الجمهورية العربية السورية
جامعــة دمشــق
كليــة الهندسة الزراعـيـة
قسم الإنتـاج الحيواني

فعالية محاليل تمديد محلية في الحفظ القصير والطويل الأمد للسائل المنوي والقدرة الإخصابية في غنم العواس

Efficiency of Local Diluents in Short and Long-Term Preservation of Semen and Fertilizability in Awassi Sheep

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية (إنتاج حيواني)

إعداد

المهندس رامي حسين خلوف

بإشراف

الاستاذ الدكتور سليمان سلهب
كلية الزراعة - جامعة دمشق

الاستاذ الدكتور محمد ربيع المرستاني
كلية الزراعة - جامعة دمشق

٢٠١٠ م / ١٤٣١ هـ

فعالية محاليل تمديد محلية في الحفظ القصير والطويل الأمد للسائل المنوي والقدرة الإخصابية في غنم العواس

إعداد

رامي حسين خلوف

نوقشت هذه الأطروحة على المدرج الجديد في كلية الزراعة
جامعة دمشق بجلسة علنية بتاريخ ٢٠١٠/٩/١٤ وأجيزت

لجنة الحكم

الدكتور سليمان سلهب	**الدكتور جهاد مسوح**	**الدكتور شحادة قصقوص**
الأستاذ في كلية الزراعة جامعة دمشق	الأستاذ في كلية الطب البيطري جامعة البعث	الأستاذ في كلية الزراعة جامعة دمشق

قال تعالى في محكم تنزيله

بسم الله الرحمن الرحيم

"وَالْأَنْعَامَ خَلَقَهَا لَكُمْ فِيهَا دِفْءٌ وَمَنَافِعُ وَمِنْهَا تَأْكُلُونَ"

صدق الله العظيم

النحل /٥/

تصريح

أصرح بأن هذا البحث (فعالية محاليل تمديد محلية في الحفظ القصير والطويل الأمد للسائل المنوي والقدرة الإخصابية في غنم العواس) لم يسبق أن قبل للحصول على أية شهادة، ولا هومقدم حالياً للحصول على أية شهادة أخرى.

المرشح

رامي حسين خلوف

Declaration

The work reported in this Thesis (Efficiency of Local Diluents in Short and Long-Term Preservation of Semen and Fertilizability in Awassi Sheep) has not been submitted previously to get a certificate and is not submitted Now to get a degree at any other university.

Candidate
Rami Hussien Khlouf

شهادة

نشهد بأن العمل المقدم في هذه الرسالة هونتيجة بحث علمي قام به المرشح رامي حسين خلوف بإشراف الأستاذ الدكتور سليمان سلهب، والأستاذ الدكتور محمد ربيع المرستاني من قسم الإنتاج الحيواني في كلية الزراعة– جامعة دمشق، وإن أية مراجع ذكرت في هذا العمل موثقة في نص الرسالة.

المرشح

المهندس رامي خلوف

إشراف

الأستاذ الدكتور سليمان سلهب **الأستاذ الدكتور محمد ربيع المرستاني**

السادة أعضاء لجنة الحكم

الأستاذ الدكتور سليمان سلهب الأستاذ الدكتور شحادة قصقوص الأستاذ الدكتور جهاد مسوح

Certification

We certify that this work is a result of scientific research carried out by the candidate Rami Khlouf under the supervision of Prof. Dr. Solieman Salhab and Prof. Dr. Mohammad Rabea Al-Merestani, Department of Animal Production, Collage of Agriculture, Univ. of Damascus.

Candidate
Rami khlouf

Supervised by

Prof. Dr. Solieman Salhab

Prof. Dr. M. Rabih Al-Merestani

Refereed Committee

Dr. Solieman Salhab	Dr. Chehadeh Kaskous	Dr. Gihad Massouh
Collage of Agriculture	Collage of Agriculture	Collage of Veterinary Medicine

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات الحصول على درجة الماجستير في الإنتاج الحيواني

This thesis is submitted in accordance with the requirements of Damascus University for the Master degree in Animal Production

الإهداء

إلى جذور السنديان القوية التي تمسك بنا بقوة وتزهر من أجلنا غطاء
وتورق لنا ظلا من الدفء والأمان، إلى قوتي ووجودي.....

أبي الغالي

إلى ياسمين الروح وزنبقةالحياة
إلى من يمسح وجودها الألم والحزن
إلى بحر زهور العطاء
إلى نفسي وروحي وحياتي...غاليتي.....

أمي الحنونة

إلى زهور قلبي وحمامات السلام التي تبهجني
إلى صقور منزلي الذين يظللونني بالرعاية والإهتمام
إلى من تكون الحياة بينهم أجمل وتزول برؤيتهم مخاوف المستقبل.....

أخوتي وأخواتي

هبة عظيمة منحها الله لي
أصدقاء ساندوني في آلامي وشاركوني أفراحي
لكم مني كل الحب والتقدير.....

أصدقائي

إلى ذلك الخبر الآتي مع الريح ليؤذن ببداية انفتاح القلب على الحقيقة
إلى كل الذين أحبهم.....

كلمة شكر

حظي البحث العلمي بالاهتمام المطلوب لدى كافة القطاعات في الجمهورية العربية السورية وعلى رأسها وزارة التعليم العالي التي أرست قواعد البحث العلمي، وشجعت طلاب الدراسات العليا على إكمال مشاريعهم وطموحاتهم في التحصيل العلمي. وضمن هذا الإطار، فقد وفقني الله إلى تنفيذ هذا البحث في موضوع محاليل تمديد السائل المنوي وإنجازه إذ لم يتطرق له أي من الباحثين محلياً. وأتقدم بجزيل الشكر والعرفان لكل من ساعد في تنفيذ وإنجاز هذا البحث الذين لم يألوا جهداً في تقديم العون والمساعدة في كافة مراحله وأخص بالذكر كلاً من:

* الأستاذ الدكتور سليمان سلهب، كلية الزراعة– جامعة دمشق. الذي تكرم بالإشراف على هذا البحث وتتبع خطوات تنفيذه وتذليل كافة الصعوبات والمشاكل التي صادفتني أثناء إعداده، مع خالص التمنيات بالتوفيق الدائم والدعاء النابع من القلب بأن تكتب جهوده المظفرة في صفيحة أعماله لترفعه إلى الدرجات العلا في الدنيا والآخرة.

* الأستاذ الدكتور محمد ربيع المرستاني، كلية الزراعة– جامعة دمشق، وإدارة الثروة الحيوانية في المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد). أتشرف بأن يندرج اسمي في قائمة طلاب الدراسات العليا الذين تتلمذوا على يديه وجزاه الله عني كل خير على ملاحظاته وتوجيهاته.

* الطبيب البيطري رسلان أبورومية، إدارة الثروة الحيوانية في أكساد، الذي كان له الفضل الكبير في تدريبي على الأدوات والأجهزة اللازمة لإنجاز البحث.

* مركز المكافحة الحيوية، كلية الزراعة، الذي وفر الإمكانيات اللازمة التي ساعدت على تقويم بعض الصفات المدروسة.

* جميع الأساتذة الكرام في كلية الزراعة وأخص بالذكر أساتذة قسم الإنتاج الحيواني.

* المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد) الذي وفر لي كل الإمكانات لإنجاز هذا البحث في مختبر التلقيح الإصطناعي ونقل الأجنة.

فهرس المحتويات

رقم الصفحة

أولاً: المقدمة Introduction ١٧

١-١ محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض ٢٠
Sodium Citrate – Egg yolk Diluent

١-٢ محلول الحليب خالي الدسم Skimmed Milk Diluent ٢١

١-٣ محلول الأندروميد AndroMed ٢٢

١-٤ القدرة الإخصابية Fertilizability ٢٣

ثانياً: أهداف البحث Objectives ٢٥

ثالثاً: مواد البحث وطرائقه Materials and Methods ٢٧

رابعاً: النتائج Results ٤٠

خامساً: المناقشة Discussion ٥٦

سادساً: الإستنتاجات Conclusions ٦٠

سابعاً: التوصيات والمقترحات Recommendations and Suggestions ٦٠

ثامناً: المراجع References

٨-١ المراجع العربية ٦٣

٨-٢ المراجع الإنكليزية ٦٥

فهرس الجداول

رقم الصفحة

الجدول ١. مواصفات السائل المنوي ($\bar{x} \pm SD$) في كباش العواس. ٤٠

الجدول ٢. تحليل التباين لحيوية النطاف% و نسبة النطاف الميتة% بعد جمع السائل المنوي لكباش العواس. ٤١

الجدول ٣. تحليل التباين لحيوية النطاف% و نسبة النطاف الميتة% لكباش العواس بعد التمديد مباشرة. ٤١

الجدول ٤. تحليل التباين لحيوية النطاف% و نسبة النطاف الميتة% لكباش العواس قبل التجميد مباشرة. ٤٥

الجدول ٥. تحليل التباين لحيوية النطاف% و نسبة النطاف الميتة% لكباش العواس بعد الإذابة. ٤٦

الجدول ٦. تحليل التباين لحيوية النطاف (القدرة الإخصابية) و النطاف الميتة في السائل المنوي الممدد لكباش العواس خلال فترة التحضين على درجة ٤٥,٥ – ٤٧,٥مْ. ٤٩

الجدول ٧. النسبة المئوية لحيوية النطاف (القدرة الإخصابية) في السائل المنوي الممدد لكباش العواس خلال فترة التحضين على درجة ٤٥,٥–٤٧,٥مْ. ٥٢

الجدول ٨. النسبة المئوية للنطاف الميتة (القدرة الإخصابية) في السائل المنوي الممدد لكباش العواس خلال فترة التحضين على درجة ٤٥,٥–٤٧,٥مْ. ٥٤

الجدول ٩. معدل بقاء النطاف (الحيوية) ونسبة النطاف الميتة خلال مراحل مداولة السائل المنوي في كباش العواس. ٥٩

فهرس الأشكال

رقم الصفحة

الشكل ١. النسبة المئوية لحيوية النطاف ونسبة النطاف الميتة في السائل المنوي لكباش العواس بعد الجمع مباشرة. ٤٢

الشكل ٢. النسبة المئوية لحيوية النطاف في السائل المنوي لكباش العواس بعد التمديد مباشرة. ٤٣

الشكل ٣. النسبة المئوية للنطاف الميتة في السائل المنوي لكباش العواس بعد التمديد مباشرة. ٤٤

الشكل ٤. المتوسط العام لحيوية النطاف في السائل المنوي الممدد لكباش العواس قبل التجميد مباشرة. ٤٥

الشكل ٥. المتوسط العام للنطاف الميتة في السائل المنوي الممدد لكباش العواس قبل التجميد مباشرة. ٤٦

الشكل ٦. المتوسط العام لحيوية النطاف في السائل المنوي الممدد لكباش بعد الإذابة. ٤٧

الشكل ٧. المتوسط العام للنطاف الميتة في السائل المنوي الممدد لكباش بعد الإذابة. ٤٨

الشكل ٨. النسبة المئوية لحيوية النطاف(القدرة الإخصابية) في السائل المنوي الممدد لكباش العواس خلال فترة التحضين على درجة ٤٥,٥–٤٧,٥مْ. ٥٠

الشكل ٩. النسبة المئوية للنطاف الميتة في السائل المنوي الممدد لكباش العواس خلال فترة التحضين على درجة ٤٥,٥–٤٧,٥مْ. ٥٠

فهرس الصور

رقم الصفحة

الصورة ١.	تحضير السترات.	٢٧
الصورة ٢.	صفار البيض على ورق ترشيح.	٢٨
الصورة ٣.	إضافة البيض للسترات.	٢٨
الصورة ٤.	محلول الحليب.	٢٩
الصورة ٥.	المواد المستخدمة في الدراسة.	٢٩
الصورة ٦.	ميزان حساس.	٣٠
الصورة ٧.	حاضنة.	٣٠
الصورة ٨.	جهاز قياس الحموضة.	٣١
الصورة ٩.	جهاز قياس الضغط الحلولي.	٣١
الصورة ١٠.	محاليل التمديد في الحمام المائي.	٣٢
الصورة ١١.	أنثى الإثارة.	٣٢
الصورة ١٢.	مهابل إصطناعية.	٣٢
الصورة ١٣.	عملية جمع السائل المنوي.	٣٣

الصورة ١٤.	بعد الجمع مباشرة.	٣٣
الصورة ١٥.	مجهر ضوئي.	٣٣
الصورة ١٦.	عينة سائل منوي تحت المجهر.	٣٣
صورة ١٧.	شرائح ملونة.	٣٤
صورة ١٨.	نطاف مصبوغة.	٣٤
الصورة ١٩.	جهاز تمديد آلي (Dilutrer)	٣٤
الصورة٢٠.	مطياف ضوئي (Photometer)	٣٤
الصورة ٢١.	ألة تعبئة القشات.	٣٥
الصورة ٢٢.	حوامل القشات.	٣٥
الصورة ٢٣.	نظام التجميد.	٣٦
الصورة ٢٤.	منظم عملية التجميد.	٣٦
الصورة ٢٥.	صندوق التجميد.	٣٦
الصورة ٢٦.	حاسب فيه برنامج التجميد.	٣٦
الصورة ٢٧.	حامل القشات المجمدة.	٣٧
الصورة ٢٨.	خزان السائل الأزوتي.	٣٧

فعالية محاليل تمديد محلية في الحفظ القصير والطويل الأمد للسائل المنوي والقدرة الإخصابية في غنم العواس

الملخص

نفذت الدراسة في مخبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة التابع لمحطة بحوث إزرع في المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد)، خلال عامي ٢٠٠٨ و٢٠٠٩م. بهدف مقارنة فعالية محاليل التمديد المحلية (سترات الصوديوم مع صفار البيض، والحليب خالي الدسم)، وال Andromed كمحلول قياسي (أجنبي الصنع) في حفظ السائل المنوي لفترات قصيرة وطويلة الأمد ومع الحفاظ على قدرتها الاخصابية. استخدم أربعة ذكور من غنم العواس بعمر سنتين، وبمتوسط وزن ٧٥± ٣ كغ لجمع السائل المنوي مرة أسبوعيا من كل كبش، بمعدل قذفتين في كل مرة ولمدة ٤ أشهر خلال الفصل التناسلي. قيمت حيوية النطاف باستخدام المجهرالضوئي، وقدرت نسبة النطاف الميتة باستخدام صبغات خاصة في كل مرحلة من مراحل مداولة السائل المنوي. وقيمت القدرة الاخصابية كل ١٥ دقيقة من خلال معرفة مدى مقاومتها للحرارة العالية عند تحضين النطاف بعد الإذابة على درجة حرارة ٤٥,٥–٤٧,٥مْ ولمدة ٩٠ دقيقة.

بينت النتائج عدم وجود فرق معنوي في حيوية النطاف، ونسبة النطاف الميتة في السائل المنوي بعد الجمع مباشرة بين الكباش الأربعة، وبلغ متوسط الحيوية ٨١,١ % أما نسبة النطاف الميتة بلغت ١٤,٨ %. كما تبين وجود تأثير معنوي ($p < ٠,٠٥$) لمحاليل التمديد الثلاثة بالنسبة للحيوية بعد ٢,٥– ٣ ساعات من الجمع، وكانت أعلى قيمة للحيوية في محلول الشاهد وبلغت بالمتوسط ٧١,٧%، وأقل قيمة في محلول تمديد الحليب ٥٨,٥%، أما في محلول السترات فبلغت ٦٤,٨%، وبلغت نسبة النطاف الميتة بالمتوسط ٢٣,٩، و٣٣,٤، و٣٩,٨% للشاهد، والسترات، والحليب، على التوالي.

كذلك قدرت كل من الحيوية والنطاف الميتة بعد الإذابة في كل من المحاليل الثلاثة ضمن الكبش الواحد، وأظهرت نتائج الدراسة وجود فرق معنوي ($p < ٠,٠٥$) في مستوى الحيوية بين المحاليل المستخدمة، وبلغت بالمتوسط ٥٣,٣، و٤٢,٠، و١٨,٣% للشاهد، والسترات، والحليب على التوالي، وارتفعت نسبة النطاف الميتة في محلول الحليب إلى ٧٨,٩%، ووصلت في محلول السترات إلى ٥٦,٥%، أما في الشاهد فكانت ٤١,٩%. واشارت النتائج إلى وجود فرق معنوي ($p < ٠,٠٥$) في القدرة الإخصابية المخبرية للنطاف المجمدة في المحاليل المذكورة أنفاً،

وكان المحلول القياسي أفضل المحاليل في دعم مقاومة النطاف لظروف الإجهاد الحراري، حيث تناهت الحيوية إلى الصفر بعد ٩٠ دقيقة من التحضين في كل من محلولي الشاهد، والسترات، أما محلول الحليب كان الأسوء وتناهت الحيوية فيه إلى الصفر بعد ٧٥ دقيقة.
واستنتج أن محلولي الحليب، وسترات الصوديوم مع صفار البيض المصنعة محليا يمكن استخدامهما في تمديد السائل المنوي لكباش العواس عند استخدام السائل المنوي بشكل طازج وممدد في برامج التلقيح الاصطناعي. واقترح أن يعتمد على اختبار مقدرة النطاف بعد الاذابة في مقاومتها لحرارة التحضين على درجة حرارة ٤٥,٥-٤٧,٥ مْ، كمؤشر أولي على قدرتها الاخصابية للمفاضلة بين كباش التلقيح الاصطناعي المنتخبة.

الكلمات المفتاحية: حيوية السائل المنوي، محاليل التمديد، تجميد السائل المنوي، القدرة الإخصابية، أغنام العواس، سورية.

أولاً- المقدمــة Introduction

شهد قطاع الثروة الحيوانية في سورية في السنوات الأخيرة تطوراً ملحوظاً حتى أن عائداتها أصبحت تشكل ما يزيد عن٣٢% من مجمل الناتج الزراعي. وتعد تربية الأغنام المكون الرئيس للثروة الحيوانية، وازدادت أعدادها من ٢.٧ مليون رأس إلى ٩.٢٢ مليون رأس (المجموعة الإحصائية، ٢٠٠٨)، كما أنها تشكل أكثر من ٨٠% من الوحدات الحيوانية الكلية في سورية (المرستاني، ٢٠١٠)، وبالتالي فهي تمثل النوع الحيواني الأكثر أهمية، والذي يتوجب تركيز العمل عليه لتحسينه وإكثاره. ولما كانت غنم العواس العرق الوحيد في سورية والأكثر انتشاراً في منطقة غرب آسيا، والقادرة على التكيف في مناطق مختلفة من العالم (طليمات، ١٩٩٦)، فإن تطوير محاليل تمديد محلية يكون مفيداً جداً في حفظ نطاف الكباش المحسنة والمختبرة لمثل هذه السلالة الواعدة، ويساعد في استخدام تقانة التلقيح الإصطناعي، والإستفادة منها في نشر العوامل الوراثية لذكور التلقيح الإصطناعي المختبرة.

كان للعرب الفضل الأول في معرفة التلقيح الإصطناعي وذلك عندما قام أحد العربان عام ١٣٢٢م بتلقيح فرسه من سائل منوي لفحل مشهور في خصائصه (سلهب وسلوم، ٢٠١٠). ومنذ ذلك التاريخ ظل أمر التلقيح الإصطناعي مهملاً إلى أن أتيحت الفرصة لإجراء عملية تلقيح اصطناعي في مختلف الحيوانات الزراعية. فقد أورد الأعرج وإبراهيم (١٩٩٧) أن أول تلقيح اصطناعي كان في الكلاب (1780)، وفي الإنسان (1799) ، وفي الكلاب والخيول (1900)، وفي الديوك والحمام (1914). كما ساهم العلماء الدانماركيون في تطوير تقانات حفظ السائل المنوي، إذ طور Sorensen (1940) ما يعرف حالياً بالقشات المستخدمه في حفظ ونقل السائل المنوي، وتابع الفرنسي Cassou (1964) تطويرها، وأتاح استخدامها بالشكل التجاري المعروف حالياً. ويعود الفضل الأول في معرفة المهبل الإصطناعي كوسيلة لجمع السائل المنوي من الحيوانات الزراعية إلى Milovanov وزملاؤه (1938). وبما أن التناسل في الأغنام موسمي، فإن استعمال السائل المنوي الطازج والممدد، أوالمجمد، هوأحد الإستراتيجيات التي تستخدم للتغلب على هذه المشكلة (Laura وزملاؤه، 2005). وعلى الرغم من الصعوبات التي اعترضت استخدام تقانة التلقيح الإصطناعي في الأغنام، فإن تطبيقها يزداد يوماً بعد يوم في العالم ليصل إلى ٢,٣% في عام ١٩٩٩ و٣,١% (Colbjørnsen، 2001)، وكانت نتائج

الخصوبة بعد التلقيح الإصطناعي في الدانمارك ٢٩% (Holt، 2000)، و٤٠- ٥١,٥ % في السويد (Söderquist وزملاؤه، 1999)، و٣٣- ٦٣,٧ % في النرويج (Andersen، 1999)، و٥٠-٦٥% (سلهب والمصري، ٢٠٠٣) في أغنام العواس. وقد استخدمت محاليل تمديد مختلفة في الأرغواي (التريس- سترات الصوديوم مع صفار البيض والجلوكوز) (Azzarini و Valledor، 1988). وعادة تتباين معدلات الإخصاب الناجمة عن استخدام التلقيح الاصطناعي في الأغنام لأسباب تتعلق بنوع محلول التمديد (Zhu وزملاؤه، 1982)، وحجم الجرعة المنوية المستخدمة في التلقيح (Kenney وزملاؤه، 1983)، وطبيعة استخدام السائل المنوي (طازج أومجمد) في التلقيح (Langford وزملاؤه، 1982). كما أورد زكريا وسلهب (١٩٩١) أنه يلقح في بلدان رابطة الدول المستقلة (الإتحاد السوفيتي سابقا) أكثر من (٣٠) مليون رأس من النعاج سنوياً، ويلقح في فرنسا وفي أستراليا ٣٥٠ و٤٠٠ ألف رأس من النعاج سنوياً على التوالي.

وبدأ انتشار هذه التقانة يأخذ مجاله الواسع في أمريكا اللاتينية وبريطانيا (Mvkelevey، 1999)، خصوصا بعد أن تطورت طرائق التلقيح الإصطناعي، وأصبح بالإمكان إيداع السائل المنوي في أعماق مختلفة من عنق الرحم في النعاج (Eppleston وزملاؤه، 1993)، وفي داخل الرحم (El- Alamy و Foote، 2001). ومكن استخدام البطانات المهبلية البلاستيكية التي تستخدم لمرة واحدة ثم رميها والتخلص منها بعد كل عملية جمع في زيادة حيوية النطاف وقدرتها الإخصابية بعد التجميد والإذابة (Salhab و Merilan، 1987). إن أهمية المحافظة على المواد الوراثية، وتأسيس بنوك وراثية للسائل المنوي للذكور (Holt، 1997)، والإستخدام الواسع للسائل المنوي للذكور المتميزة في التلقيح الإصطناعي (Yoshida، 2000)، ساعد في الإسراع في إجراء عمليات التحسين الوراثي محلياً، واقليمياً، وحتى دولياً، نظراً لإمكانية تلقيح أعداد كبيرة من الإناث من ذكر واحد معروف بكفاءته الوراثية، كما ساعد في الإسراع في إختبار الذكور المرغوب استخدامها في عمليات التربية، نظراً لسرعة وسهولة نشرعواملها الوراثية في قطعان تعيش تحت ظروف إنتاجية متباينة (Salizbury وزملاؤه، 1978). وإمكانية استعمال السائل المنوي الناتج من قذفه واحدة في تلقيح أكبر عدد ممكن من الإناث ضمن النوع الحيواني الواحد، فمثلاً تكفي النطاف الناتجة من قذفة واحدة من كبش لتلقيح ما بين ١٠- ١٥ نعجة (الأعرج وإبراهيم، ١٩٩٧). والتغلب على كثير من الأمراض المعدية التي يمكن أن تنقل بواسطة الجهاز التناسلي (منزلجي، ١٩٩٧)، وتوفير الكثير من المال والجهد بعملية

التلقيح الإصطناعي (الأعرج وإبراهيم، ١٩٩٧)، وتسهل حدوث التلقيح بين حيوانات متفاوتة الحجم (Salizbury وزملاؤه، 1978). إن النطاف على خلاف الأنواع الأخرى من الخلايا تملك محتوى منخفض من المواد لحمايتها (Meister، 1983)، وبما أنها خلايا حية وضعيفة جداً، ولا تستطيع أن تعيش خارج الجسم، وأن تتغلب على العوامل الخارجية دون مساعدة، لذا فكر بعض العلماء بحفظ النطاف خارج الجسم لبضع ساعات، أوأيام، أو حتى سنين، واستعمالها في التلقيح الإصطناعي (كوجان، ١٩٨١). ولما كان حفظ السائل المنوي يعني المحافظة على المادة الوراثية للنطفة (Salamon و Maxwell، 1995؛ Mvkelvey، 1999)، كان لا بد من توفير وسط مناسب يفيد في حفظ النطاف، خاصة وأن البلازما المنوية المرافقة للنطاف لاتفيد في حفظها على درجة حرارة الغرفة أكثر من ساعات محدودة (Hafez،١٩٨٠)، أما السائل المنوي الطازج لا يمكن إستخدامه إلا بتلقيح عدد قليل من الإناث، ولا يساعد في حفظ النطاف إلا فترة محددة من الزمن (De Pauw وزملاؤه، 2003). ونظراً لأن تقانة التلقيح الاصطناعي أصبحت علماً بحد ذاته، فقد استخدمت محاليل تمديد مختلفة ساعدت في حفظ النطاف ونشر هذه التقانة.

وعادة يختلف تركيب محلول التمديد من بلد إلى آخر، وحتى من مختبر إلى آخر في البلد الواحد (Marques وزملاؤه، 2006)، وفي الحقيقة لا يوجد حتى الآن محلول تمديد يمكن التقيد به. يفترض في محاليل التمديد أن تحمي النطاف، وتحفظ حركتها، وخصوبتها لوقت أطول من خلال تحقيق الإستقرار في الغشاء الخلوي لهذه المنويات، وتزويدها بركائز الطاقة، ووقايتها من التأثيرات المؤذية التي تسبب تغيرات في درجة الحموضة، والضغط الحلولي (Vera– Munoz وزملاؤه، 2009)، لكن يشترط فيه أن يكون سهل التحضير، ومواده متوفرة في أغلبها محلياً، ورخيص الثمن (سلهب وزايد، ١٩٩٤). على أية حال يكمن الهدف الرئيس من محلول التمديد أولاً في تمديد السائل المنوي وزيادة حجمه، وثانياً في حفظ السائل المنوي والإطالة من حياة النطاف (زكريا وسلهب،١٩٩١). ويشترط في وسط التمديد أن يحتوي على مادة غذائية تعد مصدراً للطاقة (Lahnsteiner وزملاؤه، 2003)، ومواد واقية تحمي النطاف من الصدمات الحرارية الباردة (Holt وزملاؤه، 1996)، ومحلول واق أودارئ يحافظ على درجة حموضة الوسط ضمن حدود pH= ٦– ٨ (العاني وزملاؤه، ٢٠٠٨)، ومضادات حيوية Antibiotics تمنع نموالبكتيريا (Mazur، 1985) ، وأن يحافظ على الضغط الحلولي (Salizbury وزملاؤه، 1978)، وأن يزيد من حجم السائل المنوي ويحمي النطاف من تأثير عملية التجميد (سلهب

وزملاؤه1991). ويعتمد تمديد السائل المنوي على التركيز الأولي للعينة (Voos وزملاؤه، 1979)، وعلى عدد النطاف المتحركة حركة تقدمية (Pickett، 1993). وقد أجريت أبحاث عديدة لتمديد السائل المنوي بمحاليل تمديد مختلفة قبل التجميد (Salamon و Maxwell، 2000). إن عمليات تخزين محاليل التمديد وتقنياتها قد تطورت وتكيفت من أجل تحسين عمليات حفظ السائل المنوي وتجميده (Gil وزملاؤه، 2003; Matsuoka وزملاؤه، 2006).

١-١ محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض (Sodium Citrate – Egg Yolk Diluents):

استخدمت السترات المرتبطة بالسكر كمحلول واق لتجميد السائل المنوي للكباش(Garde وزملاؤه، ٢٠٠٨). ووجد أن إضافة سترات الصوديوم لمحاليل التمديد يحافظ على نوعية السائل المنوي بعد الإذابة (Tekin، 1982). كما أضيف مع السترات العديد من المكونات الأخرى بهدف زيادة فعالية محاليل التمديد (Salamon و Maxwell، 1995)، فمثلاً إضافة السكر (مادة غير متأينة) أوالكلسين (مواد ضعيفة التأين) يفيد في حماية النطاف من حالات التلزن (Aisen وزملاؤه، 2000)، كذلك يعمل السكر كعامل مختزل ضد الأكسدة، وتثبيط نموالجراثيم، ويزيد لزوجة الوسط (كوجان، ١٩٨١)، كما أنها تزود النطاف بركائز الطاقة أثناء فترة التحضين (Leibo و Songsasen، 2002).

إن صفار البيض يحمي النطاف من التأثيرات الضارة أثناء درجة الحرارة المنخفضة، وهناك عدة فرضيات قدمت لتفسير هذا العمل الوقائي، فقد وجد أن فعالية إضافة صفار البيض إلى ممددات السائل المنوي يكمن في قابليته لحماية النطاف ضد الصدمات الحرارية الباردة، وهذا التأثير يعود إلى البروتين الدهني Lipoprotein، والليسيثين (Lecithin) الذي اكتشف وجودهما في صفار البيض، ويقومان بالمحافظة على نوعية وقوة تماسك غلاف النطاف المكون من البروتين الدهني (Manjunath و زملاؤه،2007). ووجد أن النسبة المئوية لسرعة النطاف تزداد مع زيادة تركيز صفار البيض في محلول التمديد (Gil وزملاؤه، 2003). كما أن صفار البيض يحفظ حركة وسلامة الأكروزومات والأغلفة الميتوكندرية للنطاف، وكذلك فهومانع للصدمة الحلولية (Chehadeh، 2000). ويعمل صفار البيض في منع تلزن رؤوس النطاف وتجمعها بهيئة كتل، فهو يحتوي على عدد من البروتينات والفيتامينات الذائبة في الدهن والماء، وله

لزوجة مناسبة ومفردة للخلايا، لأنه وبنفس الوقت يحوي الحوامض الأمينية الثلاثة (Phenylalanine L– Tyrosin L– Trepotophan L)، والتي تنتج مادة سامة هي هيدروجين بروكساید (H2O2) عند تأكسدها وزوال مجموعتها الأمينية، فعندما تحفظ النطاف تحت الظروف الهوائية فإن المادة السامة المتكونة يمكن تحليلها بإضافة أنزيم Catalase إلى صفار البيض، أما إذا كان التخزين تحت ظروف لا هوائية فإن هذه المادة لا تتكون (جواسرة، ٢٠٠٧) .

إن استبدال صفار البيض بشكل جزئي أوكلي في محاليل تمديد السائل المنوي للكباش كان قد جرب من قبل Matsuoka وزملاؤه (2006)، إذ استخدمت مستويات مختلفة من صفار البيض في تحضير محاليل التمديد. فقد استخدم صفار البيض بتركيز ٢٠% (Tuli وزملاؤ، 1991)، و٣–٦% (Waston و Martin، 1975)، و ٦%(Graham وزملاؤه، 1978)، و٢٥–٣٠% (AbdelHakeam وزملاؤه،1991) و١٠% (Mary ، 1994). بينت الدراسات بأنه لا يوجد تأثير إيجابي ملحوظ عند زيادة تركيز صفار البيض فوق ١٠% بعد الإذابة على حركة النطاف وسلامة أغلفتها (Gil وزملاؤه، 2003)، وأن التراكيز العالية أثرت سلباً على سلامة الأغلفة أثناء الحفظ بالتجميد (Holt وزملاؤه، 1996). كما استخدم صفار البيض والحليب الخالي الدسم منذ سنين من أجل تجميد السائل المنوي(Gil وزملاؤه، 2003). واستخدمت محاليل تمديد تحوي مشتقات غير حيوانية دون حدوث أي نقص في الحركة والخصوبة (Yutaka وزملاؤه، 2008).

٢–١ محلول الحليب الخالي الدسم (Skimmed Milk Diluent):

يحتوي الحليب العديد من المركبات المناسبة لحفظ النطاف، واستخدم على نطاق واسع لتمديد نطاف الثور (Salamon وزملاؤه، 1995)، والظبي (Lebouef وزملاؤه، 2003). يجب تسخين الحليب قبل استخدامه لأن هذه الحرارة كافية لإبطال مفعول المركبات ذات التأثير السام على النطاف، والتي ترتبط بالجزء الذي يحتوي على الألبومين في بروتين الحليب وأهمها مادة Lactenin (جواسرة، ٢٠٠٧). في السنوات الماضية مدد السائل المنوي بالحليب الخالي الدسم، وخزن على درجة ١٨ مْ، واستخدم على نطاق واسع في برنامج التلقيح الإصطناعي (Colas وزملاؤه، 1980). كما يعد الممدد الرئيس الذي يستخدم لحفظ السائل المنوي للكباش على درجة حرارة ١٥ مْ في دول البحر المتوسط (Yániz وزملاؤه، 2005). واستخدم كممدد على مرحلتين من أجل تجميد السائل المنوي بشكل عملي في السويد (Lillo وزملاؤه، 1984)، والنرويج (Amdal وزملاؤه،

1982؛Berg وزملاؤه، 1989). وأن محلول الحليب يحفظ النطاف عند الدرجة ٥مْ لمدة ٩٦ ساعة، وكذلك يحافظ على حركة ونسبة النطاف الحية عند أعلى مستوى طوال فترات التخزين من صفر حتى ٩٦ ساعة مقارنة مع محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض، ومحلول التريس (Das وزملاؤه، 1985). وتبين أن السائل المنوي الممدد في محلول الحليب، والتلقيح به وهوبحالة سائلة بدرجة حرارة طبيعية أعطت نتائج مقبولة. وقد أوصى بإختيار هذا النوع من الممدد في النرويج (Paulenz وزملاؤه، 2003). يتوقف تجميد السائل المنوي في السويد على طريقة التمديد التي تتم على مرحلتين باستخدام محاليل تمديد الحليب (Gil وزملاؤه، 2003). وأن إضافة الممدد على مرحلتين عند الدرجة ١٥مْ لم يحدث تحسن ملحوظ في كمية ونوعية النطاف بعد الإذابة، وكانت سلامة الأغلفة أعلى بشكل ملحوظ عند الدرجة ٥ مْ مقارنة مع الدرجة ١٥مْ، ونسبة التفاعل الحلولي للنطاف كانت أقل عند الدرجة ٥مْ عند استخدام محاليل تمديد الحليب (Foote وزملاؤه، 2002). وقد أوصى Gil وزملاؤه (2003) باستخدام محلول الحليب مع التراكيز المنخفضة لصفار البيض ٥-١٠%، مع إقتراح إضافة الغليسيرول عند الدرجة ٥مْ من أجل تجميد السائل المنوي للذكور.

٣-١ محلول الأندروميد AndroMed(Minitüb,GmbH, Tiefenbach,germany):

تبين أن استخدام الإضافات المشتقة من أصل حيواني مثل الحليب، أوصفار البيض في تمديد السائل المنوي فيه مخاطرة، نظراً لإمكانية حدوث تلوث بكتيري (Thibier وزملاؤه، 2000). واستخدم بديل عن ذلك ممددات خالية من هذه الإضافات مثل الأندروميد إنتاج شركة Minitüb الألمانية، وسجل براءة إختراع، ويحتوي على فوسفوليبيدات، وتريس، وحمض الستريك، وفركتوز، ومانعات تأكسد، ومواد واقية، وغليسيرول، ومجموعة من المضادات الحيوية، وهولا يحتوي صفار البيض أومواد حيوانية، وبالتالي يتفادى أي خطر نقل العوامل المرضية التي يمكن أن تنتقل عن طريق صفار البيض (Nöthling وزملاؤه، 2007).

كما أورد البليبلي والقرعاوي (١٩٩٨) أن أول محاولة ناجحة لتجميد السائل المنوي، وحفظ النطاف إلى أمد طويل كانت في بريطانيا (1949) بإضافة الغليسيرول، للتقليل من الأضرار الناتجة عن عملية التجميد. ويتأثر مستوى الغليسيرول المثالي بمجموع محتويات الأجسام الصلبة لمحاليل الحليب، وسترات الصوديوم، وتركيز اللاكتوز، ومحتوى صفار

البيض، وأن زيادة تراكيز صفار البيض ربما يخفض من التركيز المطلوب من الغليسيرول (Waston و Martin، 1974). وعلى الرغم من أن أهميته كواقي من التجميد (Molinia وزملاؤه، 1994)، إلا أن تركيز الغليسرول في محاليل التمديد يعتمد على سرعة تجميد النطاف (Fiser وزملاؤه، 1989)، وفترة التوازن (Salamon و Maxwell، 1995)، وطريقة إضافته (Tuli وزملاؤه، 1991)، وموعد إضافته (Sinha وزملاؤه، 1992)، ودرجة حرارة محلول التمديد عند إضافته (Evansو Maxwell، ١٩٨٧)، كما أن تركيب محلول التمديد يلعب دوراً مهماً في تحديد تأثير طرق إضافة الغليسيرول (Deka و Rao، ١٩٨٩). وأن التغيرات في تركيز المواد المتفاعلة مع الغليسيرول تؤدي إلى تغير في الضغط الحلولي للمحلول (Fiser و Fairful، 1984). وجد Das و Rajkonwar (1994)، أن تركيز ٧% غليسيرول في ممدد صفار البيض مع رافينوز ينتج عنه ضرر أقل مقارنة مع تركيز ٥ أو ٦ % بعد التجميد. كذلك وجد أن تركيز ٧ % غليسيرول في ممددات صفار البيض مع اللاكتوز، أومع المالتوز، أظهرت نسبة أعلى لحركة النطاف بعد التجميد والإذابة مقارنة مع تركيز ٥ أو ٦ %، أومع مستويات مختلفة من الغليسيرول (Das و Rajkonwar، a و b، 1995).

١-٤ القدرة الإخصابية Fertilizability

أصبح المعيار الحقيقي لمستوى الخصوبة في ذكور الحيوانات الزراعية في الوقت الحاضر يتمثل بزيادة النطاف الحية الخالية من التشوهات، والقادرة على الوصول حية إلى موقع الإخصاب في الجهاز التناسلي الأنثوي، وإختراقها لأغشية البويضة، وتكوين البداءة النووية (العاني وزملاؤه، ٢٠٠٨). بما أن اختبار خصوبة الكبش الفردية بالتلقيح الإصطناعي غالية الثمن (Meara وزملاؤه، 2008)، لذلك هناك حاجة لتطوير إجراء مختبر خارج الجسم، لقياس وظيفة النطاف التي ترتبط بشكل موثوق بالخصوبة داخل الجسم (Rodriguez-Martinez، ٢٠٠٣).

وعلى الرغم من أن البعض كانوا غير قادرين على إيجاد علاقة بين الخصوبة داخل الجسم واختبارات النطاف الوظيفية خارج الجسم (Papadopoulos وزملاؤه، 2005);(Meara وزملاؤه، 2008)، لكن دراسات عديدة وجدت علاقة بين الخصوبة داخل الجسم باستعمال السائل المنوي المجمد والمذاب، وقياس حركة النطاف خارج الجسم بالتقييم البصري (Foote وزملاؤه، 2003)، أوتحليل النطاف بمساعدة تقنيات الحاسوب،

أومورفولوجيا النطاف (Correa، وزملاؤه، 1997). كما أن Sadha وزملاؤه (2004) وجدوا أن التحليل الموضوعي لخصائص حركة نطاف الكبش بعد التجميد والإذابة تحت الشروط خارج الجسم مشابهة لتلك داخل الجسم، لذلك ربما تقيم المؤشرات المرتبطة بالخصوبة. إن الحركة التقدمية للنطاف مؤشر مهم، ومرتبطة بالخصوبة (Aitken، 1990)، بالتالي توجد علاقة إرتباط محكمة بين حركة النطاف وقدرتها الإخصابية (Lahnsteiner وزملاؤه، 2003)، حيث أن خصوبة النطاف تهبط بشكل أسرع من حركتها (DePauw وزملاؤه، 2003). إن التحضين المطول للنطاف يسبب تدهور وتغير في الجسيم الطرفي للنطاف عند الكباش (Pontbriand وزملاؤه، 1989)، علاوة على ذلك سلامة الجسيم الطرفي في النطفة يرتبط إيجابياً بالخصوبة، بالتالي إن التبدل في غشاء وبنية النطاف يؤدي للحصول على نطاف سيئة غير قادرة على البقاء على الحياة أثناء التحضين خارج الجسم (Watson، 1995). ووجد أن هناك علاقة كبيرة بين الفترة الزمنية التي تستغرقها النطاف لنفاذ حيويتها عند تحضينها على درجة حرارة " ٤٥،٥–٤٧،٥" مْ، وبين نسبة الإخصاب، حيث أن الحرارة العالية تسرع من معدل التفاعلات الإستقلابية، والعمليات الحيوية المرافقة لها (Salhab وزملاؤه، 1987) وبالطبع هذا سيمكننا من قياس حركة النطاف ومدى مقاومتها للتخزين على تلك الدرجة العالية. إن قدرة النطاف تنقص أثناء التحضين نتيجة عمليتي التجميد والإذابة (Sadhan وزملاؤه، 2004)، بالتالي درجة الضرر المخفي أثناء التجميد والإذابة سوف يصبح واضحاً أثناء التحضين، فعند الضرر المخفي الأعظم سوف يكون عمر النطاف هوالأقصر في المنطقة التناسلية الأنثوية (Sadhan وزملاؤه، 2004)، وهذا ما وجده Fiser وزملاؤه (1991) أن الضرر المخفي للنطاف عند التجميد في ظروف مثالية كان المسؤول عند موتها أثناء التحضين ما بعد الذوبان. كما وتتوقف درجة التدهور على عدة عوامل مثل التجميد (King وزملاؤه، 1967)، طبيعة وتركيز المواد الواقية من التجميد، ومكونات أخرى لمحاليل التمديد تستخدم من أجل التجميد (Fiser وزملاؤه، 1989) والإذابة (Holt وزملاؤه، 1994).

ونظرا لصعوبة تأمين محاليل التمديد من خارج القطر، كان لابد من الإعتماد على الذات وإنتاج محاليل تمديد محلية على المكونات الأساسية، وتفيد في تمديد السائل المنوي للكباش، وزيادة حجمه، للمساعدة في نشر تقانة التلقيح الإصطناعي.

ثانياً: أهداف البحث:

تكمن الأهداف من هذا البحث فيما يلي:

* إنتاج محاليل تمديد محلية لتمديد السائل المنوي في ذكور غنم العواس.
* اختبار فعالية هذه المحاليل في حفظ السائل المنوي لفترات قصيرة وطويلة الأمد، ومقارنتها مع المحلول القياسي (الأندروميد).
* دراسة تأثير محاليل التمديد المختلفة على القدرة الإخصابية للسائل المنوي المجمد.

مواد البحث وطرائقه

Materials and Methods

ثالثاً: مواد البحث وطرائقه Materials and Methods

١- مكان تنفيذ البحث:

نفذ البحث في مختبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة في محطة بحوث إزرع التابعة للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (ACSAD) خلال الفترة من ٢٠٠٨/٥/١ إلى ٢٠٠٩/١٢/١.

٢- الحيوانات:

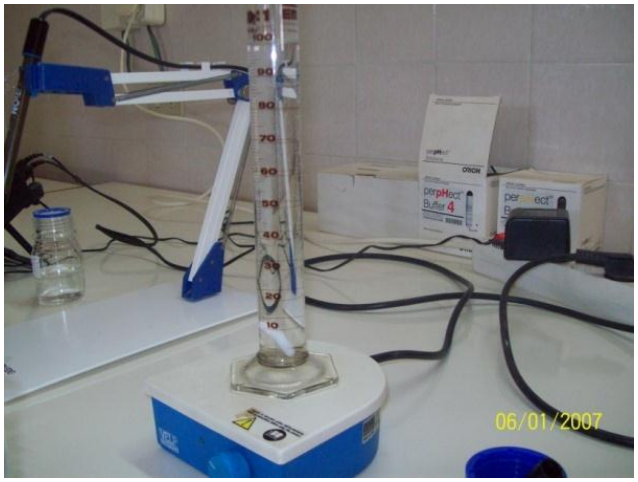
استخدمت أربعة ذكور طلائق تلقيح إصطناعي من غنم عواس بعمر سنتين ومتوسط أوزانها ٧٥ ±٣ كغ، وذلك لجمع السائل المنوي ومداولته.

٣- المحاليل المستعملة:

استخدمت ثلاثة محاليل، اثنان منها محلي الصنع (سترات الصوديوم مع صفار البيض، والحليب الخالي الدسم)، والثالث مستورد (الأندروميد) لهدف مداولة السائل المنوي وحفظه لفترات قصيرة وطويلة الأمد. و تم تحضير محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض وفق ما نشره Menger و زملاؤه (١٩٨٧)، وقد حضر على ثلاث مراحل:

- **المرحلة الأولى:** تحضير سترات الصوديوم ($Na_3C_6H_5O_7$)

وضع ٣,٥٢غ سترات الصوديوم بماء مضاعف التقطير بحدود ٦٠ مل، واستكملت كمية الماء المضاعف التقطير حتى ١٠٠ مل مع التحريك حتى الذوبان الكامل (الصورة ١).



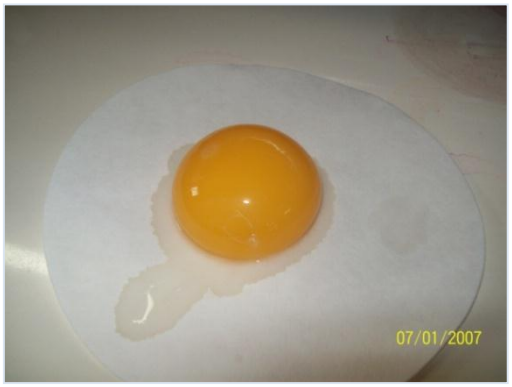
الصورة ١. تحضير السترات

- **المرحلة الثانية:** تحضير صفار البيض.

استخدم بيض دجاج من نفس المصدر لهذا الغرض، وغسل البيض بماء فاتر، ومن ثم ماء مقطر، وبالنهاية بكحول الإتيل ٧٠%. كسرت البيضة إلى نصفين، ونقل الصفار من نصف لآخر عدة مرات حتى التخلص من البياض، ثم وضع الصفار فوق ورقة ترشيح (الصورة ٢)، وفجر الغشاء المحيط بالصفار بشكل يسمح للصفار بالإرتشاح عبر الورقة ضمن الأنبوبة المدرجة. رمي غشاء صفار البيض، وكررت العملية عدة مرات حتى الحصول على الحجم اللازم من صفار البيض.

- **المرحلة الثالثة:** خلط صفار البيض مع سترات الصوديوم.

لتجهيز حجم ١٠٠ مل من المحلول، خلط ٢٠ مل من صفار البيض مع ٨٠ مل من سترات الصوديوم (الصورة ٣) أي بنسبة ٤:١، لتجهيز محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض.



الصورة ٢. صفار البيض على ورقة ترشيح

الصورة ٣. إضافة البيض للسترات

ثم أضيف ٥٠٠ وحدة دولية/ مل بنسلين قبل ٤- ٦ ساعات من تجميد السائل المنوي. كما أضيف ١% غلوكوز كمصدر للطاقة. ولتحضير محلول الحليب خالي الدسم سخن حليب البودره الخالي الدسم بعد حله بالماء لدرجة حرارة (٩٢- ٩٥) مْ، وترك ليغلي لمدة عشر دقائق، رفع الحليب المغلي عن السخانة، وبرد لدرجة حرارة الغرفة، سكب الحليب المبرد في وعاء معقم، وأزيل الدسم المتبقي، بعدها أضيف ٥٠٠ وحدة دولية/ مل بنسلين قبل ٤- ٦ ساعات من تجميد السائل المنوي، كما أضيف ١% غلوكوز كمصدر للطاقة (الصورة ٤).

الصورة ٤. محلول الحليب

والمحلول القياسي أندروميد AndroMed صناعة ألمانية، جاهز للإستخدام كشاهد في مداولة وحفظ السائل المنوي، حيث كانت نسبة التمديد ١:٤ محلول تمديد: ماء مضاعف مقطر.

٤- المواد:

سترات الصوديوم، وغلوكوز، وحليب خالي الدسم، وغليسيرول، وقشات فارغة سعة(٠,٥) مل، وشرائح وساترات زجاجية، وورق ترشيح (الصورة ٥).

الصورة ٥. المواد المستخدمة في الدراسة

واستخدمت صبغات تلوين (إيوزين- نيكروزين) لها القدرة على عبور الأغشية الخلوية للنطاف الميتة (إيوزين)، وعلى ملونة للأرضية (نيكروزين) لتسهيل القراءة، وحضرت كما يلي: أضيف ٣،٣ غرام إيوزين، مع ٢٠ غرام نيكروزين، و١،٥ غرام سترات الصوديوم، ثم مزج المحلول وسخن حتى الذوبان الكامل، بعد

ذلك تم قياس **pH**، وعدلت بإضافة حمض كلور الماء (٠,١ نظامي)، ثم أجريت عملية فلترة للمحلول، وحفظ في البراد حتى الإستخدام.

٥- الأدوات:

استخدمت مهابل اصطناعية معقمة ونظيفة، جهزت بوضع البطانة الداخلية داخل الأسطوانة الخارجية، وتطوى نهايتها على حافتي الأسطوانة الخارجية، وتشدان بشكل كاف لمنع تشكل إلتواءات على وضعية البطانة قد تعيق دخول القضيب، وثبتت نهايتا البطانة بصورة جيدة على طرفي الأسطوانة الخارجية، مستعينين بحلقات مطاطية قوية تضمن عدم السماح بإنسكاب الماء، وبالتالي عدم تلوث السائل المنوي. وثبت كأس الجمع على نهاية الأسطوانة الخارجية بحلقات مطاطية، بعدها ملئت الغرفة الداخلية المتشكلة بين البطانة والأسطوانة الخارجية من خلال الصمام بماء الساخن درجة حرارته ٤٥ مْ، عندها يصبح المهبل الإصطناعي جاهزا للإستخدام. وطاولة جمع (صنعت محليا)، وأنابيب زجاجية مدرجة، وشرائح زجاجية.

٦- الأجهزة:

حمام ملئ بالماء وسخن حتى الدرجة ٣٧ مْ، وصفيحة تسخين للحفاظ على حرارة الشرائح المفحوصة عند الدرجة ٣٧مْ، ومروحة من أجل التجفيف السريع للشرائح المصبوغة، ومجهر ضوئي متغاير الطيف يستخدم لتقدير الحيوية، والنطاف الميتة، وجهاز ضوئي لعد النطاف، وجهاز قياس الحموضة، وجهاز قياس الضغط الأسموزي، وميزان حساس(الصورة ٦)، وألة تعبئة القشات، وجهاز تجميد القشات،خزان سائل آزوتي، وحاضنة (الصورة ٧)، وثلاجة.

الصورة ٧. حاضنة

الصورة ٦. ميزان حساس

7- خطوات العمل:

حضرت محاليل التمديد للسائل المنوي قبل يوم الإستخدام، وعدلت درجة الحموضة لكل محلول بغمر مسبر الجهاز ضمن المحلول، والتحكم بدرجة الحموضة بإضافة سترات الصوديوم إذا كان الوسط حمضي، أوحمض كلور الماء إذا كان الوسط قلوي، بحيث تكون ٦,٨، واستخدم لهذا الغرض جهاز قياس درجة الحموضة pH Meter، (الصورة ٨).

الصورة ٨. جهاز قياس درجة الحموضة

الصورة ٩. جهاز قياس الضغط الحلولي

وقيس الضغط الحلولي بوضع محلول قياسي في الجهاز (ماء مضاعف التقطير) لمعايرة الجهاز ليكون ٣٠٠ ميلي أوزمول، ثم قدر الضغط الحلولي لكل محلول ليكون ٣٠٠ ميلي أوزمول باستخدام جهاز Osmometer (الصورة ٩).

بعد الإنتهاء من تحضير المحاليل حفظت في البراد على درجة ٤-٥ مْ. وشغلت الأجهزة (الحمام المائي- صفيحة التسخين- سخان الماء- المطياف الضوئي) قبل فترة كافية من بدء الجمع. ووضع ما يحتاجه يومياً من محلول التمديد في الحمام (الصورة ١٠). وضع عدد كاف من الساترات والشرائح الزجاجية على صفيحة التسخين، بعدها حضرت أنثى الإثارة في غرفة الجمع (الصورة ١١)، والذكور في غرفة الانتظار.

الصورة ١٠.محاليل التمديد في الحمام المائي

الصورة ١١. أنثى الأثارة

وجهزت المهابل الصناعية بملئها بالماء الدافئ (٤٠-٤٥) مْ والهواء (الصورة ١٢).

الصورة ١٢. مهابل إصطناعية

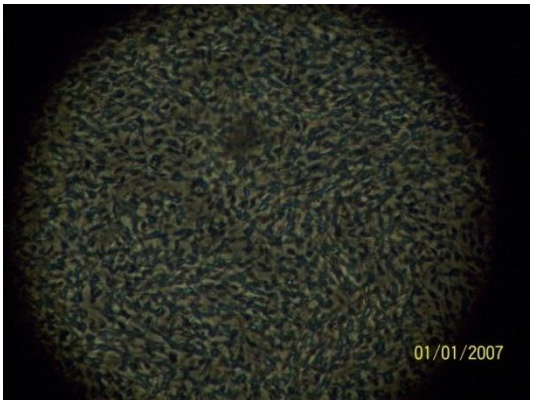
وحررت الذكور بالتسلسل من غرفة الإنتظار إلى غرفة الجمع، وجمع السائل المنوي في المهبل الإصطناعي لكل كبش على حدى وذلك بأخذ قذفتين من كل كبش (الصورتين١٣-١٤).

الصورة ١٣. عملية جمع السائل المنوي

الصورة ١٤. بعد الجمع مباشرة

بعدها سلمت العينات من غرفة الجمع عبر النافذة المخصصة، ووضعت زجاجة الجمع في حمام مائي درجة حرارته (٣٧) مْ في المكان المخصص، وأجري بعد الجمع مباشرة الفحص المظهري للسائل المنوي من حيث اللون، والحجم. ثم سحبت عينة صغيرة من السائل المنوي، ووضعت على شريحة زجاجية مدفأة، ومددت بالمحلول الفيزيولوجي (محلول ملحي تركيزه ٠,٩%)، وغطيت بساترة، لفحص العينة بوساطة مجهر متباين الأطوار، على تكبير ١٠٠ و٤٠٠ (الصورة ١٥)، وقدرت الحيوية من خلال تقدير نسبة النطاف ذات الحركة الأمامية (الصورة ١٦).

الصورة ١٥. مجهر ضوئي

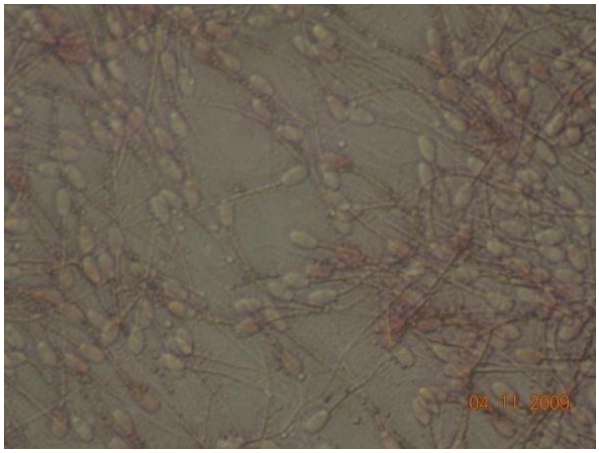


الصورة ١٦. عينة سائل منوي تحت المجهر

وجهزت مسحات من الصبغات والسائل المنوي، حيث وضعت قطرة من الصبغة على شريحة زجاجية، ووضع بحافتها قطرة السائل المنوي المراد فحصها، بعدها أخذت شريحة ثانية لمزج القطرتين، ووضعت بزاوية ٤٥ درجة فوق الشريحة الأولى، ومررت فوقها لصبغ الشريحتين وعرضت الشريحتين لمروحة هوائية من أجل الإسراع في التجفيف

(الصورة ١٧)، ثم فحصت تحت المجهر الضوئي لتقدير عدد النطاف الميتة (الصورة ١٨).

الصورة ١٧. شرائح ملونة



الصورة ١٨. نطاف مصبوغة

ثم أخذت القذفة المنوية، ومددت بجهاز التمديد الآلي (الصورة ١٩)، وذلك بغسله أولا ثلاث دورات بالمحلول الفيزيولوجي، ثم اختيربرنامج التمديد الخاص بالمجترات الصغيرة، بعدها سحبت كمية من الماء المقطر مع عينة من السائل المنوي، وأفرغت في كوفيت (أنبوبة عيارية)، وأصبحت العينة جاهزة للفحص بالمطياف الضوئي (الصورة ٢٠)، ووضع فيه عينة الشاهد (محلول فيزيولوجي).

الصورة ١٩. جهاز تمديد آلي(Dilutrer)

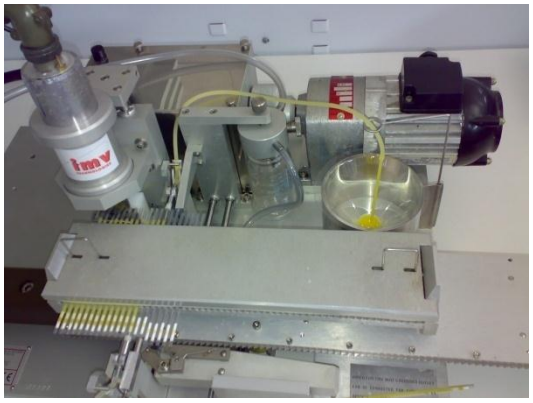
الصورة ٢٠. مطياف ضوئي(photometer)

وزود بالمعلومات اللازمة حول رقم العينة، وعدد النطاف المطلوبة في كل قشة (٣٠٠ مليون نطفة)، ثم استبدلت عينة الشاهد بعينة السائل المنوي الممددة، فيزودنا الجهاز بتركيز العينة (مليار/ مل)، وعدد القشات الممكن إنتاجها، وكمية محلول التمديد الواجب إضافتها إلى السائل المنوي. ثم قسمت عينة السائل المنوي إلى ثلاث مجموعات بالتساوي

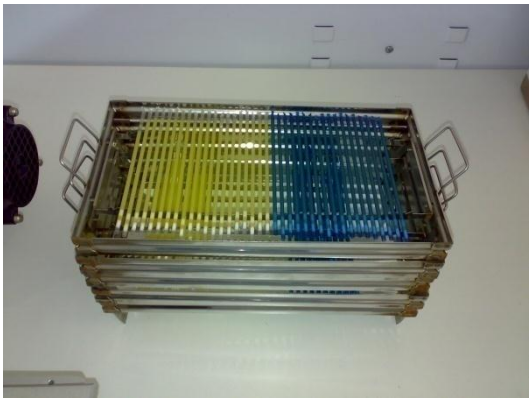
بواسطة أداة مرقمة، ووضعت كل مجموعة في أنبوبة زجاجية ضمن الحمام المائي، ومدد السائل المنوي ضمن الأنبوبة الزجاجية ببطء وحذر مع التحريك.

قدرت الحيوية وعدد النطاف الميتة بعد التمديد لكل عينة، وغلقت الأنابيب بوساطة رقيق الألمنيوم، وترك السائل المنوي الممدد في البراد على درجة ٤ مْ لمدة ٢,٥ ساعة. ثم أضيف الغليسيرول لكل محلول تمديد لتكون نسبته النهائية ٧%، وبعدها قدرت الحيوية وعدد النطاف الميتة في كل عينة. وخلال وجود السائل المنوي الممدد في البراد حضر العدد المطلوب من القشات لكل محلول تمديد بطباعة المعلومات المطلوبة عليها، ثم وضعت في البراد لفترة كافية لخفض حرارتها إلى ٤-٥مْ. بعد إنقضاء مدة ٢,٥ ساعة في البراد عبئ السائل المنوي الممدد في قشات سعتها ٠,٥ مل لتغلق ألياً وهي في البراد (الصورة ٢١).

ووضعت القشات المعبأة من كل ذكر على حامل معدني خاص يتسع ٤٠ قشة (الصورة ٢٢)، وتركت في البراد حتى نهاية عملية التعبئة والإغلاق لبقية القشات.



الصورة ٢١. ألة تعبئة القشات وإغلاقها



الصورة ٢٢. حوامل القشات

كما شغل نظام التجميد الآلي (حاسب- منظم ألي- خزان سائل أزوتي مضغوط- حجرة تجميد) (الصورتين ٢٣-٢٤)، واتبعت التعليمات التي تظهر على شاشة الحاسب وفق الخطوات التالية:

الصورة ٢٣. وحدات برنامج التجميد

الصورة ٢٤. منظم عملية التجميد

فتح جهاز الأزوت، ثم المنظم، ثم المعالج، ثم الشاشة، وبدء دورة التجميد، ثم بدء عملية التجميد، يظهر منحني عملية التجميد على شاشة الحاسوب،عند إنتهاء عملية التجميد يضغط على المفتاح C لإتمام البرنامج. ثم ترحل القشات المجمدة إلى خزان السائل الأزوتي، وأعيدت الحوامل إلى صندوق التجميد، وقطع مصدر الأزوت، وشغلت المروحة والحرارة لإنهاء برنامج التجميد.

الصورة ٢٥. صندوق التجميد

الصورة ٢٦. حاسب فيه برنامج التجميد

وبعدها نقلت القشات المجمدة من كل ذكر إلى الحامل الخاص به ضمن خزان السائل الأزوتي، وبقيت فيه إلى حين تقدير القدرة الإخصابية (الصورتين ٢٧-٢٨).

الصورة ٢٧. حامل القشات المجمدة

الصورة ٢٨. خزان السائل الأزوتي

٨- **تقدير القدرة الإخصابية:**

أخرجت كل قشة من القشات المحفوظة في خزان السائل الأزوتي، ووضعت في حمام مائي على درجة ٣٧مْ لمدة دقيقة، وقدرت الحيوية، وعدد النطاف الميتة بطريقة صبغ الشرائح، بعد ذلك حفظت العينة في حمام مائي على درجة ٤٥,٥- ٤٧,٥ مْ (Salhab وزملاؤه، 1987)، وقدرت الحيوية، وعدد النطاف الميتة كل ١٥ دقيقة على درجة حرارة ٣٧ مْ، وكررت العملية حتى نفاذ الحيوية، قدرت القدرة الإخصابية لجميع العينات المجمدة بالطريقة السابقة نفسها.

التحليل الإحصائي Statistc Analyzis:

حللت البيانات وفق التصميم العشوائي الكامل، باستخدام النموذج الخطي العام General Linear Model (GLM) حسب (SPSS16, Ruszcyc, 1981 ;2006)، وحددت قيمة F المحسوبة، وعند تجاوز قيمتها لقيمة F الجدولية بدرجات الحرية المدروسة، تم حساب أقل فرق معنوي Least Significant Different (LSD) بين المتوسطات، واستخدم النموذج التالي لتقدير المؤشرات المدروسة:

$$Y_{ijkl} = \mu + R_i + D_j + T_k + RD_{ij} + RT_{ik} + DT_{jk} + RDT_{ijk} + e_{ijkl}$$

حيث:

Y_{ijkl}: المؤشر المدروس

μ: المتوسط العام للمؤشر

R_i: تأثير الكبش

D_j: تأثير محلول التمديد

T_k: تأثير الزمن

RD_{ij}: التفاعل بين الكبش ومحلول التمديد

RT_{ik}: التفاعل بين الكبش والزمن

DT_{jk}: التفاعل بين محلول التمديد والزمن

RDT_{ijk}: التفاعل بين الكباش ومحاليل التمديد والزمن

e_{ijkl}: الخطأ التجريبي

النتائج
Results

رابعاً: النتائج Results

نظراً لعدم وجود فرق معنوي في مواصفات السائل المنوي بين القذفتين عند الجمع في كباش العواس المستخدمة، فدمجت القذفتين معاً، واستخدم متوسط الصفة المدروسة للقذفتين ليعبر عن متوسط تلك الصفة لاحقاً في السائل المنوي.

أظهرت الدراسة (الجدول١) أن متوسط حجم القذفتين معاً في ذكور العواس بلغ ٢,١٣سم٣، ومتوسط تركيزها ٣,١ مليار/سم٣، وتراوح لونها مابين الحليبي والكريمي الكثيف، وكان هناك فرق معنوي (P<٠,٠٥)على حجم القذفة وتركيزها بين الكباش المستخدمة.

الجدول1. مواصفات السائل المنوي ($\bar{x}$ ±SD) في كباش العواس.

رقم الكبش	متوسط حجم القذفتين معا (سم٣)	متوسط تركيزالقذفة (مليار/سم٣)	لون القذفة
كبش١	0.20±2.06ab	0.21±3.4a	كريمي
كبش٢	0.46±2.46a	0.10±2.9b	كريمي كثيف- حليبي
كبش٣	0.42±1.8b	0.42±2.4b	كريمي خفيف- حليبي
كبش٤	0.41±2.22ab	0.99±3.8a	كريمي كثيف- كريمي
المتوسط العام	0.44±2.13	0.95±3.1	-

تشير الأحرف المتشابهة في العمودالواحد إلى عدم وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) بين المتوسطات.

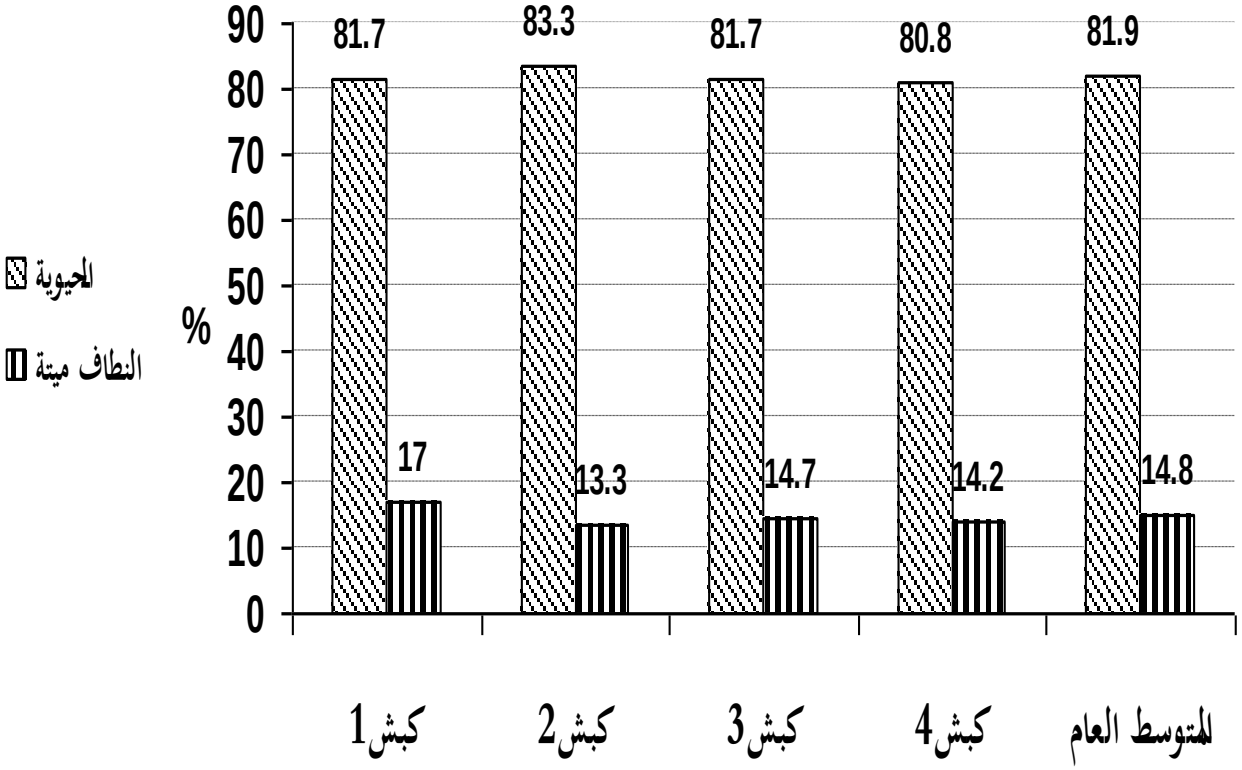
وبينت نتائج تحليل التباين (الجدول٢) عدم وجود تأثير معنوي للكبش على حيوية النطاف، ونسبة النطاف الميتة بعد الجمع مباشرة، كما لم يكن هناك تأثير معنوي ضمن الكباش على تلك المؤشرات، وبلغ متوسط النسبة المئوية لحيوية النطاف ٨١,٩، أما متوسط نسبة النطاف الميتة ١٤,٨ (الشكل ١).

الجدول2. تحليل التباين لحيوية النطاف% ونسبة النطاف الميتة% بعد جمع السائل المنوي لكباش العواس.

حيوية النطاف%				نسبة النطاف الميتة%			
مصدر التباين	DF	متوسط مربعات الانحرافات	P	DF	متوسط مربعات الانحرافات	P
بين الكباش	3	6.597	0.695	3	14.819	0.260
داخل الكباش	20	13.542		20	10.275	
الكلي	23	–		23	–	

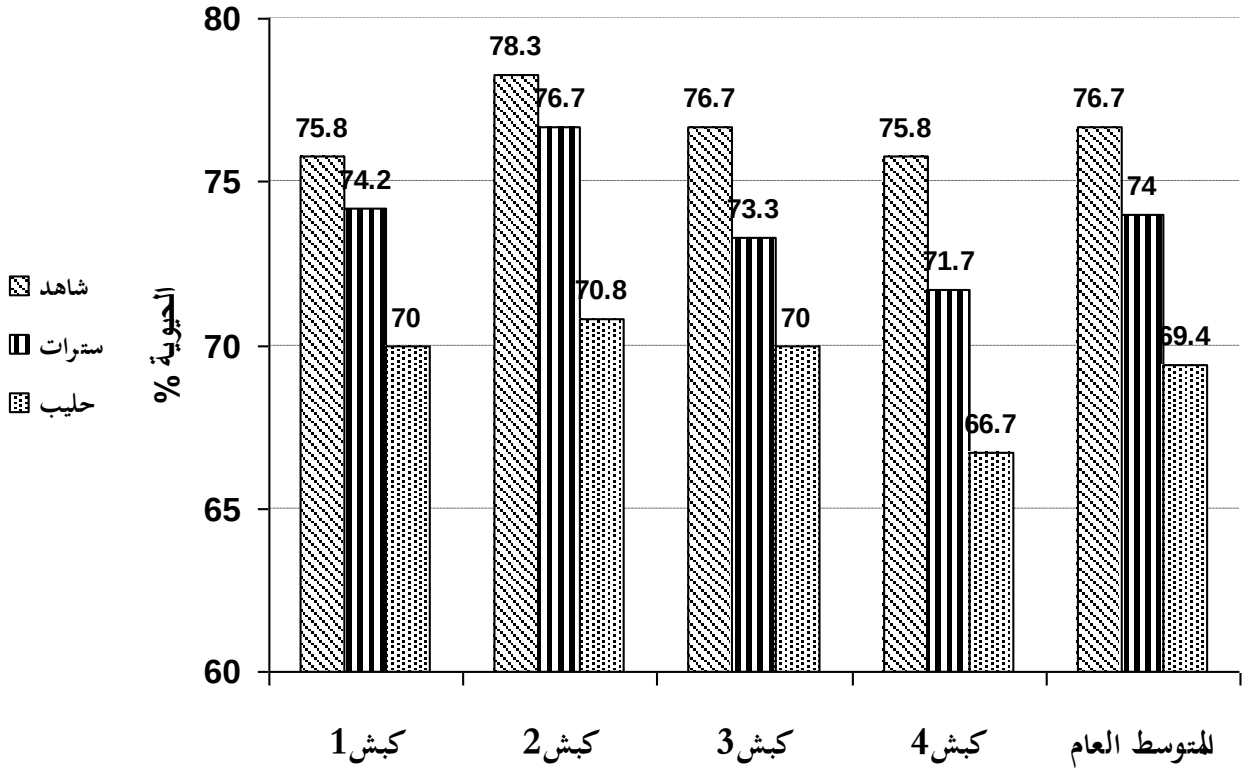
الجدول3. تحليل التباين لحيوية النطاف% ونسبة النطاف الميتة% لكباش العواس بعد التمديد مباشرة.

مصدر التباين	Df	متوسط مربعات الانحرافات	P	Df	متوسط مربعات الانحرافات	P
الكباش	3	45.370	0.027	3	16.926	0.329
محاليل التمديد	2	326.042	0.000	2	580.181	0.000
التفاعل(كباش× محاليل)	6	4.745	0.912	6	3.106	0.971
الخطأ التجريبي	60	13.889		60	14.489	–
الكلي	71	–		71	–	–



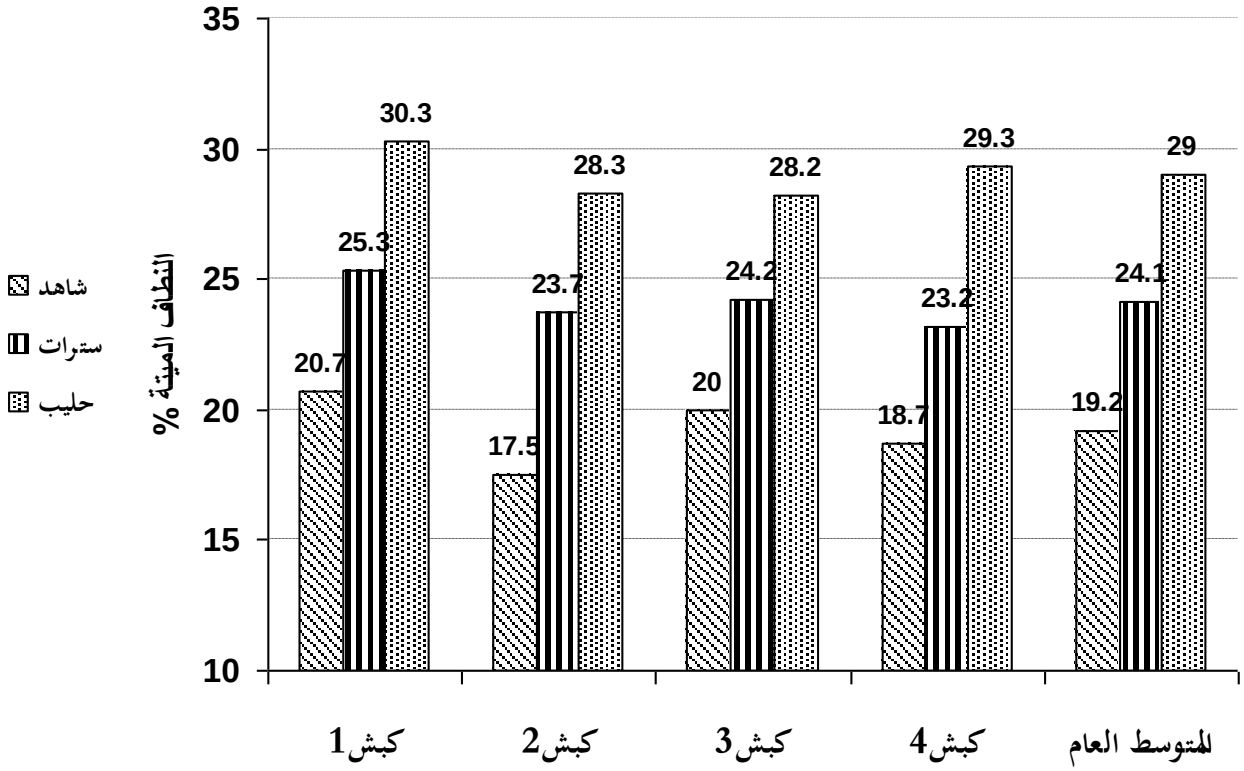
الشكل ١. النسبة المئوية لحيوية النطاف ونسبة النطاف الميتة في السائل المنوي لكباش العواس بعد الجمع مباشرة.

وكان لنوعية محاليل التمديد تأثير معنوي (P<٠,٠٥) على حيوية النطاف بعد التمديد مباشرة (الجدول ٣)، وتبين وجود إختلاف في حيوية النطاف حسب محلول التمديد المستخدم، إذ بلغت الحيوية بالمتوسط العام ٧٦,٧% في محلول الشاهد، و٧٤,٠% في محلول السترات، أما في محلول الحليب انخفضت إلى ٦٩,٤% (الشكل ٢).



الشكل ٢. النسبة المئوية لحيوية النطاف في السائل المنوي لكباش العواس بعد التمديد مباشرة.

وأظهرت نتائج تحليل التباين (الجدول٣) وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) بين المحاليل الثلاثة بالنسبة للنطاف الميتة بعد التمديد، إذ بلغت بالمتوسط ١٩,٢% في محلول الشاهد، وارتفعت إلى ٢٩,٠% في محلول الحليب، أما في محلول السترات ٢٤,١% (الشكل ٣).

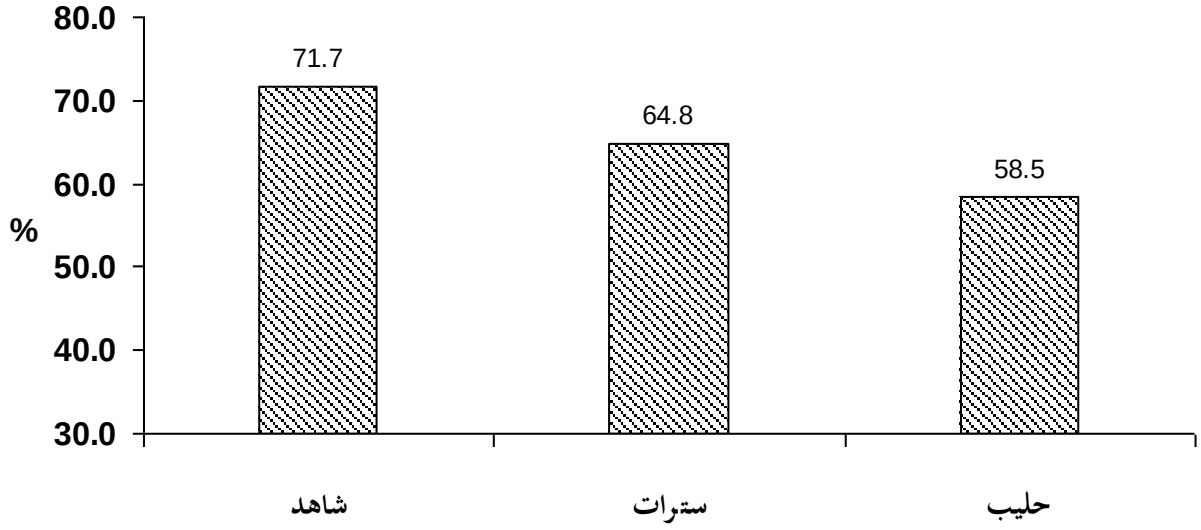


الشكل ٣. النسبة المئوية للنطاف الميتة في السائل المنوي لكباش العواس بعد التمديد مباشرة.

كما وجد (الجدول٤) وجود تأثير معنوي (P<٠,٠٥) لمحاليل التمديد قبل التجميد على حيوية النطاف، إذ بلغت بالمتوسط ٧١,٧%، و٦٤,٨%، و٥٨,٥% للشاهد، والسترات، والحليب على التوالي (الشكل ٤).

الجدول٤. تحليل التباين لحيوية النطاف% ونسبة النطاف الميتة% لكباش العواس قبل التجميد مباشرة.

مصدر التباين	حيوية النطاف %			نسبة النطاف الميتة %		
	DF	متوسط مربعات الانحرافات	P	DF	متوسط مربعات الانحرافات	P
الكباش	3	109.088	0.005	3	103.532	0.028
محاليل التمديد	2	7685.347	0.000	2	8334.125	0.000
التفاعل(كباش×محاليل)	6	1.310	0.999	6	9.366	0.939
الخطأ التجريبي	60	22.875	-	60	31.847	-

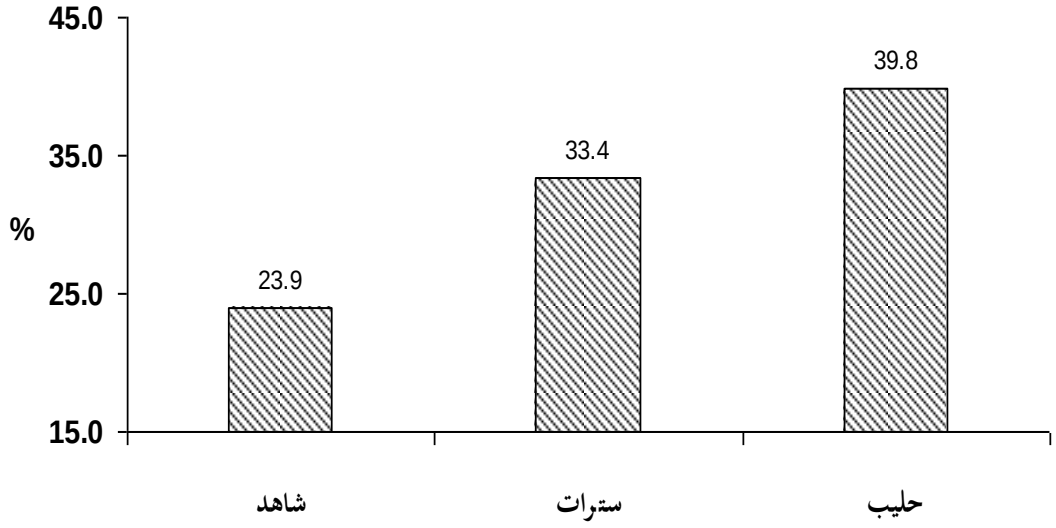


الشكل ٤. المتوسط العام لحيوية النطاف في السائل المنوي الممدد لكباش العواس قبل التجميد مباشرة.

الجدول5. تحليل التباين لحيوية النطاف% ونسبة النطاف الميتة% لكباش العواس بعد الإذابة.

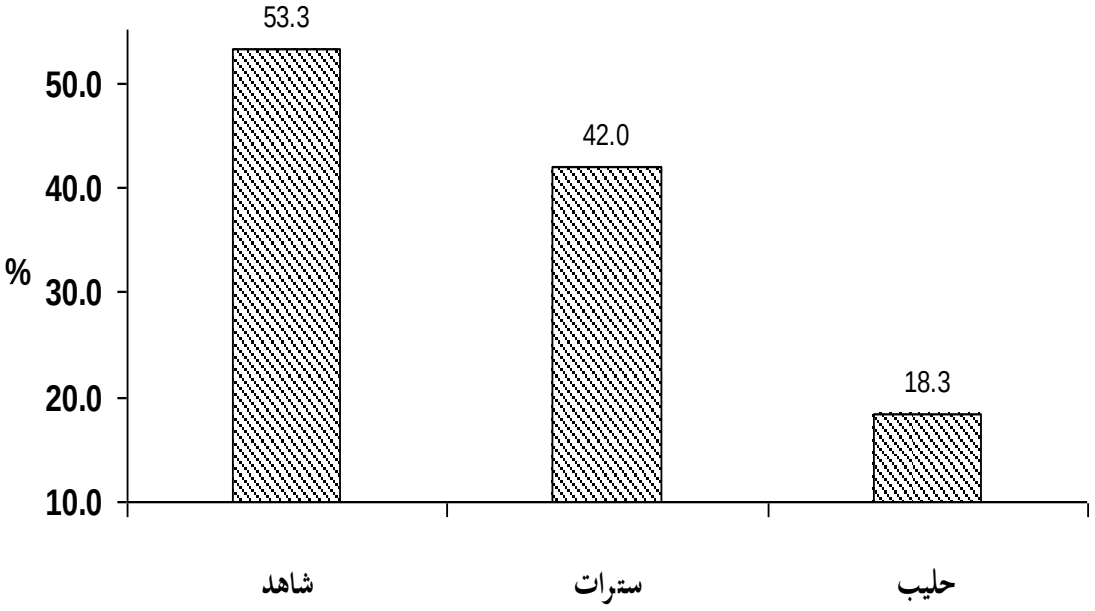
مصدر التباين	حيوية النطاف %			نسبة النطاف الميتة %		
	DF	متوسط مربعات الانحرافات	P	DF	متوسط مربعات الانحرافات	P
الكباش	3	28.704	0.134	3	30.963	0.124
محاليل التمديد	2	1034.375	0.000	2	1539.056	0.000
التفاعل(كباش×محاليل)	6	3.912	0.729	6	4.907	0.926
الخطأ التجريبي	60	14.861	–	60	15.511	–
الكلي	71	–	–	71	–	–

ويتضح من (الشكل ٥) أن متوسط نسبة النطاف الميتة قبل التجميد ارتفعت من ٢٣,٩% في محلول الشاهد إلى ٣٩,٨% في محلول الحليب، وتمركزت فيما بينهما في محلول السترات ٣٣,٤%.



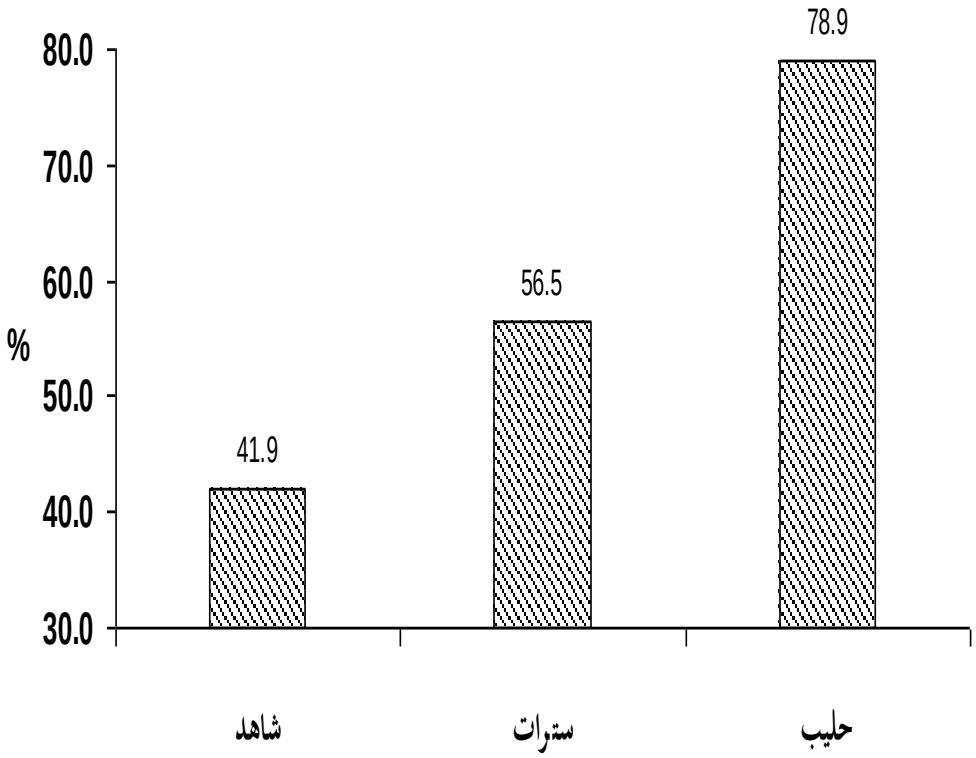
الشكل ٥. المتوسط العام للنطاف الميتة في السائل المنوي الممدد لكباش العواس قبل التجميد مباشرة.

أظهرت نتائج تحليل التباين(الجدول٥) وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) بالنسبة للحيوية بين المحاليل الثلاثة ضمن الكبش الواحد بعد الإذابة، وكانت أعلى نسبة للحيوية في محلول الشاهد وبلغت بالمتوسط ٥٣,٣%، ثم محلول السترات ٤٢,٠%، يليه محلول الحليب ١٨,٣ % (الشكل ٦).



الشكل ٦. المتوسط العام لحيوية النطاف في السائل المنوي الممدد لكباش العواس بعد الإذابة.

كذلك وجد تباين بالنسبة للنطاف الميتة بين المحاليل الثلاثة (P<٠,٠٥) ضمن الكبش الواحد بعد الإذابة، وبلغت بالمتوسط ٤١,٩%، و٥٦,٥%، و٧٨,٩% للشاهد، والسترات، والحليب على التوالي (الشكل٧).



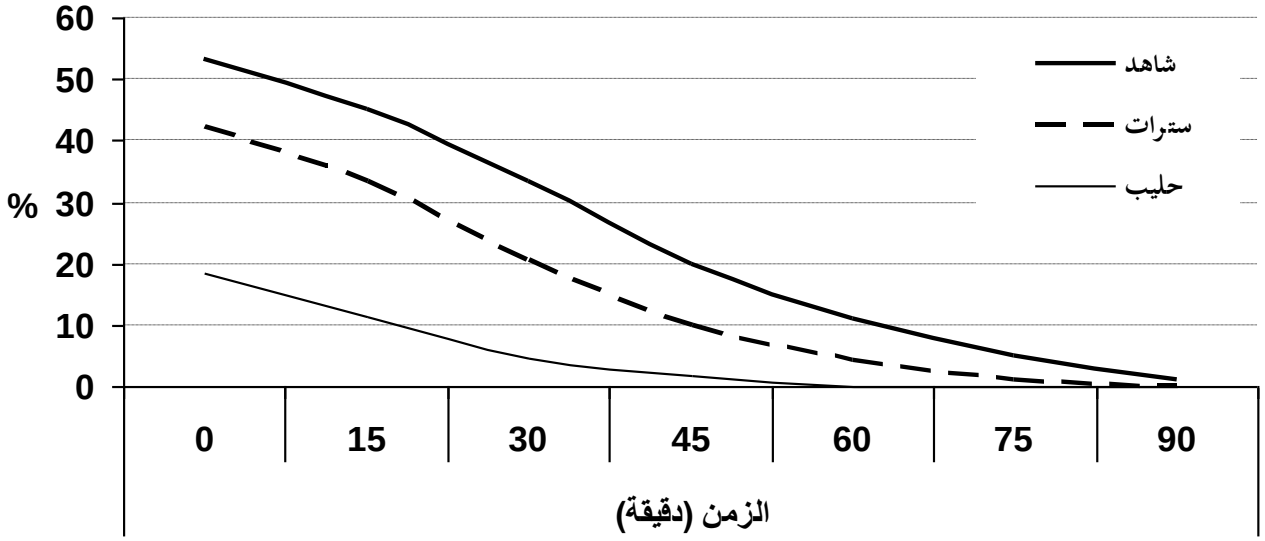
الشكل ٧. المتوسط العام للنطاف الميتة في السائل المنوي الممدد لكباش العواس بعد الإذابة.

وكان لكل من الكبش، ومحلول التمديد، وطول فترة التحضين وتفاعلها مع بعضها البعض (ما عدا الكبش×المحلول×الزمن) تأثير معنوي (P<٠,٠٠١) على القدرة الإخصابية للنطاف في السائل المنوي الممدد والمجمد (الجدول ٦).

الجدول 6. تحليل التباين لحيوية النطاف(القدرة الإخصابية) والنطاف الميتة في السائل المنوي الممدد لكباش العواس خلال فترة التحضين على درجة ٤٥,٥-٤٧,٥مْ.

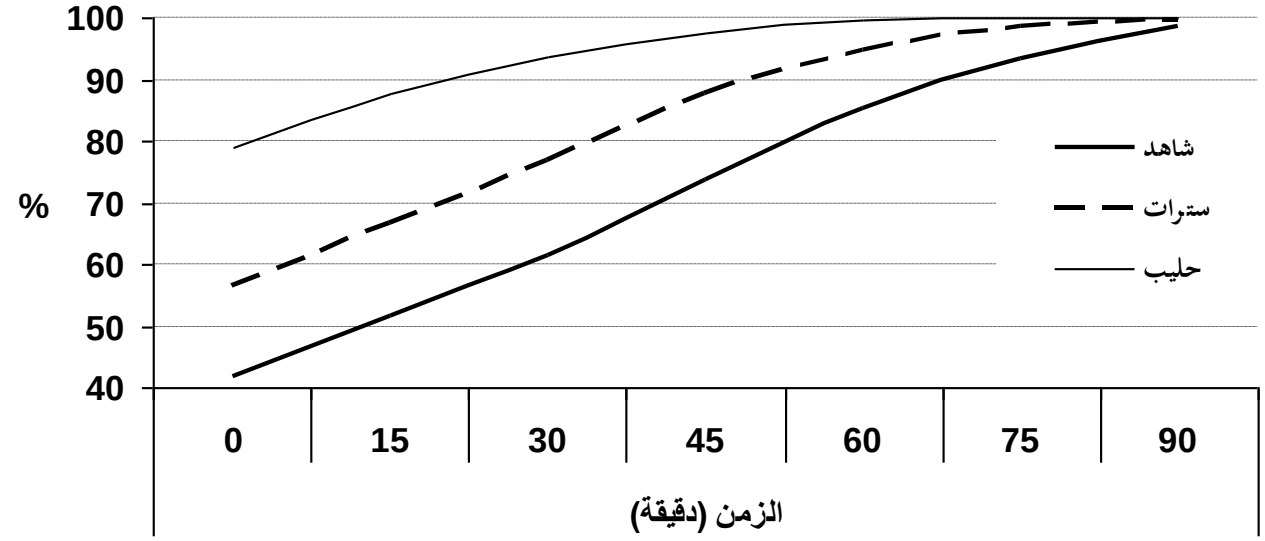
حيوية النطاف %			نسبة النطاف الميتة %		
مصدر التباين	DF	متوسط مربعات الانحرافات	P	DF	متوسط مربعات الانحرافات	P
الكباش	3	620.325	0.000	3	2311.748	0.000
محاليل التمديد	2	15147.770	0.000	2	10292.506	0.000
الزمن	6	15261.569	0.000	6	34563.489	0.000
تفاعل (كباش×محاليل)	6	94.728	0.000	6	413.609	0.362
تفاعل (كباش×زمن)	18	58.951	0.000	18	747.694	0.010
تفاعل (محاليل×زمن)	12	1239.082	0.000	12	20632.105	0.000
تفاعل (كباش×محاليل×زمن)	36	13.380	0.577	36	763.882	0.001
الخطأ التجريبي	420	14.287	-	420	376.525	-
الكلي	503	-	-	503	-	-

وقد أظهرت الكباش كافة النزعة نفسها في الحفاظ على قدرتها الإخصابية مع مرور الزمن (٩٠ دقيقة) خلال فترة تحضينها على درجة حرارة ٤٥,٥-٤٧,٥ مْ، بغض النظر عن محلول التمديد المستخدم (الشكل ٨).



الشكل ٨. النسبة المئوية لحيوية النطاف (القدرة الإخصابية)في السائل المنوي الممدد لكباش العواس خلال فترة التحضين على درجة ٤٥,٥-٤٧,٥مْ.

كما أظهرت الكباش كافة النزعة نفسها في نسبة النطاف الميتة مع مرور الزمن (٩٠ دقيقة) خلال فترة تحضينها على درجة حرارة ٤٥,٥-٤٧,٥ مْ، بغض النظر عن محلول التمديد المستخدم(الشكل٩).



الشكل ٩. النسبة المئوية للنطاف الميتة في السائل المنوي الممدد لكباش العواس خلال فترة التحضين على درجة ٤٥,٥-٤٧,٥مْ.

وتوضح الدراسة (الجدول٧) وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) في القدرة الإخصابية بين المحاليل الثلاثة ضمن الكبش الواحد مع مرور الزمن، حيث تناقصت القدرة الإخصابية في محلول الشاهد من ٥٣,٣±٥,٥ بعد الإذابة مباشرة إلى ١,٢±١,٧ بعد ٩٠ دقيقة من الإحتضان خارج الجسم، وفي محلول السترات تناقصت القدرة الإخصابية من ٤٢,٣±٥,١ بعد الإذابة إلى ٠,١±٠,٣ بعد ٩٠ دقيقة من الإحتضان، أما في محلول الحليب تناقصت القدرة الإخصابية من ١٨,٣± ٤,٦ بعد الإذابة إلى الصفر بعد ٧٥ دقيقة من الإحتضان.

جدول ٧. النسبة المئوية لحيوية النطاف (القدرة الإخصابية) ($\bar{x} \pm SD$) في السائل المنوي الممدد لكباش العواس خلال فترة التحضين على درجة ٤٥,٥-٤٧,٥مْ وفقا لنوع محاليل التمديد.

المحلول	الكبش	فترة التحضين (دقيقة)							LSD 5%
		0	15	30	45	60	75	90	
الشاهد	1	4.5±50.0A a	4.5±45.0A a	5.2±36.7AB b	6.3±25.0A c	6.3±15.0A d	4.6±7.0A e	2.3±1.7A f	5.8
	2	3.8±55.8A a	5.2±48.3A b	5.8±39.2A c	7.4±25.8A d	7.4±15.8A e	4.9±6.7A f	1.9±2.2A f	6.4
	3	7.5±53.3A a	6.8±41.7A b	6.8±26.7C c	5.2±12.5B d	1.2±4.5B e	1.2±1.8A e	0.0±0.0A e	5.8
	4	4.9±54.2A a	3.2±45.0A b	2.0±30.8BC c	4.1±16.7B d	4.1±8.3B e	1.3±3.8A f	1.3±1.0A f	3.8
	جميع الكباش	5.5±53.3 a	5.3±45.0 b	7.0±33.3 c	7.9±20.0 d	6.9±10.9 e	3.9±4.8 f	1.7±1.2 g	3.3
	LSD 5%	-	-	6.4	7.1	6.4	-	-	-----
السترات	1	5.8±39.2A a	5.8±34.2AB a	5.2±22.5A b	5.2±12.5A c	2.8±5.0A d	1.9±1.2A d	0.4±0.2A d	5.1
	2	4.9±45.8A a	6.1±38.3A b	5.2±27.5A c	6.6±14.2A d	5.0±7.7A e	1.9±2.5A ef	0.4±0.2A f	5.6
	3	3.8±40.8A a	3.8±29.2B b	3.8±15.8B c	2.2±5.7B d	1.0±1.5B e	0.0±0.0A e	-	5.1
	4	4.1±43.3A a	4.2±32.5AB b	4.1±16.7B c	2.6±6.7B d	1.7±3.0B e	1.3±0.8A e	0.0±0.0A e	3.5
	جميع الكباش	5.1±42.3 a	5.8±33.5 b	6.5±20.6 c	5.7±9.8 d	3.7±4.3 e	1.7±1.1 f	0.3±0.1A f	2.6
	LSD 5%	-	6.1	5.6	5.5	3.6	-	-	------
الحليب	1	4.5±15.0A a	4.5±10.0B b	1.5±3.7B c	1.3±1.0A cd	0.0±0.0A d	-	-	2.9
	2	3.8±20.8A a	3.8±15.8A b	2.6±6.7A c	1.9±2.7A d	0.8±0.5A d	0.0±0.0A d	-	2.8
	3	5.2±18.3A a	3.8±9.2B b	1.5±4.0B c	1.2±1.3A cd	0.0±0.0A d	-	-	2.9
	4	3.8±19.2A a	3.2±10.0B b	1.2±4.5B c	1.2±1.8A d	0.0±0.0A d	-	-	2.3
	جميع الكباش	4.6±18.3 a	4.5±11.3 b	2.1±4.7 c	1.5±1.7 d	0.4±0.1 e	0.0±0.0A e	-	1.5
	LSD 5%	-	4.6	2.2	-	-	-	-	-------

تشيرالأحرف المختلفة في السطر الواحد إلى وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) بين المتوسطات.
تشير الأحرف المختلفة في العمود الواحد إلى وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) بين المتوسطات.

ويبين (الجدول ٨) وجود فروق معنوية (P<٠,٠٥) في نسبة النطاف الميتة بين المحاليل الثلاثة ضمن الكبش الواحد مع مرور الزمن، حيث ارتفع متوسط النطاف الميتة في محلول الشاهد من ٤١,٩±٥,٥ بعد الإذابة مباشرة إلى ٩٨,٦± ٢,١بعد ٩٠ دقيقة من الإحتضان خارج الجسم، وفي محلول السترات ازدات نسبة النطاف الميتة من٥٦,٥±٦,١ بعد الإذابة إلى ٩٩,٥±٢,٣ بعد ٩٠ دقيقة من الإحتضان، أما محلول الحليب ارتفعت نسبة النطاف الميتة من ٧٨,٩±٥,٧ بعد الإذابة إلى ١٠٠% بعد ٧٥ دقيقة من الإحتضان.

جدول 8. النسبة المئوية للنطاف الميتة (القدرة الإخصابية) ($\bar{x}$±SD) في السائل المنوي الممدد لكباش العواس خلال فترة التحضين على درجة ٤٥,٥-٤٧,٥مْ وفقا لنوع المحاليل

المحلول	الكبش	فترة التحضين (دقيقة)							LSD 5%
		0	15	30	45	60	75	90	
الشاهد	1	3.9±45.3A f	3.9±52.0A e	4.0±61.0A d	4.5±71.5A c	2.8±81.3C b	4.1±91.2B b	2.6±98.2A a	4.4
	2	2.4±42.5A g	3.5±51.8A f	3.0±60.5A e	3.9±72.7A d	4.8±83.2BC c	2.6±91.7B b	2.7±97.3A a	4.0
	3	7.1±39.8A f	6.9±51.7A e	7.3±62.3A d	8.4±75.2A c	4.8±89.0A b	2.9±96.2A a	0.0±100.0A a	7.0
	4	6.7±40.0A g	4.9±50.8A f	4.9±61.8A e	2.8±76.0A d	2.3±87.8AB c	1.7±94.2AB b	1.3±99.0A a	4.3
	جميع الكباش	41.9±5.5 g	5.5±51.6 f	61.4±4.4 e	5.3±73.8 d	4.9±85.3C c	3.4±93.3 b	2.1±98.6 a	2.5
	LSD 5%	-	-	-	-	4.7	3.5	-	-----
السترات	1	5.2±59.8A e	3.6±70.0A d	3.6±79.5A c	3.7±88.2A c	3.3±94.7B b	2.0±98.5AB ab	0.8±99.7A a	4.0
	2	5.3±54.5A f	5.0±64.0A e	4.1±74.0A d	4.0±84.8A c	3.3±91.8B b	2.0±96.5B a	4.5±98.2A a	4.9
	3	6.7±57.0A e	6.6±66.3A d	±77.3A c	5.3±89.8A b	1.9±97.5A a	0.0±100.0A a	-	5.2
	4	6.9±54.8A f	6.5±66.3A e	4.4±75.8A d	3.5±87.7A c	2.3±94.8AB b	1.3±99.2AB ab	0.0±100.0A a	5.0
	جميع الكباش	6.1±56.5 f	5.6±66.7 e	4.6±76.7 d	4.0±87.6 c	3.3±94.7 b	2.0±98.5 a	2.3±99.5 a	2.4
	LSD 5%	-	-	-	-	3.3	3.5	-	------
الحليب	1	5.6±82.7A d	2.1±91.2A c	1.9±96.5AB b	1.5±98.8A ab	0.0±100.0A a	-	-	2.9
	2	4.3±76.7A e	3.4±85.3A d	2.6±91.8C c	2.2±96.2A b	1.6±99.2A a	0.0±100.0 a	-	3.0
	3	6.3±79.3A d	5.2±87.7A c	3.0±94.0BC b	2.3±97.5A ab	0.0±100.0A a	-	-	4.0
	4	77.0A± 5.5 d	4.3±86.8A c	92.5C±2.4 b	1.7±97.8A a	0.0±100.0A a	-	-	3.4
	جميع الكباش	78.9±5.7 e	4.3±87.8 d	3.0±93.7A c	2.1±97.6 b	0.8±99.8 a	0.0±100.0 a	-	1.7
	LSD 5%	-	-	3.0	-	-	-	-	-------

تشيرالأحرف المختلفة في السطر الواحد إلى وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) بين المتوسطات.
تشير الأحرف المختلفة في العمود الواحد إلى وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) بين المتوسات.

المناقشة

Discussion

خامساً: المناقشة Discussion :

بينت النتائج (الجدول١) أن مواصفات السائل المنوي لكباش العواس تختلف عن غيره من العروق الأخرى، إذ بلغ متوسط حجم القذفتين معا في ذكور لعواس ٢,١٣سم٣، وتراوح لونها مابين الحليبي والكريمي الكثيف، وبلغ متوسط تركيزها 3.15 مليار/سم٣.

وأظهرت النتائج (الجدول٢) عدم وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) بالنسبة لحيوية النطاف، ونسبةالنطاف الميتة بين الكباش الأربعة بعد الجمع مباشرة، ويعزى ذلك إلى ظروف الرعاية نفسها، وأعمارها وأوزانها المتقاربة، وجميعها منتخبة وراثيا. ووصلت الحيوية بالمتوسط إلى٨١,٨٦%، أما المتوسط العام للنطاف الميتة بلغ ١٤,٨% بعد الجمع مباشرة (الشكل١).

كما بينت النتائج (الجدول٣) وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) للحيوية بين المحاليل الثلاثة ضمن الكبش الواحد بعد التمديد مباشرة، وبلغت بالمتوسط ٧٦,٧، و٧٤ و٦٩,٤% للشاهد، والسترات، والحليب، على التوالي (الشكل٢). وكان محلول الشاهد الأفضل بين المحاليل في حفظ حيوية النطاف بعد تمديد السائل المنوي لكباش العواس، وهذا يتوافق مع ما وجده Kenney وزملاؤه (١٩٨٣) الذين أكدوا أن معدل حيوية النطاف بعد تمديد السائل المنوي يختلف حسب نوع محلول التمديد، بمافيها محلول الحليب، واقترح لتمديد السائل المنوي عند استخدامه للتلقيح الطازج، إذ أعطى نتائج جيدة، وأوصي باستخدام هذه الطريقة في النرويج (Paulenz وزملاؤه، ٢٠٠٣).

كما أوضحت النتائج (الجدول٣) وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) بالنسبة للنطاف الميتة بين المحاليل الثلاثة ضمن الكبش الواحد، وبلغت بالمتوسط ١٩,٢، و٢٤,١، و٢٩ % للشاهد، والسترات، والحليب، على التوالي،(الشكل٣). وهذا ما أكده Marques وزملاؤه (٢٠٠٦) أن تركيب محلول التمديد له تأثير على حياة النطاف، وكانت حركة النطاف ونسبتها الحية في السائل المنوي الممدد بصفار البيض مع سترات الصوديوم أفضل مقارنة مع الحليب الخالي الدسم (Banu وزملاؤه، ١٩٨٨).

كما بينت النتائج (الجدول ٤) وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) للحيوية بين المحاليل الثلاثة ضمن الكبش الواحد قبل التجميد، وبلغت بالمتوسط ٧١,٧، و٦٤,٨، و٥٨,٥ % للشاهد، والسترات، والحليب، على التوالي (الشكل٤).

كما أظهرت النتائج (الجدول ٤) وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) بالنسبة للنطاف الميتة بين المحاليل الثلاثة ضمن الكبش الواحد قبل التجميد، وبلغت بالمتوسط ٢٣,٩، و٣٣,٤، و٣٩,٨% للشاهد، والسترات، والحليب على التوالي (الشكل٥). وكان محلول الشاهد أفضلها، يليه محلول السترات، ثم محلول الحليب، وهذا يتعارض مع Das وزملاؤه (١٩٨٥) الذين وجدوا أن محلول

الحليب يحافظ على حركة النطاف ونسبتها الحية عند الدرجة ٥مْ بشكل أفضل مقارنة مع محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض.

وأظهرت النتائج (الجدول٥) وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) بالنسبة للحيوية بين المحاليل الثلاثة ضمن الكبش الواحد بعد الإذابة، وكانت أعلى نسبة للحيوية في محلول الشاهد، وبلغت بالمتوسط ٥٣,٣، ثم محلول السترات ٤٢، يليه محلول الحليب ١٨,٣ % (الشكل٦). وهذه النتائج تتفق مع yutaka وزملاؤه (٢٠٠٨) الذين وجدوا أن استخدام محاليل تمديد تحتوي مشتقات غير حيوانية تؤدي إلى زيادة في حركة النطاف مقارنة مع محاليل التمديد التي تحتوي مشتقات حيوانية، بالتالي كان محلول الأندروميد أفضلها مقارنة مع محلولي السترات والحليب، كذلك صفار البيض يحافظ على سلامة أغلفة النطاف (Chehadeh، ٢٠٠٠)، وكانت النسبة المئوية للنطاف المتحركة في محلول السترات المضاف إليه ٧% غليسيرول (Das و Rajkonwar،a و b،1995) أعلى مقارنة مع محلول الحليب(Al-Juburi ، 1987)، بالتالي كان محلول السترات أفضل مقارنة مع محلول الحليب.

ويوضح (الجدول٥) وجود فرق معنوي (P<٠,٠٥) بالنسبة للنطاف الميتة بين المحاليل الثلاثة ضمن الكبش الواحد بعد الإذابة، وبلغت بالمتوسط ٤١,٩، و٥٦,٥، و٧٨,٩ % للشاهد، والسترات، والحليب على التوالي (الشكل٧)، ويلاحظ أن محلول السترات حافظ على حياة النطاف بعد الإذابة بشكل أفضل مقارنة مع محلول الحليب (Tekin، 1982)، أما محلول الشاهد فيشكل بديل أكثر نفعا مقارنة مع ممددات الحليب، والسترات، من أجل مداولة السائل المنوي لذكور العواس (Gil وزملاؤه، 2003).

ويبين (الجدول٧) أن حيوية النطاف مقدرة على أساس حركتها التقدمية، أونسبة النطاف الميتة، كانت تنخفض وبصورة مضطردة مع كل خطوة من خطوات مداولة السائل المنوي، بغض النظر عن محلول التمديد المستخدم.

إن حركة نطاف الكبش بعد التجميد والإذابة في شروط خارج الجسم مشابهة لتلك داخل الجسم (Sadhan وزملاؤه، 2004)، لذا يمكن تقييم القدرة الإخصابية للنطاف اعتمادا على احتضانها خارج الجسم. فالاحتضان المطول يسبب تدهور الجسيم الطرفي لنطاف الكبش (Pontbriand وزملاؤه، 1989)، وتعد سرعة النطاف مؤشر مهم لأنها مرتبطة بالخصوبة (Aitken، 1990). بالتالي توجد علاقة إرتباط محكمة بين حركة النطاف وقدرتها الإخصابية.

ويبين الجدول٧ انخفاض حيوية النطاف في محلول الشاهد بمرور الزمن أثناء احتضانها خارج الجسم من ٥٣,٣ % بعد الإذابة مباشرة إلى ١,٢ % بعد ٩٠ دقيقة من الاحتضان خارج الجسم، أما في محلول السترات انخفضت حيوية النطاف من ٤٢,٣ بعد الإذابة مباشرة إلى ٠,١بعد ٩٠

دقيقة من الاحتضان خارج خارج الجسم بدرجة حرارة ٤٥,٥– ٤٧,٥ م، وتناقصت الحيوية في محلول الحليب من ١٨,٣ بعد الإذابة إلى الصفر خلال ٧٥ دقيقة من الاحتضان خارج الجسم على درجة حرارة ٤٥,٥–٤٧,٥ مْ، وقد حافظ محلول السترات على حيوية السائل المنوي الممدد بعد الإذابة (Al– Juburi ، 1987)، بشكل أفضل من محلول الحليب (Shrestha، ٢٠٠٥)، أما محلول الشاهد حافظ على خصوبة النطاف بصورة أفضل مقارنة مع محلول السترات والحليب (Gil، ٢٠٠٣).

كما بين الجدول ٨ وجود فروق معنوية (P<٠,٠٥) في نسبة النطاف الميتة بين المحاليل الثلاثة ضمن الكبش الواحد مع مرور الزمن، حيث ارتفعت نسبة النطاف الميتة في محلول الشاهد من ٤١,٩ %بعد الإذابة مباشرة إلى ٩٨,٦% بعد ٩٠ من الاحتضان خارج الجسم، أما في محلول السترات ازدادت نسبة النطاف الميتة من ٥٦,٥±٦,١ بعد الإذابة إلى ٩٩,٥% بعد ٩٠ دقيقة من الاحتضان ، وفي محلول الحليب ارتفعت نسبة النطاف الميتة من ٧٨,٩ %إلى ١٠٠% بعد ٧٥ دقيقة من الاحتضان، بالتالي صفار البيض يحافظ على حركة وسلامة أغلفة النطاف بصورة أفضل من الحليب خالي الدسم (Jones و Bavister، ٢٠٠٠)، وحافظ محلول الشاهد على سلامة أغلفة النطاف بعد الإذابة، وكان أفضل من محلولي السترات والحليب وهذه النتائج تتوافق مع Gil و زملاؤه (٢٠٠٣).

وعلى الرغم من أن الكباش أظهرت النزعة نفسها في قدرتها الإخصابية، وفي مقاومتها للإحتضان على درجة الحرارة العالية، و كان الكبش ١ هو الأفضل بغض النظر عن محاليل التمديد المستخدمة، فقد استطاع المحافظة على قدرته الإخصابية مدة أطول مع مرور الزمن، ولم تظهر فروق معنوية في حيوية النطاف بعد مرور ١٥ دقيقة على الإحتضان (جدول ٧)، مما يدل على وجود تباين بين الكباش في قدرتها الإخصابية، ويمكن الإعتماد على هذه الطريقة لإنتخاب ذكور التلقيح الإصطناعي.

الجدول 9. معدل بقاء النطاف (الحيوية) ($\bar{x}$±SD) ونسبة النطاف الميتة ($\bar{x}$±SD) خلال مراحل مداولة السائل المنوي في كباش العواس.

	الحيوية %			النطاف الميتة %		
بعد الجمع	٣,٦±٨١,٩			٣,٣±١٤,٨		
	الشاهد	السترات	الحليب	الشاهد	السترات	الحليب
بعد التمديد	٣,٥±٧٦,٧	٤,٢±٧٤,٠	٣,٧±٦٩,٤	٣,٦±١٩,٢	٣,٥±٢٤,١	٣,٩±٢٩,٠
معدل البقاء%	93.7	90	84.7	130	163	196
قبل التجميد	٣,٥±٧١,٧	٣,٥±٦٤,٨	٤,٥±٥٨,٥	٤,٠±٢٣,٩	٤,١±٣٣,٤	٣,٦±٣٩,٨
معدل البقاء%	93.5	88	84.4	126	137	139
بعد الإذابة	٥,٥±٥٣,٣	٤,٨±٤٢,٠	٤,٦±١٨,٣	٥,٥±٤١,٩	٦,١±٥٦,٥	٥,٧±٧٨,٩
معدل البقاء%	74	64.8	31.3	175	142	198
معدل البقاء الكلي	65	51	26.4	283	382	533

وقد ظهرت فروق معنوية (P<٠,٠٥) في متوسطات الحيوية بين المحاليل المستخدمة. وكان معدل البقاء الكلي (بعد الإذابة) في محلول التمديد الشاهد، والمقدرة بنحو٦٥% من حيوية النطاف عند الجمع هي الأفضل. واستطاع محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض من المحافظة على نحو٥٠% من حيوية النطاف بعد الإذابة، وكان محلول الحليب هوالأسوء، إذ لم يستطيع من المحافظة على أكثر من ٢٦,٤% من حيوية النطاف بعد الإذابة (الجدول ٩).

كما تتضاعف نسبة النطاف الميتة (الجدول٩)، فقدرت بنحو٢٨٣% في محلول الشاهد، و٣٨٢% في محلول السترات، و٥٣٣% في محلول الحليب. مما يشير أن محلول الشاهد كان الأفضل بنحو٣٠% من محلول السترات، وأكثر بنحو١٨٨% من محلول الحليب.

واستنتج بأنه يمكن تحضير محاليل تمديد محلية تفيد في زيادة حجم السائل المنوي، والمحافظة على حيويته، ليستخدم بشكل طازج وممدد(محلول تمديد الحليب)، أوبشكل ممدد ومجمد(سترات الصوديوم).

وأن اختبار تحضين النطاف على درجة حرارة عالية بعد الإذابة، يمكن أن يعتبر كمؤشر أولي للتعبير عن القدرة الإخصابية للنطاف، وبالتالي في المفاضلة بين الكباش المستخدمة، مما يفيد في تسريع عمليات اختبار ذكور التلقيح ونشر تقانة التلقيح الإصطناعي في سورية.

سادساً : الإستنتاجات Conclusion :

* يمكن تمديد وحفظ السائل المنوي عند الدرجة ٥ مْ لذكور العواس بكفاءة مقبولة بالنسبة لمحلول الحليب الخالي الدسم، وتزداد الكفاءة في محلول السترات مع صفار البيض، وتكون أعلى نسبياً في المحلول القياسي.
* وجد عند حفظ السائل المنوي بالتجميد عند الدرجة –١٩٦ مْ في النتروجين السائل أن المحلول القياسي كان الأفضل في حفظ النطاف، أما محلول الحليب كان الأسوء مقارنة بالمحلول القياسي، وكان محلول السترات أفضل من محلول الحليب ومتقارب من المحلول القياسي.
* وجد أن المحلول القياسي كان الأفضل في حفظ النطاف المعرضة للإجهاد الحراري لفترة زمنية أطول مقارنة مع محلول الحليب، أما محلول السترات كان متقارب نسبيا مع المحلول القياسي.
* على أية حال إن تأثير استخدام هذه الممددات على معدلات الخصوبة في أغنام العواس يحتاج للدراسة على نطاق أوسع، لتسجيل عددا أكبر من الحيوانات، وعلى مدار العام.

سابعاً: التوصيات والمقترحات Suggestion and Recommendations

* يمكن استخدام محلول الحليب المحضر محلياً لتمديد السائل المنوي واستخدامه في التلقيح الإصطناعي بشكل ممدد وطازج.
* يمكن استخدام محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض كمحلول يصنع محليا لتمديد السائل المنوي، وتجميده بدلاً من المحلول المستورد.
* إيجاد الوسائل الكفيلة بالمحافظة على غنم العواس وتكاثرها باعتبارها السلالة الأكثر انتشارا في سورية ومتأقلمة مع الظروف المحلية. وتطبيق الطرق العلمية الحديثة لتحسينها، وزيادة عددها. والشروع باستخدام تقانة التلقيح الإصطناعي لما لها من أهمية في زيادة أعداد الحيوانات المحسنة بوقت سريع نسبيا
* متابعة دراسة فعالية محاليل التمديد المحلية الأخرى للوصول إلى أنسب المحاليل المحلية والمتقاربة مع المحاليل الأجنبية، وبالتالي توفير النقد الأجنبي من جراء عمليات الإستيراد لهذه المحاليل.

* استخدام وتطبيق محاليل التمديد هذه في تلقيح قطعان العواس، وإبراز نتائج الخصوبة الحقلية من تلقيح الأغنام، سواء كان بالسائل المنوي الطازج أوالمجمد.
* التمني على الجهات المسؤولة في وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي اعتماد نتائج هذا البحث، وتطبيق تقانة التلقيح الصناعي لما لها من أثر إيجابي في اسراع عملية التحسين الوراثي لأغنام العواس في سورية.

المراجع
References

ثامنا: المراجع :

٨-١ المراجع العربية:

الأعرج، محمد وإبراهيم، إبراهيم.١٩٩٧. التلقيح الاصطناعي (الجزء النظري والعملي). جامعة البعث- سورية.

البليبلي، محمد والقرعاوي، علي.١٩٩٨. فيزيولوجيا التناسل الخيلي الإنسال وإدارة الإسطبلات. كلية الزراعة- جامعة الملك سعود- السعودية.

جواسرة، خليل. ٢٠٠٧. أساسيات التلقيح الإصطناعي للأغنام والماعز .البقعة- الأردن- مطبعة جراسيا.

زكريا، عبد الحميد وسلهب، سليمان.١٩٩١. فيزيولوجيا التناسل والتلقيح- القسم النظري. جامعة دمشق- سورية- مطبعة الاتحاد.

سلهب، سليمان والمصري، ياسين.٢٠٠٣. فعالية التلقيح الإصطناعي في الأداء التناسلي في نعاج العواس المعالجة هرمونيا داخل فصل التناسل. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. مجلد**١٩**(١): ٨١- ٩٤.

سلهب، سليمان وزايد، عبد الله. ١٩٩٤. فيزيولوجيا التناسل والتلقيح الاصطناعي، الجزء العملي. جامعة عمر المختار، الجماهيرية العربية الليبية الشعبية الاشتراكية العظمى.

سلهب، سليمان وسلوم، عبير.٢٠١٠. فيزيولوجيا التناسل في الحيوانات الزراعية- القسم العملي. جامعة دمشق- سورية.

طليمات، فرحان. ١٩٩٦. موسوعة عروق الأغنام في الدول العربية. أكساد/ث ح /ن ١٥٥/.

العاني، أحمد. اسحق، محمد. الراوي، عبد الرزاق. عبد الكريم، طلال. ٢٠٠٨. السلوك الجنسي وصفات السائل المنوي للعجول متباينة القدرات الوراثية لإنتاج الحليب. المجلة الأردنية في العلوم الزراعية، المجلد ٤، العدد ١.

كوجان، عبد الحميد. ١٩٨١. التلقيح الصناعي. كلية الطب البيطري- جامعة البعث- سوريا- مطبعة خالد بن الوليد.

المجموعة الإحصائية.٢٠٠٨. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي- دمشق-سورية.

المرستاني، محمد ربيع. ٢٠١٠. دراسة حالة الأمن الغذائي في الجمهورية العربية السورية. المركز الدولي للسياسات الزراعية – وزارة الزراعة. سورية.

منزلجي، محمد.١٩٩٧. التلقيح الاصطناعي والرعاية التناسلية. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي- نشرة رقم**١٤٤**- دمشق- سورية.

٨- ٢ المراجع الأجنبية References:

Amdal, J., K. E. Johansen, and T. Grafter. 1982. Artificial Insemination of Ewes Using Frozen Semen. Proc. 14th Nord. Vet. Cong., 5- 9 July, *Copenhagen*; 349-350.

Abdel- Hakeam, A. A., E. F. Graham, I. A. Vazquez, and K. M. Chaloner. 1991. Studies On the Absence of Glycerol in Unfrozen and Frozen Ram Semen. Development of an Extender for Freezing: Effects of Osmotic Pressure, Egg Yolk Levels, Type of Sugars, and the Method of Dilution. *Cryobiology;* **28***: 43- 49.*

Aisen, E.G., H. L. Alvarez., A. Venturino., and J.J. Grade. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*; **53**: 1053–1061.

Aitken, R. J. 1990. Motility Parameters and Fertility. In: Gagnon C, Editor. Control of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects. Boca Raton*: CRS Press*; 285– 302.

Al- Juburi, S. A. 1987. Studies on Preservation of Ram Semen by Freezing and other Methods. *Ph. D. Faculty of Agric. Zagazig Univ*.

Andersen, B. K. 1999. Artificial Insemination in Sheep in Norway. In. Söderquist L, Forsberg, M, Rodriguez- Martinez, H, Editors. Proceedings of the Centre for Reproductive Biology (CRB): Special Symposium on Aspects of Ovine Reproduction. CRB Report, vol. 8. Uppsala, *Swedish University of Agricultural Science; 35- 44.*

Azzarini, M., F. Valledor. 1988. Inseminación Intrauterine Cervical Con Semen Congelado Fresco en Ovejas en Celo Natural. *Prod Ovina*; **1**: 1- 8.

Banu, L. A., S. S. Hussain, and R. Amin. 1988. The Effect of Goat Milk as Buck Semen Diluter Compared with Egg Yolk- Citrate and Powdered Milk. Bangladesh. *J. Anim. Sci*., **17**: 7(A. B. A., vol. 58, No. 4440).

Berg, K. A. 1989. Künstliche Besamung (KB) Mit Gefriersperma Beim Schaf-Insemination Spunkt und Ein- Oder Zweimalige Besamung. *Tieriirztl. Umsch.,* **44**: 322-325.

Chehadeh Ramez. 2000. Studies on Preservation of Male Goat Semen. *Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo Univ.*

Colbjørnsen EI. Seminstatistikk Sau 2001 (AI- Statistics 2001 in Ewes). *Sau Geit.* 2002; **3**: 5- 44..

Colas, G., M. Tryer, Y. Guerin., and D. Aguer. 1980. Fertilizing ability of ram sperm stored in aliquid state during 24 hours. Proceedings of the 9th International Congress on *Animal Reproduction and A.I. Madrid,* III; 315.

Correa, J. R., M. M. Pace and P. M. Zavos. 1997. Relationships Among Frozen- Thawed Sperm Characteristics Assessed Via the Routine Semen Analysis, Sperm Functional Tests and Fertility of Bulls in an Artificial Insemination Program. *Theriogenology;* **48**: 721.

Das, K. K., and C. K. Rajkonwar. 1995a. Effect on the Motility of Buck Semen during Freezing with Lactose Egg Yolk Glycerol Extender. Inter. *J. Anim. Sci;* **10**: 127. (A. B. C., vol.63, No. 6528*).*

Das, K. K., and C. K. Rajkonwar. 1995b. Effect of Glycerol and Equilibrium time on the Post Thaw Motility of Spermatozoa of Buck in Maltose Egg Yolk Glycerol Extender. Ind. *J. Anim. Repord;* **16***:* 57.(A. B. A., vol. 63, No. 6529*).*

Das, K. K., and C. K. Rajkonwar. 1994. Morphological Changes of Acrosome during Equilibration and after Freezing of Buck Semen with Raffinose Egg Yolk Glycerol Extender. *Ind. Vet. J;* **71**: 1098.

Das, A., B. N., Kakati, C. K. Rajkonwar and B. N. Borgohain. 1985. Survival of Buck Spermatozoa in Egg Yolk Citrate, Milk and Tris Diluters at 4 c. Ind. *J. Anim.* Sci; **55**: 670.

Deka, B.C., and A. R. Roa. 1989. Effect of Glycerolization Methods on the Quality of Frozen Goat Semen. Ind. Vet. J., **66**: 135

De Pauw. I. M. C., A. Van Soom, K. Mintiens, S. Verberckmoes, A. De Kruif. 2003. In Vitro Survival of Bovine Spermatozoa Stored at Room Temperature Under Epididymal Conditions. *Theriogenology;* **59**: 1093- 1107.

El- Alamy, M. A., and R. H. Foote. 2001. Freezability of Spermatozoa from Finn and Dorset Rams in Multiple Semen Extenders. *Anim Reprod Sci;* **65**: 54- 245.

Eppleston, J., and W. M. C. Maxweell. 1993. Recent Attempts to Improve Fertility of Frozen Ram Semen Inseminated into The Cervix.Wool Tech. *Sheep Breed;* **411**(3): 291- 302.

Evans,G. and W. M. C. Maxwell. 1987. Salamon´s Artificial Insemination of Sheep and Goat. Butterworth, Sydney, Boston, London, Singapore, Wellinton.

Fiser, P. S., and R.W. Fairful. 1984.The Effect Glycerol Concentration and Cooling Velocity on Cryosurvival of Ram Spermatozoa Frozen in Straws. *Cryobiology;* **21**: 542.

Fiser, P. S., and R.W. Fairful. 1989. Combined Effects of Glycerol Concentration, Cooling Velocity, and Osmolality of Skim Diluents on Cryopreservation of Ram Spermatozoa. *Theriogenology*; **25**: 473.

Fiser, P. S., C. Hansen, L. Underhill., and G. J. Marcus. 1991. New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar semen. *Cryobiology*; **28**: 454 –9.

Foote, R. H., CC. Brockett, and MT. Kaproth. 2002. Motility and Fertility of Bull Sperm in Whole Milk Extender Containing Antioxidants. *Anim Reprod Sci*; **71**:13– 23.

Foote, R. H. 2003. Fertility Estimation: Areview of Past Experience and Future Prospects. *Anim Reprod Sci*; **75**: 119–139.

Garde. J. J., A. del Olmo, A.J. Soler, G. Espeso, M. Gomendio and E.R.S. Roldan. 2008. Effect of Egg Yolk, Cryoprotectant, and Various Sugars on Semen Cryopreservation in Endangered Cuvier's Gazelle (Gazella Cuvieri). *Animal Reproduction Science*; **108**(3-4): 384- 401.

Gil. J., L. Nils., S. Lennart., and R. M. Heriberto. 2003. Influence of Extender, Temperature, and Addition of Glycerol on Post- Thaw Sperm Parametrs in Ram Semen. *Theriogenology*; **59**: 1241- 1255.

Graham, E. F., B.G. Carbo, and M. M., Pace. 1978. Current Status of Semen Preservation in the Ram, Boar and Stallion. *J. Anim. Sci*; **47** (Suppl.2): 80.

Hafez, E . S. E. 1980. Trasport and Survival of Gametes. In : Reproduction in Farm Animals. Hafez, E .S. E. (Ed.) : 203- 224. *Lea and Febiger, Philadelphia, U .S. A.*

Holt,W. V., R. D. North. 1994. Effects of Temperature and Restoration of Osmotic Equilibrium during Thawing on the Induction of Plasma Membrane Damage in Cryopreserved Ram Spermatozoa. *Biol Reprod*; **51**: 24- 414.

Holt,W.V., T. Abaigar and H. N. Jabbour. 1996. Oestrus Synchronization, Semen Preservation and Artificial Insemination in the Mohor Gazelle (Gazella damamhorr) for the Establishment of a Genome Resource Bank Programme, Reprod. *Fertil. Dev*; **8**: 1215– 1222.

Holt,W.V. 1997. Alternative Strategies for the Lng-Term Preservation of Spermatozoa. Reprod. *Fertil. Dev;* **9***:*309- 319.

Holt,W.V. 2000. Basic Aspects of Frozen Storage of Semen. *Anim. Reprod. Sci*; **62**: 3– 22.

Jones, J. M., and B. D. Bavister. 2000. Acidification of Intracellular PH in Bovine Spermatozoa Suppresses Motility and Extends Viable Life. *J. Androl*; **21**: 24- 616.

Kenney, R., J. Hurtgen, Ri. Pierson, D. Witherspoon. and J. Simons. 1983. Manul for Clinical Fertility Evaluation of the Stallion.

King, G. J., J. W. Macpherson. 1967. Boar Semen Studies. II. Laboratory and Fertility Results of Amethod for Deep Freezing. Can. *J. Comp Med Vet Sci;* **31**:7- 46.

Lahnsteiner, F.,B. Berger, T. Weismann. 2003. Effects of Media, Fertilization Technique Extender, Straw Volume, and Sperm to Egg Ratio on Hatchability of Cyprinid Embryos, Using Cryopreserved Semen. *Theriogenology;* **5**: 829– 841.

Langford. G. A., L. Anis Worth and M. S. Wolyntz. 1982. Reproductive Response of Progestogen- Treated Sheep in Confinement to a Single and Double Insemination .*J. Anim. Sci*; **54** (1): 12- 17.

Laura. M., C. Accardoa, S. Pilichia, M. Dattenaa, F. Chessaa, B. Chessab, A. Brancaa, and P. Cappai. 2005. Benefits of Tempol on Ram Semen Motility and in Vitro Fertility: A preliminary Study. *Theriogenology;* **63**: 2243– 2253.

Lebouef, B., Ph. Guillouet, F. Batellier, D. Bernelas, J. L. Bonn´e,Y. Forgerit, G. Renaud, M. Magistrini. 2003. Effect of Phosphocaseinate on the in Vitro Preservation of Fresh Semen. *Theriogenology*; **60**: 867– 877.

Leibo, S.P., H. Songsasen. 2002. Cryopreservation of Gametes and Embryos of Non- Domestic Species. Theriogenology; **57**: 303– 326.

Lillo, A. 1984. Lambing Rates after Single Inseminations of Ewes with Liquid or Deep- Frozen Semen. Proc. 10th Int. Congr. *Anim. Reprod. A.I., 10- 14 June, Illinois, Vol. **3**, Paper No. 373.*

Manjunath , P., A. Bergeron, J. Lefebvre and J. Fan. 2007. Seminal Plasma Proteins: Functions and Interaction with Protective Agentsduring Semen Preservation. In: E.R.S. Roldan and M. Gomendio, Editors, Spermatology, SRF Supplement 65, Nottingham University Press, *Nottingham*. 217– 228.

Marques, C.C., J.P. Barbas, M.C. Baptista, C. Serra, M.I. Vasques, R.M. Pereira, S.C. Gonçalves, A. E. M. Horta. 2006. Reproduction in the Ovine Saloia Breed: Seasonal and Individual Factors Affecting Fresh and Semen Performance, in Vivo and in Frozen Vitro Fertility. In: Animal Products from Mediterranean Area. *EAAP* Pub **119:** 331– 336.

Mary, G. Abdel- Malak. 1994. Relationship Between Hormonal and Fertility Parameters in Rams. Thesis, *Ph. D., Fac. Vet. Med., Cairo Univ.*

Mazur, P. 1985. Basic Concepts in Freezing Cells, L. A. and Larsson, K. (eds) Deep Freezing of Boar Semen. *Swedish Univ. of Agriculture Sci., Uppsala, pp.91.*

Matsuoka, T., H. Imai, H. Kohno, Y. Fukui. 2006. Effects of Bovine Serum Albumin and Trehalose in Semen Diluents for Improvement of Frozen-Thawed Ram Semen. *J. Reprod Dev*; **52**: 675– 683.

Meara, C.M.O, J.P. Hanrahan, N.S. Prathalingam, J.S. Owen, A. Donovan, S. Fair, F. Ward, M. Wade, A.C.O. Evans and P. Lonergan. 2008. Relationship between in Bitro Sperm Functional Tests and in Vivo Fertility of Rams Following Cervical Artificial Insemination of ewes with Frozen- thawed semen. *Theriogenology*; **69**(4) 513- 522.

Meister, A. 1983. Selective Modification of Glutathione Metabolism. *Science*; **230**:7- 472.

Menger, H., G. Brueckner, and R. Herold. 1987. Shafbesamung, Biologie, Technik, Organisation.2. Durchgesehene Auflage. VEB Deutscher Landwrit Schaftsverlag. Berlin,. P. 176.

Molinia, F.C., G. Evans and W.M.C. Maxwell. 1994. In vitro evaluation of zwitterions buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev;* **34**: 491– 500.

Mvkelvey, B. 1999. Artificial Insemination and Embryo Transfer for Genetic Development in Sheep. the Current Seen in *Practic*; 190- 195.

Nöthling, J. O., D. Gerber, B. Colenbrander, Maaike Dijkstra, Tynke Bakker and K. Decramer. 2007. The Effect of Homologous Prostatic Fluid on Motility and Morphology of Dog Epididymal Spermatozoa Extended and Frozen in Biladyl with Equex STM Paste or Andromed. *Theriogenology;* **67:** 264- 275.

Papadopoulos. S., J. P. Hanrahan, A. Donovan, P. Duffy, M. P. Boland and P. Lonergan. 2005. In Vitro Fertilization as A predictor of Fertility from Cervical Insemination in Sheep. *Theriogenology*; **63**:150– 159.

Paulenz. H., S.Lennart., A.Tormod., H. F Ove., and A. B. Kjell. 2003. Effect of Milk- and TRIS- Based Extenders on the Fertility of Sheep Inseminated Vaginally Once or Twice with Liquid Semen. *Theriogenology*; **60**: 759-766.

Pickett, B.W.1993.Collection and Evaluation of Stallion Semen For Artificial Insemination. *Equin Reproduction, Philadelphia: Lea & Febriger; 689- 704*

Pontbriand, D., J. G. Howard, M. C. Maximum, L. D. Stuart, and D. E. Wildt. 1989. Effect of Cryoprotective Diluent and Method of Freeze-Thawing on Survival and Acrosomal Integrity of Ram Spermatozoa. *Cryobiology;* **26**: 341– 54.

Rodriguez- Martinez, H. 2003. Laboratory Semen Assessment and Prediction of Fertility: Still Utopia?, *Reprod Dom Anim*; **38**: 312– 318.

Sadhan. B., J. Anil., S. M. K. Naqvi., and J. P. Mittal. 2004. Effect of Post-Thaw Incubation on Sperm Kinematics and Acrosomal Integrity of Ram Spermatozoa Cryopreserved in Medium- Sized French Straws. *Theriogenology;* **62:** 415– 424.

Salamon, S., And W. M. C. Maxwell. 1995. Frozen Storage of Ram Semen. I. Processing, Freezing, Thawing and Fertility after Cervical Insemination. *Anim. Repord. Sci;* **37**: 185- 249.

Salamon, S. And W. M. C. Maxwell. 2000. Storage of Ram Semen. *Anim Reprod Sci;* **62**: 77– 111.

Salhab, S. A. 1987. Microenrinonmentel Factors Offecting Survivul of Bovine Spermatozoa. Ph. P. Thesis. Univercity of Minnesoto. USA.

Salhab, S. A. and C. P. Merilan. 1987. Evaluation of Frozen Bovine Semen Collected in Polyethelene and Rubber Liners: Collection Cones. & *2 nd ADSA ,Columbia- Missouri. P. 209* (Abst .P .316).

Salizbury, G. W., N. L. Van Demark and J. R. Lodgs. 1978. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. W. H. Freeman and Co. *San Francisco*- (U. S. A.).

Shrestha, J. N. B. 2005. Conserving Domestic Dnimal Diversity among Composite Populations. Small Rumin. *Res;* **56**: 3– 20.

Sinha, S. N., B. C. Deka, B. N. Borgohain, and M. K. Tamuli. 1992. Study of Freezing of Goat Semen in Skim Milk Extender with Different Glycerol Levels and Equilibration Periods. Ind. *J. Anim. Repord;* **13***:* 38. (A. B. A., vol. 16, No. 282).

Söderquist L., N. Lundeheim., B. Nilsson. 1999. Assessment of Fertility after using Different Procedures to Thaw Ram Spermatozoa Frozen in Mini- Straws. *Repord Dom Amin*; **34**: 16- 6.

Tekin, N. 1982. Insemination of Sheep with Frozen Semen: Effect of Different Diluents on Motility, Acrosome Integrity and Sephadex-Filtration of Spermatozoa Processed in Mini- Straws. *PhD Thesis, Tierarztliche Hochschule Hannover*.

Thibier, M., B. Guerin. 2000. Hhgienic Aspects of Storage and Use of Semen for Artificial Insemination. *Anim Reprod Sci*; **62**: 51- 233.

Tuli, R. K., R. Schmidt- Baullain, and W. Holtez. 1991. Influence of Thawing Temperature on Viability and Release of Glutamic Oxaloacetic Transaminase in Frozen Semen from Boer Goats. *Anim. Repord. Sci;* **25***:* 125.

Vera- Munoz. O., L. Amirat- Briand., T. Diaz., L. Vasquez., E. Schmidt., S. Desherces., M. Anton., D. Bencharif., and D. Ainturier. 2009. Effect of Semen Dilution to Low-Sperm Number Per Dose on Motility and Functionality of Cryopreserved Bovine Spermatozoa Using Low- Density Lipoproteins (LDL) Extender: Comparison to Triladys1 and Bioxcell. *Theriogenolog;* **71**: 895- 900.

Voos, J. L., R.A.Wallace, E. L. Squires, B.W. Picket, and R.K. Shideler. 1979. Effect of Synchronisation and Frequency of Nsemination on Fertility.

Waston, P.F.1995. Recent Development and Concepts in the Cryopreservation of Spermatozoa and Assessment of Their Post-Thawing Function. Repord. *Fertil. De;* **7***:* 91- 871.

Waston, P.F., and I. C. A. Martin. 1974. Regions of the Freezing Curve Causing Changes in Structure and Viability of Ram Sperm. *Nature;* 251: 315.

Waston. P.F., and I. C. A. Martin. 1975. Effects of Egg Yolk, Glycerol and the Freezing Rate on the Viability and Acrosomal Structures of Frozen Ram Spermatozoa. *J. Biol .Sci.,* **28***:* 153.

Yániz, J., J. I. Martí, M. A. Silvestre, J. Folch, P. Santolaria, J. L. Alabart and F. López- Gatius. 2005. Effects of Solid Storage of Sheep Spermatozoa at 15 °C on Their Survival and Penetrating Capacity. *Theriogenology*; **64**: 1844- 1851.

Yoshida, M. 2000. Conservation of Sperms: Current Status and New Trends. *Anim Reprod. Sci*; **60– 61**: 349– 355.

Yutaka. F., K. Hirohide., T.Tetsuro., H. Mami and O. Kentaro. 2008. Fertility after Insemination using Asoybean- Based Semen Extender in Sheep. *J . Reproduction and Development.* **54**(4): 286- 289.

Zhu,Y., J. Zhang, Y. Chang, Z. Cai, N. Cua, G. Shao, S. Jiao, S. Liu, Z. Cai, L. Zhang, Y. Nu and E. Xioa. 1982. Studies on the Improvement of Quality and Fertility of Frozen Ram Semen. *Acta Vet. Zootech. Sin*. **13**(1): 912- 920.

Efficiency of Local Diluents in Short and Long-Term Preservation of Semen and Fertilizability in Awassi Sheep.

Abstract

This Study was Carried out at the Laboratory of Artificial Insemination and Embryo Transfer in Ezra Station belongs to ACSAD during 2008-2009 in order to estimate the efficiency of local diluents (Sodium Citrate with Egg Yolk, EYC and Skimmed Milk, SM) and Andromed As a standard diluent in short and Llong- term preservation of semen and fertilizabiliy in Awassi rams. Four Rams, two years old with live body weight 75±3 KG, were used. Semen was collected by artificial insemenatiom twice a week for 4 months during the breeding season. Progressive motility and live –dead ssperms were evaluated at each step of semen handling (post collection, after dilution, before freezing and after thawing) and the fertizability of post thawed spermatozoa was also estimated against heat incubation time at 45.5-47.5 c each 15 minutes for 1.5 hours.

Results showed that there wass no significant differences in the rate of viability (progressive motility) and dead sperms after semen collecting between the four rams. While there was a significant effect ($p< 0.001$) for the diluents on studied taits after 2.5-3 hours of collection, before freezing and post thawing. Highest rate of viability,71.7% was showen in semen diluted with Andromed compared with 64.8% in EYC and 58.5% in SM. Simultaniously, the rates of dead sperms were 23.9, 33.4, 39.8% in the stanard, EYC and in SM , respectively. Result also revealed that the sperm viability and dead sperm rate of post- thawed spermatozoa were 53.3, 42.0, 18.3% and 41.9, 56.5, 78.9% in the control, EYC and SM, respectively. Also The Fertilizability of sperms

was affected ($p < 0.001$) by ram, incubation time and diluente as well as with their partial interactions. The standard diluent was the best to support resistance of sperms against temperature stress. However, viability decreased to zero after 90, ٩٠ and ٧٥ minutes of incubation. in Andromed, EYC and SM, respectively. It was conclded that SM and EYC can be used as local diluents for extending awassi semen in artificial insemination program as frish and frozen extended semen, respectively and it was uggested that heat stress can be used as a laboratory test for selecting rams according to their fertilzabilty.

Key words: Semen viability, Diluents, freezing of semen, fertilizability, Awassi sheep.

Damascus University

Faculty of Agriculture

Department of Animal Production

Efficiency of Local Diluents in Short and Long-Term Preservation of Semen and Fertilizability in Awassi Sheep

Thesis is Submitted for the Master Degree in Animal Production

Prepared by

Agronomist

Rami Hussin Khlouf

Supervised by

Prof. Dr.

Solieman Salhab

Prof. Dr.

M. Rabih Al-Merestani

2010