

## اختبار نوعين من المخففات والمواد الحافظة في الحفظ الطويل الامد لحيامن اسماك الشبوط

كامل فياض المحمدي<sup>1</sup> سحر احمد البياتي<sup>2</sup> وفاء ابرام لطيف<sup>1</sup> عمر عادل محمد<sup>1</sup> احمد وهبي شاكر<sup>3</sup> شذى عبد الجبار مهدي<sup>2</sup>  
 باحث باحث باحث باحث باحث باحث

<sup>1</sup> قسم التلقيح الاصطناعي و <sup>2</sup> قسم المصادر الوراثية الحيوانية و <sup>3</sup> قسم الاسماك في دائرة الثروة الحيوانية / وزارة الزراعة .

[Sahar.albayatti@gmail.com](mailto:Sahar.albayatti@gmail.com)

المستخلص

اجريت الدراسة لاختبار مدى قابلية حيامن أسماك الشبوط (*Arabibarbus grypus*) للحفظ طويل الامد بالتجميد الفائق بالنايتروجين السائل (-196 °م) بأستعمال نوعين من المخففات والمواد الحافظة ضد التجميد للمقارنة واختيار الأفضل. تم استخدام السائل المنوي لأسماك بالغة مصادرة من بحيرات الرضوانية الاصطناعية أثناء موسم التكاثر الربيعي لعام 2015 وتم سحب السائل المنوي بطريقة المساج دون استخدام مهدئات او هرمونات ، واختبرت قابلية الحيامن للحفظ بالتجميد الفائق بأستخدام نوعين من المحاليل المخففة ونوعين من المواد الحافظة ضد التجميد وهما محلول Zhang and Liu المحور ومحلول Hank's Balanced Salt الخالي من عنصر الكالسيوم واستخدم الميثانول كمادة حافظة بنسبة 10% مع المحلول الاول والكليسيروول بنفس النسبة مع الثاني. تم اعتماد النسب المئوية للحركة قبل وبعد التجميد والاذابة كمعيار للنشاط والبقاء. تراوح حجم السائل المنوي ما بين 1-9 مل وبمعدل 4.6 مل. النسب المئوية لحركة الحيامن اظهرت تفوق محلول Zhang and Liu الحاوي على الميثانول (قبل التجميد) على محلول Hank's فقد تراوحت النسب المئوية للحركة بين 80-95% وبمعدل 87.5%، بينما تراوحت نتائج نسب الحركة لمحلول Hank's 50-95% وبمعدل 69%، لكن بعد التجميد والاذابة حصلت خسارة اكبر في حركة الحيامن بأستخدام محلول Zhang and Liu الحاوي على الميثانول وبنسبة 57.5% عن تلك الخسارة لمحلول Hank's الحاوي على الكليسيروول والتي كانت بنسبة 40% إذ بلغ المعدل العام لحركة الحيامن بعد التجميد والاذابة بهذا المحلول 50% بينما كان المعدل العام لمحلول Zhang and Liu الحاوي على الميثانول 30% فقط. نستنتج مما سبق إمكانية حفظ حيامن اسماك الشبوط حفظ طويل الامد بالنايتروجين السائل وافضلية محلول Hank's الحاوي على الكليسيروول بنسبة 10% كمادة حافظة على محلول Zhang and Liu والذي يمكن استخدامه في الحفظ قصير الامد بالتبريد.

كلمات مفتاحية: السائل المنوي، بحيرات الرضوانية، النشاط والبقاء

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences –1677-1683: (6) 48/ 2017

Al-Mohammed & et al.

TESTING TWO EXTENDERS AND CRYOPROTECTANTS FOR LONG-TERM PRESERVATION OF SHABOUT FISH' SPERMS

K. F. Al-Mohammed<sup>1</sup> S. A. Al-Bayatti<sup>2</sup> W. Y. Lataf<sup>1</sup> O. A. Mohammed<sup>1</sup> A. W. Shaker<sup>3</sup> S. A. Mahdi<sup>2</sup>  
 Researcher Researcher Researcher Researcher Researcher Researcher

<sup>1</sup>Artificial Insemination Department, <sup>2</sup> Animal Genetic Sources Department and <sup>3</sup> Fish

Department \ Animal Resources Directorate \ Ministry of Agriculture.

[sahar.albayatti@gmail.com](mailto:sahar.albayatti@gmail.com)

ABSTRACT

The current study was conducted to test Shabout's (*Arabibarbus grypus*) sperms ability for long-term cryopreservation under liquid nitrogen (-196°C) using two different extenders and two different cryoprotectants to compare and chose the best. The semen of mature fishes collected from Al-Radwania man-made lakes during 2015 spring spawning season were used in this study. The semen was collected by manual abdominal stripping without using any hormones or anesthetizes and its sperms were tested for surviving and activity throw cryopreserving process in liquid Nitrogen using two different extenders (Zhang & Liu vs. Calcium-free Hank's Balanced Salt Solution) with methanol in 10% as cryoprotectant for the first extender and glycerol in the same percent with the second and considering the motility rate as indicator for survival and activity during prefreezing and post thawing processes. The obtained quantities of semen ranged between 1-9 ml with mean volumes of 4.6 ml. Sperm motility rate using Zhang & Liu with 10% methanol was better in prefreezing diluents over Hank's, its motility rates ranged between 80-95% with mean 87.5%, while Hank's sperms motility results ranged between 50-95% with mean 69%. This situation was inverted after freezing and thawing, because Zhang and Liu solution lost 57.5% of its sperms motility while Hank's with glycerol lost only 40%, thus Hank's sperms motility mean reached 50% while Zhang and Liu was 30%. From these results we can infer that Shabout's sperms has the ability to be cryopreserved in liquid Nitrogen and c-f Hank's solution with 10% glycerol as cryoprotectant better than Zhang and Liu with methanol for long-term cryopreservation though, we can use Zhang and Liu solution also for short-term Shabout's sperms cool preservation.

Keyword: semen, man-made lakes, surviving and activity

\*Received:12/4/2017, Accepted:11/12/2017

## المقدمة

يعد الشبوط (*Arabibarbus grypus*) احد اهم انواع اسماك المياة العذبة العراقية، وقد احتلت سابقاً وللفترة مابين 1967-1970 المرتبة الثالثة من مجموع الاسهام في الدخل الوطني حين كانت المبيعات منها حوالي 519 طن سنوياً (6)، لكن في الوقت الحاضر، اصبحت اعدادها قليلة ومساهمتها في سد حاجة السوق المحلية من لحوم الاسماك الطازجة لاتكاد تذكر فقد تم الاستعاضة عنها بأسمك الكارب الشائع (*Cyprinus carpio*). ورغم نجاح تنمية وتكاثر اسماك الكارب الشائع في العراق وتلبيتها لحاجة السوق المحلية الا ان الـ *Al-Flujy* وآخرون (4) لاحظوا حصول تدهور في صفاتها الوراثية في الفترة الاخيرة مما يندرز بأنهايار الانتاج اذا لم يتم تدارك الامر بتحسين صفاتة الوراثية او استبدالها بأنواع اخرى حيث ادخل هذا النوع من الأسماك الى العراق منذ سبعينيات القرن الماضي. وقد يكون الحل لهذه المشكلة بالرجوع الى الاسماك المحلية المعروفة والمربوعة لدى المستهلكين ومحاولة تحسين صفاتها الانتاجية وتعزيز تكاثرها، ولعل من اهم طرائق تنمية وتكاثر الاسماك هو حفظ حيامنها بالتجميد الفائق واستعمالها فيما بعد بالتكاثر الاصطناعي، فالحيامن المجمده بهذه الطريفة ممكن (نظرياً) ان تبقى محافظه على حيويها لما يقارب من 200-32000 سنه من غير تغيير، (10). لقد تم أبتكار وتطوير طرائق عديدة لحفظ حيامن أنواع مختلفة من أسماك المياة العذبة والمالحة وفي العديد من دول العالم وقد تم تلخيصها وجمعها في كتاب "Cryopreservation in Aquatic Species" (12 و 14)، لكن محلياً فأن البحوث التي أختصت بدراسة صفات السائل المنوي للأسماك المحلية وامكانية حفظ حيامنها قليلة وأغلبها ركزت على أمكانية الحفظ القصير الامد بالتبريد ولم تتطرق الى الحفظ طويل الامد بالتجميد بالنايتروجين السائل (- 196 °م). ففي دراسة *Dahham* وآخرون (7) لسبعة انواع من الاسماك المحلية (الشبوط *Arabibarbus grypus* والبني *Mesopotamichthys sharpeyi* والجري الاسوي *Silurus triostegus* والخشني *liza ab* والشلق *Aspius vorax* والقطان *Luciobarbus xanthopterus* والسمة الذهبية *Carassius aurta*) ركز فيها الباحثون على صفات السائل المنوي لتلك الاسماك

وعلى تركيز الحيامن والحيوية والحركة والأس الهايديروجيني وغيرها ولم تبحث الدراسة قابلية الحيامن للحفظ القصير او الطويل الامد وكذلك الحال بالنسبة لدراسة الـ *Al-Aaraji* و *Saleh* (2) للعوامل المؤثرة في صفات السائل المنوي لأسماك الكارب الشائع كالعمر والوزن والحرارة وتأثيرها في حجم وحيوية السائل المنوي، لكن من الدراسات القليلة التي بحثت سبل حفظ حيامن الاسماك، دراسة *Al-Biaty* وآخرون (3) الذين درسوا تأثير بعض المخففات في حفظ حيامن ثلاثة انواع من اسماك الكارب مستخدمين حركة الحيامن كمؤشر لبقاء الحيامن حية خلال حفظها بالتبريد بدرجة 5° م. و *Al-Mukhtar* وآخرون (5) الذين درسوا صفات السائل المنوي لأسماك البني *Mesopotamichthys sharpeyi* وأمكانية حفظة بالتبريد. أما دراستنا هذه فتبحث في قابلية حفظ حيامن اسماك الشبوط حفظ طويل الامد بالتجميد بدرجة النايتروجين السائل (-196°م).

## الهدف من الدراسة

اختبار مدى قابلية حيامن الشبوط للحفظ طويل الامد بالتجميد بالنايتروجين السائل - 196° م بأستعمال نوعين من المخففات والمواد الحافظة للمقارنة واختيار الافضل.

## المواد وطرائق العمل

صيدت اسماك الشبوط (*Arabibarbus grypus*) من بحيرات الرضوانية الاصطناعية "غرب بغداد" عشوائياً بواسطة الشباك الخيشومية أثناء موسم التكاثر الربيعي للأسماك العراقية لعام 2015. تم قياس اطوالها والاسماك التي بطول 45 سم فأكثر تم استخدامها لسحب السائل المنوي، حيث تم اعتبار طولها مؤشر للبلوغ الجنسي حسب ما أشار الية *Coad* (6). تم سحب السائل المنوي من الاسماك بطريفة المساج والضغط الخفيف على المنطقة البطنية اعلى قليلاً من الفتحه التناسليه ومن دون استخدام هرمونات او مهدئات، وضع بعدها في انابيب مدرجة ومعقمة. فحصت النماذج المسحوبة فحص اولي (الرائحة واللون أذ تم استبعاد العينات التي تحتوي على الملوثات مثل الدم)، كما تم تسجيل كمياتها ومن ثم نقلها الى المختبر بصناديق فلين حاويه على ثلج مجروش للحفاظ عليها بدرجة 4° م لحين وصولها الى المختبر. تم أستخدام سائل منوي لتسعة ذكور تراوحت اطوالها مابين 52-77 سم واوزانها مابين 1,5-5 كغم وأعمارها

بأستعمال عداد ثواني ونقطة انطلاق العد بدأت عندما اصبح 75% من الحيامن متحركه وتم التوقف عن العد عندما أصبح 75% من الحيامن متوقفة عن الحركة (12).

#### تجميد السائل المنوي

1- تم اختيار الميثانول كماده حافظه ضد التجميد لأضافتها بنسبة 10% للمحلول الاول (Zhang and Liu) و الكليسيروول كماده حافظه ضد التجميد لأضافتها للمحلول الثاني (Hank's) بنفس النسبة ، أذ تم أكمل التخفيف النهائي للسائل المنوي وليكون بنسبتي جزء واحد من السائل المنوي من عشرة اجزاء من المحلول الحاوي على المادة الحافظة ضد اضرار التجميد (10:1) وجزء واحد من السائل المنوي من عشرين جزء من المحلول الحاوي على المادة الحافظة ضد اضرار التجميد (1:20).

2- طريقة التجميد كانت كالتالي:- فترة التعادل بدرجة 4°م لمدة 30 دقيقة تم بعدها تعبأة العينات في قصبات التجميد الفرنسية الصنع (شركة IMV) حجم 0,25ml رصت بعدها القصبات على حاملات خاصة وتركت لفترة بخار النايتروجين (-80°م) على ارتفاع 3 سم عن سطح النايتروجين السائل عشرون دقيقة بعدها غمرت في النايتروجين السائل (13) .

3- تمت اسالة القصبية المجمدة بماء درجة حرارته 37°م لمدة 8 ثواني بعدها تم تشيف القصبية وقص طرفيها و تم اهمال القطرة الاولى والقطرة الثانية استعملت لفحص الحركة (13).

#### النتائج والمناقشة

خلال نصف القرن الماضي تم إجراء العديد من الابحاث لتطوير بروتوكولات حفظ حيامن انواع عديدة من الاسماك والبعض توصل الى نتائج ممتازة، وقد قام كل من Tiersch و Mazik بجمعها في كتاب (12) لتسهيل دراستها وتطبيقها، غير ان العقبة الرئيسية في التطبيق المباشر هي ان البروتوكول الجيد لنوع من الاسماك قد لا يكون جيد لنوع آخر أو حتى لنفس النوع الذي يعيش في بيئة مختلفة، حيث ان هناك حاجة دائمة الى دراسات تقييم البروتوكولات واعادة معايرتها لجعلها تناسب الاسماك المحلية، والافضل لأنواع التي لم يتم معرفة محلول تخفيف مناسب لحفظ سائلها المنوي ان يتم تجربة اكثر من محلول لها لأختيار الانسب، (14). من هذا المنطلق فقد تم اختيار نوعين من محاليل التخفيف

ما بين 3-6 سنة، اربعة اختبرت بمحلول Zhang and Liu وخمسة بمحلول Hank's و بنسبة تخفيف 1:1 (كتخفيف اولي) وبشكل مباشر بعد الجمع لتلافي تأثير اي اختلاط للسائل المنوي بالبول الذي يؤدي ( أن حدث ) الى فقدان حيوية الحيامن في السائل المنوي، (11). وقد تم اختيار هذين المحلولين لأختبار مدى قابليتهما على الحفاظ على حيوية حيامن اسماك الشبوط العراقية بعد التجميد بالنايتروجين السائل للأسباب المبينة ازاء كل منهما:

1- المحلول المحور ل Zhang and Liu (15) لكونه مستعمل على نطاق واسع في تجميد حيامن اسماك الكارب بنجاح

2- محلول Hank's Balanced Salt Solution الخالي من عنصر الكالسيوم والذي نصح به Tiersch في كتابه (Cryopreservation in Aquatic Species) والمستعمل بنجاح في حفظ حيامن اكثر من 100 نوعاً من اسماك المياه العذبة، (14) . والجدول 1 يبين المواد الداخلة في تركيب المحلولين المستعملين في الدراسة وكمياتها.

#### جدول 1. المواد الداخلة في تركيب المحلولين

محلول-1- (Zhang and Liu, 1991)	
الوزن او الكمية	المادة
20 غم	Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )
1,5 غم	Sodium Chloride (NaCl)
0,25 غم	Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )
500 مل	Distilled water
محلول-2- (Hank's balanced salt solution)	
الوزن او الكمية	المادة
5 غم	Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )
4 غم	Sodium Chloride (NaCl)
0,18 غم	Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )
	KCl
0,2 غم	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O
0,1 غم	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,004 غم	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,03 غم	Distilled water

#### التقدير النوعي لحيوية الحيامن

باستخدام فحص حركة الحيامن (المدة + النسبة): تم تفعيل الحيامن لفحص الحركة بأستعمال 2 مايكروليتر من السائل المنوي + 50 مايكروليتر من ماء بحيرة الرضوانية. الفحص تم بقوة تكبير X 100 وتم اعطاء النسبة المئوية للحركة التقديرات التاليه { 0= بدون حركة اي الكل ميت، 1= 10%-20 % متحرك ، 2= 30%-40 % متحرك، 3= 50%-60 % متحرك ، 4= 70% - 100% متحرك} والنوعيه الجيده والتي بدرجة 4 او 70% فاكثر استخدمت للتجميد والتي اقل أهملت، اما مدة الحركة فقد تم قياسها

تركيز الحيامن او اي من الدراسات الأخرى المتعلقة بها لكون الحيامن غير المخففة تفقد حيويتها بسرعة وتخفيف الحيامن بالنسب المثالية يحافظ عليها لأطول مدة ممكنة، لاسيما بالنسبة للحيامن التي يتم الحصول عليها بطريقة المساج والمعرضة للتلوث بالبول الذي يؤدي الى اطلاق حركة الحيامن وبالتالي تقليل مدة خزنها، فالبول في اسماك المياة العذبة يمتاز بكونه اقل ضغط hypotonic بالنسبة لأنسجة وسوائل الجسم وأختلاطة مع السائل المنوي يقلل الضغط الازوموزي فيه و يطلق حركة الحيامن وبالتالي سوف يستنزف طاقتها ويقلل عمرها، لذا تخفيف السائل المنوي بعد الجمع مباشرة بالكمية والمخفف المناسبين يعكس تأثيره ويعيد الضغط الازوموزي الى وضعه الطبيعي. أغلب المختصين يفضلون تخفيف السائل المنوي بنسبة 1-4 غير ان تخفيف بنسب 1 - 50 استعمل بنجاح في الاسماك والمحار واللبائن (9)، كما نلاحظ من الشكل 1 تفوق محلول Zhang and Liu على Hank's في نسب الحركة بعد التخفيف وقد يعود السبب في ذلك الى التركيز العالي لسكر الكلوكوز والذي تميز به عن محلول Hank's والذي بدوره يمتاز عن الاول بأحتواءه على مواد تمتلك خاصية الدارئ (Buffer) لتخفيف على ضغط اوزموزي و أس هيدروجيني (pH) متوازنين وليحافظ على الحيامن مدة اطول (جدول 1).

**ثالثاً : نتائج قياس حركة الحيامن بدلالة حركتها بعد التجميد الفائق ( -196°) والاذابة :** يظهر الجدول 2 يظهر حصول فقد في حيوية الحيامن بعد التجميد لمدة 48 ساعة ولكل المكررات التي أستخدم بها المحلول الاول ( Zhana and Liu) وينسب مختلفة وهذه الخسارة في الحيوية تم حسابها بشكل ادق في الجدول رقم 4 . كما نلاحظ من جدول 2 ان النسبة التي تم الحصول عليها بعد 48 ساعة من التجميد استمرت للأسابيع الاربعة التي تلتها مما يدل على تخطيها عقبة التجميد الفائق وامكانية بقاء حيوية الحيامن بهذه النسبة لمدة غير محدودة. بالنسبة للمحلول الثاني (Hank's) فنلاحظ من الجدول 3 حصول خسارة في حيوية الحيامن ايضا وهذه الخسارة محسوبة بشكل ادق في الجدول رقم (5) ، كما نلاحظ ايضا من جدول (3) بقاء حيوية الحيامن ثابتة على النسب التي كانت عليها بعد التجميد بـ 48 ساعة. وبمقارنة المعدل العام للخسارة في الحيوية بين

والحفظ الاكثر انتشارا وهما محلولي Zhang and Liu و Hank's ونوعين من المواد الحافظة ضد التجميد وهما الميثانول والكليسيرون ، ليتم تجربتها على حيامن اسماك الشبوط وقد اظهرت النتائج الاتي:-

**اولاً: حجم السائل المنوي :** حجم السائل المنوي المستحصل بطريقة المساج الطبيعية بدون استخدام هرمونات او مهندئات تراوح ما بين 1-9 مل وبمعدل 4.6 مل ، ولونة كان ابيض حليبي . لم يتم العثور على دراسات مشابهة على اسماك الشبوط الاعتيادي في العراق لمقارنة حجم السائل المنوي ، لكن Al-Mukhtar واخرون (5) حصلوا على احجام اقل للسائل المنوي المسحوب من اسماك البني رغم استعمالهم للهرمونات حيث حصلوا على احجام تراوحت بين 0.4-1 مل وعزوا ذلك الى قصر الفترة الزمنية الفاصلة بين اعطاء الهرمون وعملية سحب السائل المنوي . أما في دراسة على اسماك الكارب المرآتي ( mirror carp) المعامل بهرمونات الغدة النخامية أيضا وتحت تأثير المهدئ فقد حصل Akcay واخرون (1) على احجام تراوحت ما بين 1-40 مل وبمعدل 13.26 مل وبغض النظر عن كون اسماك الشبوط غير متأقلمة للتكثير الاصطناعي مثل اسماك الكارب الشائع التي تم اقلتها وتطويعها منذ عقود عديدة ، فلو استعملنا هرمونات ومهندئات ربما أمكن الحصول على نسبة اعلى من السائل المنوي من اسماك الشبوط، حيث لازال هناك حاجة الى المزيد من الدراسات بهذا المجال.

**ثانياً: نتائج حركة الحيامن بعد التخفيف:** الجدولين 2 و3 يظهران نتائج حركة الحيامن بعد التخفيف بنسبتي 10:1 (جزء واحد من السائل المنوي الى عشرة اجزاء من المخفف) و 1:20 (جزء واحد من السائل المنوي الى عشرين جزء من المخفف). أذ بلغت نتائج النسب المنويه للحركة للتخفيف بنسبة 10:1 بالمحلول رقم 1 (85%، 95%، 80%) وبمعدل 86,6% بينما كانت نسبة الحركة للتخفيف (1:20) 90% وهذا يعطى انطباع اولي عن ان التخفيف الاعلى يعطي نسبة حركة للحيامن اكبر، وهذا ينطبق على المحلول رقم 2 الذي اعطى نسبة 85% للتخفيف 1:20 بينما كانت النسبة لمعدل الحركة 65% للتخفيف 10:1 الاكثر تركيزاً. وقد اوصى Jenkins واخرون (8) بأجراء دراسات التخفيف المثالية لحيامن اي نوع من الاسماك قبل المباشرة بدراسة

المحلولين الأول والثاني نجد ان المحلول الثاني (Hank's) تفوق على المحلول الأول (Zhang) في احتفاظه بنسبة حيوية اعلى بعد التجميد والأذابة، فقد كان المعدل العام للخسارة في الحيوية 40%، بينما في المحلول الأول (Zhang) بلغت 57.5%، وقد يكون السبب في هذا اما لأمتلاكه خاصية الدائري بسبب المواد الداخلة في تركيبه والتي تبقى متوازن مدة اطول او يكون السبب في المادة الحافظة ضد التجميد (الكليسيرول) الذي استخدمت فيه والتي قد تكون افضل من الميثانول الذي استخدم كمادة حافظة ضد التجميد في المحلول الأول. عموماً أثناء عملية التجميد تتعرض الحيامن الى الاضرار نتيجة انخفاض درجة الحرارة (صدمة البرودة) ولأسباب مختلفة، فقد يحدث الضرر من تغير درجة الحموضة (pH) او من بلورات الجليد المتكونة داخل الحيمن والتي قد تسبب ضرر في بنية وتركيب الحيمن، او قد يحصل بفعل التجميد زيادة تركيز السوائل خارج الحيمن والذي يؤدي الى جفاف الحيمن لنضوح السوائل خارجة بفعل عملية الارتشاح، والوسيلة للخلاص من هذه التأثيرات هو استخدام مادة حافظة ضد التجميد (cryoprotectant) مناسبة وطريقة تجميد جيدة، والمادة الحافظة ضد التجميد تقلل من الضرر الناتج عن التجميد برفعها للضغط الاوزموزي داخل الحيمن وبذلك تمنع الضرر الذي قد ينشأ عن فقدان السوائل والجفاف، ولسوء الحظ اغلب المواد الحافظة ضد التجميد سامة للحيامن، لذا اختيار النوع والتركيز المناسبين حاسم لنجاح عملية التجميد والحفظ. لذا جرت العديد من الدراسات وعلى حيامن انواع مختلفة من الاسماك لأختيار التركيز والمادة الحافظة المناسبة ومنها دراسة Tiersch وآخرون (13) على حيامن سمكة Colorado Pikeminnow (*Ptychocheilus incius*) والتي اختبر فيها تأثير عدة مواد حافظة ضد التجميد وهي الكليسيرول والميثانول والـ Dimethyl sulfoxide (DMSO) والـ Dimethyl

acetamide (DMA) على حركة الحيامن قبل وبعد التجميد وبتركيزين (5 و 10 %) والتي تم اضافتها الى محلول Hank's وعملية التجميد جرت وفق برنامجين سريع (-40°/ دقيقة) وبطيء (-4°/ دقيقة). اظهرت نتائج تفوق الميثانول بتركيزي 5% و 10% على بقية المواد وذلك بأبقائه على نسبة حركة حيامن اكبر قبل التجميد بينما كانت نتيجة الكليسيرول 10 % الافضل من بين الجميع في نسبة الحركة وحيوية الحيامن بعد التجميد والأذابة وبطريقة التجميد السريع (-40°/ دقيقة) وليس بطريقة التجميد البطيء التي كانت نتائجها على العموم غير جيدة وفي كل المحاليل . وفي دراسة مشابهة استخدم فيها Akcay وجماعته (1) ثلاث مخفضات مختلفة وثلاث مواد حافظة مختلفة وهي ( glycerol, DMA, DMSO) بتركيز 15% للجميع، اظهرت نتائجها ايضا افضلية الكليسيرول على الجميع في نسبة حركة الحيامن بعد التجميد والأذابة، وبغض النظر عن نوع المخفف المستخدم. نستنتج أن محلول Hank's الحاوي على الكليسيرول كمادة حافظة ضد التجميد بنسبة 10% كان افضل من محلول Zhang الحاوي على الميثانول بتركيز 10% في اختبار التجميد الفائق وقد تم الحصول على نسبة حركة للحيامن بلغت 60 % بوساطته وهي نسبة تعد ممتازة في عمليات التلقيح والأخصاب، كما ان محلول Zhang and Liu الحاوي على الميثانول كمادة حافظة جيد ايضا وقد تم الحصول على نسبة حركة حيامن بعد التجميد والأذابة بلغت 50 % لكن ليس بدرجة Hank's. لذا نوصي باستخدام محلول Zhang and Liu (بدون الميثانول) في الحفظ قصير الأمد للحيامن بالتبريد واستخدام محلول Hank's الحاوي على الكليسيرول بنسبة 10% كمادة حافظة ضد التجميد في عمليات الحفظ طويل الامد وبالتجميد الفائق لحيامن اسماك الشبوط.

جدول 2. نتائج حيوية الحيامن بعد التجميد والأذابة بمحلول رقم 1 (Modified Zhang and Liu, 1991) المضاف اليه

الميثانول كماده حافظه ضد التجميد بنسبة 10%

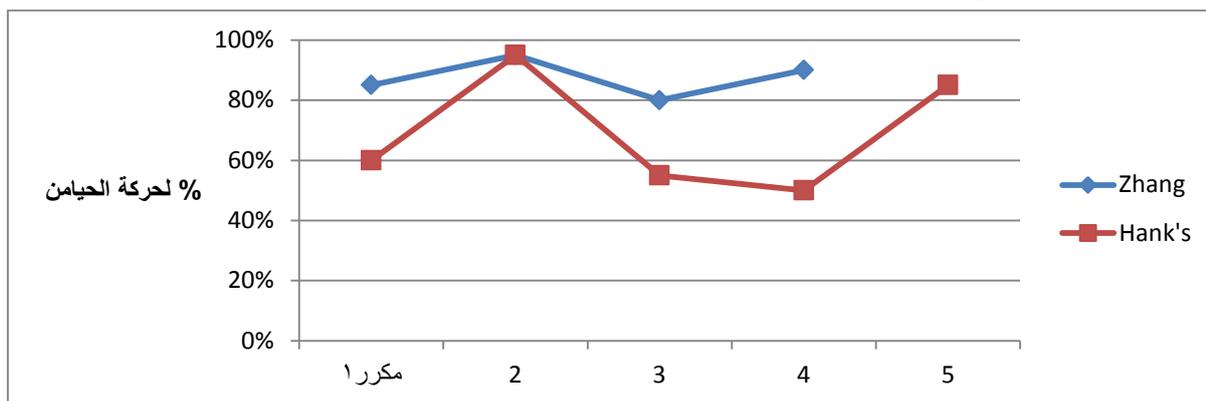
الاسبوع الرابع من التجميد	الاسبوع الثالث من التجميد	الاسبوع الثاني من التجميد	الحركة بعد الاسبوع الأول من التجميد	الحركة بعد التجميد والأذابة بـ 48 ساعة	الحركة الفردية بعد التخفيف (النسبة + الدرجة)	نسبة التخفيف
5%	5%	5%	5%	5%	4 = 85%	10:1
50%	50%	50%	50%	50%	4 = 95%	10:1
10%	10%	10%	25%	25%	4 = 80%	10:1
40%	40%	40%	40%	40%	4 = 90%	20:1

جدول 3. نتائج حيوية الحيامن بعد التجميد والأذابة بمحلول رقم 2 (Ca<sup>2+</sup> free Hank's Balanced Salt Solution)

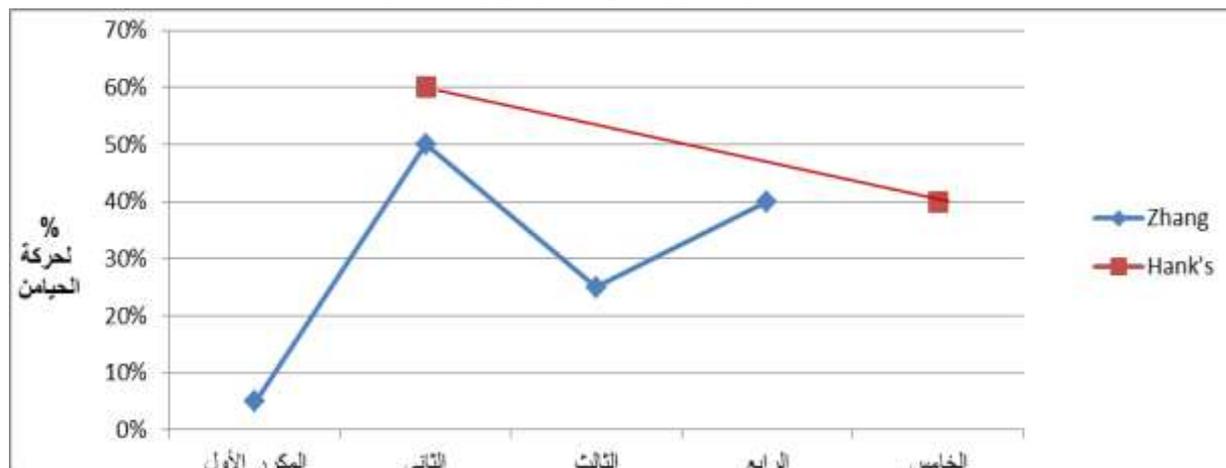
المضاف اليه الكليسيروول كماده حافظه ضد التجميد بنسبة 10%.

الربع	الثالث	الاسبوع الثاني من التجميد	الحركة بعد الاسبوع الاول من التجميد	الحركة بعد التجميد والأذابة ب 48 ساعة	الحركة الفردية بعد التخفيف (النسبة + الدرجة)	نسبة التخفيف
-	-	-	-	-	□3 = %60	10:1
%60	%60	%60	%60	%60	4 = %95	10:1
-	-	-	-	-	□3 = %55	10:1
-	-	-	-	-	□3 = %50	10:1
%40	%40	%40	%40	%40	4 = %85	20:1

□ املت لكون الدرجة اقل من 4.



شكل 1. النسب المئوية لحركة الحيامن بعد التخفيف



شكل 2. النسب المئوية لحركة الحيامن بعد التجميد والأذابة.

## جدول 4. يوضح قيم خساره في حيويه الحيامن (بدلالة حركتها) بعد التجميد الفائق والأذابة باستخدام محلول Zhang and Liu

نسبة التخفيف	الحركة الفردية بعد التخفيف	الحركة بعد التجميد والأذابة بدرجة 37°م لمدة 8 ثواني	الخساره في الحيوية الحركة بعد التخفيف - الحركة بعد التجميد = نسبة الحيامن المفقوده
10:1	%85	%5	80 = 5- 85
10:1	%95	%50	45 = 50- 95
10:1	%80	%25	55 = 25- 80
20:1	90%	%40	50 = 40- 90
مجموع نسب الخساره = 230 % ومعدلها 57.5%			

## جدول 5. يوضح قيم خساره في حيويه الحيامن (بدلالة حركتها) بعد التجميد الفائق والأذابة باستخدام محلول Hank's

نسبة التخفيف	الحركة الفردية بعد التخفيف	الحركة بعد التجميد والأذابة بدرجة 37°م لمدة 8 ثواني	الخساره في الحيوية الحركة بعد التخفيف - الحركة بعد التجميد = نسبة الحيامن المفقوده
10:1	%60	-	-
10:1	%95	%60	35 = 60- 95
10:1	%55	-	-
10:1	%50	-	-
20:1	%85	%40	45 = 40- 85
مجموع نسب الخساره = 80 % ومعدلها 40%			

## REFERENCES

1. Akcay, E. ; Y. Bozkurt and N. Tekin 2004. Cryopreservation of Mirror Carp Semen, Turk. J. Vet. Anim. Sci., pp: 837-843.
2. Al-Aaraji, A. S. and K. I. Saleh 2009. The influential factors on the seminal fluid features in Common Carp. Al-Furate J. for Agri. Sci. 2(1): P.123-128 (In Arabic).
3. Al-Biaty, N. M. ; F. F. Ibrahim; H. J. Al-Obaidy and K. J. Al-Jashaamy 2003. Effect of some diluents on sperm motility of three species of fish Carp. Iraqi J. Agric. (Special Issue). 8 (1) P. 40-46 (In Arabic).
4. Al-Flujy, S. J. ; A. A. Mudh and S. H. Muhammad 2016. The value chain of fish for floating cages and pond techniques in Baghdad province. The Iraqi J. of Agri. Sci. 47 (5): P.1264-1275. (In Arabic).
5. Al-Mukhtar, M. A. ; S. A Saged.and F. M. Al-Zaidy 2008. Preliminary observation on the sperm biology of (Bunnei *Barbus sarpeyi*, 1874) after injection and preservation. Iraqi J. Aquacult., 5(1) P. 29-32(In Arabic).
6. Coad, W. B. 2010. Fresh Water Fishes of Iraq. Pensoft Publishers, Sofia, Bulgaria, No. 39, pp:116.
7. Dahham, H. M. ; H. J. Helmi ; H. J. Kadhum and K. J. Abd.Alhussin 2005. Properties of milt for seven local fishes . Ibn Al-Haitham J. for Pure & Appl. Sci. 18 (2) P. 37-43 (In Arabic).
8. Jenkins, J. ; B. Eilts, A. Guitreau.; C. Figiel ; R. Draugelis-Dale and T. Tiersch 2011. Sperm quality assessments for endangered razorback suckers *Xyrauchen texanus*. Reproduction 141: 55-65. (Cited on Tiersch and Green, 2011), pp: 650
9. Paniagua-Chavez, C.; J. Buchanan and T. Tiersch 1998. Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of eastern oyster sperm. J. of Shellfish Res. 17: 231-237. (Cited on Tiersch and Green, 2011), 650
10. Suquet, M.; C. Dreanno; C. Fauvel ; J. Cosson and R. Billard, 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish, Aquacul. Res. 31(3) P. 231 – 243
11. Tiersch, T. R. ; W. R. Wayman ; C.R. Figiel ; O. T. Gorman ; J. H. Williamson and G.J. Carmichael 1997. Field collection, handling and storage of sperm of the endangered razorback sucker. North American J. of Fisheries Manag. 17:167-173
12. Tiersch, T. and P. Mazik 2000. Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. pp: 439
13. Tiersch, T. R.; C.R. Figiel; W. R. Wayman; J. H. Williamson; O. T. Gorman and G.J. Carmichael 2004. Cryopreservation of sperm from the Endangered Colorado Pikeminnow. North American J. of Aquacul. 66:8-14
14. Tiersch, T. R. and C. Green 2011. Cryopreservation in Aquatic Species, 2<sup>nd</sup> edit. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
15. Zhang, X. and Y. Liu 1991. Study of cryopreservation of fish spermatozoa. 1. Methods of freezing and thawing. Acta. Sci. Nat. Univ. Norm. Hunanensis 15: 59-63.