monson and M. C. Wiltbank. 2007. Effect of semen source and dose of FSH on superovulatory response and embryo production in Holstein heifers *Anim. Reprod.,* **4** (3/4)70-76.

Stock, A. E., J. E. Ellington and J. E. Fortune. 1995. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogeno.,* **45**:1091-1102.

Sudano, J. S., M. A. Alvarenga, F. D. C. L. Alvarenga and R. Machado. 2009. Ovulation failure after superovulatory treatment with eCG in nellore (Bos taurus indicus) cattle. *Vet. Zoo.*, **16**(4): 592-600.

Supriatna I., T. L. yusuf, B. Purwantara, G. Moekti and L. P. Hernomoadi. 1998. Study on the application of human chorionic gonadotropin (hCG) in dairy cow superovulated with pregnant mare serum gonadotropin-monoclonal antibody (PMSG-MoAb) anti PMSG. *Media. Vet.*, **5**(2): 15-20.

Tadesse, M., J. Thiengtham, A. Pinyopummin, S. Prasanpanich and A. Tegegne. 2011. Estrus performance of Boran and Boran ×Holstein Friesian crossbred cattle synchronized with a protocol based on estradiol benzoate or gonadotrophin-releasing hormone. *Kasetsart J. Nat. Sci.,* **45**: 221 – 232.

Takagi, M., I. H. Kim, F. Izadyar, P. Hyttel, M. M. Bevers, S. J. Dieleman, P. J. Hendriksen and P. Vos. 2001. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. *Reprod.*, **121**:941-951.

Thatcher, W. W., A. Guzeloglu, R. Mattos, M. Binelli, T. R. Hansen and J. K. Pru. 2001. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogeno.,* **56**: 1435–1450.

Tominaga, K. and Y.Hamada. 2004. Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine in-vitro produced blastocysts. *Theriogeno.,* **61**: 1181–1191.

Vajta, G., N. Rindom, T. T. Peura, P. Holm, T. Greve and H. Callesen .1999.The effect of media, serum, and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogeno.,* **52**: 939–948.

Vajta, G., P. Holm, T. Greve and H. Callesen. 1995. Direct in-straw rehydration after thawing of vitrified in vitro produced bovine blastocysts. *Vet. Rec*., 137: 672.

Viana, J. H. M., A. D. M. Ferreira, W. Ferreira and L. S. D. A. Camargo. 2000. Follicular dynamics in Zebu Cattle. *Pseq. Agropec. Bras*., **35**: 2501-2509.

Wan, Q. H., X. Q., K. X. Qian and S. G. Fang. 2003. A simple DNA extraction and rapid specific identification technique for single cells and early embryos of two breeds of *Bos Taurus. Anim. Rep. Sci.* **77**: 1–9

Willett, G. S. and J. K. Hillers. 1994. Analysing the economics of alternative dairy embryo transfer technology. Agricultural Economics Staff Paper A.E. 94-8, Washington State University, Pullman, WA, USA.

Willmott, N., J. Saunder, G. A. Bo, A. Palasz, R. A. Pierson and R. J. Mapletoft. 1990. The effect of LH/FSH ratio in pituitary extracts on superovulatory response in the cow. *Theriogeno.,* **33**:347. (abstract).

Wolfenson, D., W. W. Thatcher, J. D. Savio, L. Badinga and M. C. Lucy.1994. The effect of a GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating dairy cows. *Theriogeno.,* **42**: 633–644.

Xu, Z. Z., G. A. Verkerk, J. F. Mee, S. R. Morgan, B. A. Clark and L. J. Burton. 2000. Progesterone and follicular changes in postpartum noncyclic dairy cows after treatment with progesterone and estradiol or with progesterone GnRH PGF2α and estradiol. *Theriogeno.,* **54**:273–282.

Yaakub, H., P. Duffy, D. O'Callaghan and M. P. Boland. 1998. Effect of timing of oestradiol benzoate injection relative to gonadotropin treatment on superovulatory response, and on embryo yield and quality in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.,* **52**(3): 191-204.

Yadav, M. C., J. S. Walton and K. E. Leslie. 1986. Timing of the onset and duration of ovulation in superovulated beef heifers. *Theriogeno.,* **26**:509–521.

Yu, W., S. Li, J. Fang, X. Sun, L. Cui, J. Fu, Y. Bai, Y. Fang and B. Shangguan. 2006. Field studies on the effectiveness of the YCD embryo sexing technique in bovine. *Rep. Fert. Dev.*, **19**:299–300.

السيرة الذاتية

الاسم الثلاثي: ماجد زهيرالدكاك **مكان الولادة:** دمشق.

تاريخ الولادة: 1979 **الوضع العائلي:** متزوج **الجنسية:** عربي سوري.

عنوان العمل الحالي: ريف دمشق –إدارة بحوث الثروة الحيوانية– محطة بحوث دير الحجر لتحسين الأبقار الشامية.

الشهادات الحاصل عليها:

الشهادة الدراسية	سنة	الجامعة	مجال التخصص

1- إجازة في الزراعة	2002	دمشق	إنتاج حيواني- مجترات
2- دبلوم في الزراعة	2003	دمشق	إنتاج حيواني- مجترات-تغذية
3- ماجستير	2008	دمشق	إنتاج حيواني-مجترات-فيزيولوجيا تناسل

النشاطات العلمية:

- المشاركة بأسبوع العلم بحلب-2008 ببحث عنوانه" ديناميكية الحويصلات المبيضية خلال دورة الشبق في بكاكير الأبقار الشامية".
- المشاركة بمؤتمر البحوث العلمية الزراعية عام 2010 بعنوان" الفترة بين الولادتين وبعض العوامل المؤثرة فيها عند الأبقار الشامية".
- المشاركة بمؤتمر البحوث العلمية الزراعية عام 2011 بعنوان" تأثير عدد مرات الجمع في بعض مواصفات السائل المنوي لتيوس الماعز الشامي".

الأبحاث التي قبلت للنشر من الأطروحة:

عنوان البحث	الأسماء المشاركة	اسم المجلة	رقم وتاريخ الموافقة
تأثير حقن GnRH أو hCG خلال دورة الشبق في ديناميكية الحويصلات المبيضية للأبقار الشامية	م. ماجد الدكاك أ. د. سليمان سلهب د. المعتصم بالله الدقر	مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية	3157/ص تاريخ 2011/10/18
استجابة الأبقار الشامية للإباضة الفائقة وإنتاج الأجنة	م. ماجد الدكاك أ. د. سليمان سلهب د. المعتصم بالله الدقر	المجلة الأردنية في العلوم الزراعية	5/2-1195 تاريخ 2012/3/13
وقت التلقيح الاصطناعي الأمثل في برامج الإباضة الفائقة للأبقار الشامية	م. ماجد الدكاك أ. د. سليمان سلهب د. المعتصم بالله الدقر	المجلة العربية للبيئات الجافة	9/247 مج أ ص تاريخ 2012/5/15
فعالية هرمون مصل دم الفرس الحامل (PMSG) في تحريض الإباضة الفائقة وإنتاج الأجنة في الأبقار الشامية	ماجد الدكاك أ. د. سليمان سلهب د. المعتصم بالله الدقر	المجلة العربية للبيئات الجافة	5/221 مج أ ص تاريخ2012/7/8

Ministry of Higher Education
University of Damascus
Faculty of Agriculture
Department of Animal Production

Production and Transfer of Embryos in Shami Cattle

Ph. D.Thesis

Presented to the Faculty of Agriculture

In partial Fulfillment of the Requirement for Doctorate Degree

in Animal production - Reproductive Physiology

by

Majed AL-Dakkak

(Msc. in Animal Production)

Supervised by

Prof. Dr. Solieman Salhab **&** **Dr. AL-Moutassem Billah AL-Daker**

Faculty of Agriculture
Department of Animal Production

General Commission for Scientific
Agricultural Research

Damascus- 2012

Abbreviations المختصرات

AI: Artificial Insemination	التلقيح الصناعي
CIDR: Controlled Intra-Vaginal Drug Release Device	لولب مهبلي
CL : Corpus Luteum	الجسم الأصفر
DF: Dominant Follicle	جريب سائد
E_2 : Estradiol 17-β	هرمون الإستراديول 17 بيتا
ET: Embryo Transfer	نقل الأجنة
FISH: Fluorescent In Situ Hybridization	التهجين التألقي في الموضع الأصلي
FSH : Follicular Stimulating Hormone	هرمون منشط لنمو الجريبات
GnRH : Gonadotrophin Releasing Hormone	هرمون محرر لموجّهة القند (الغدد التناسلية)
hCG: Human Chorionic Gonadotropin	هرمون بول المرأة الحامل (موجهة القند المشيمي البشري)
iu: international unit	و.د.: وحدة دولية
LH : Luteinizing Hormone	هرمون اللوتنة
OD : Optical Density	الكثافة الضوئية
P_4 : Progesterone	هرمون البروجسترون
PCR: Polymerase Chain Reaction	تفاعل البوليميريز المتسلسل
PG: Prostaglandin	البروستاغلاندين
PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropin	هرمون مصل دم الفرس الحامل
SOV: Superovulation	الإباضة المتعددة