تجميد السائل المنوي لذكور الماعز الشامي

عبد الكريم عبد الرضا هوبي، منذر كوركيس أسوفي** وأميرة حسين حمرة**

ملخص

أجريت هذه الدراسة في محطة تحسين الماعز في عكركوف التابعة لمركز إباء للأبحاث الزراعية خلال الفترة الممتدة من حزيران عام 2001 ولغاية تشرين الثاني 2001. واستخدم فيها سبعة ذكور شامية تراوحت أعمارها بين 2.5-3.0 سنوات، لغرض تقييم السائل المنوي ومحاولة تجميده باستخدام طريقة غسل النطف (Washing of spermatozoa).

بينت النتائج أن هنالك اختلافات فردية بين الذكور السبعة في كل من صفة حجم القذفة والحركة الفردية والجماعية وتركيز النطف في القذفة، بينما لم تظهر نتائج التحليل الإحصائي وجود اختلافات معنوية في تركيز النطف بالملليتر الواحد وتركيز الأس الهيدروجيني ونسبة النطف الميتة. وقد بلغ المعدل العام للحركة الجماعية والفردية ونسبة النطف الميتة للسائل المنوي بعد الجمع مباشرة 82.31 ± 0.95، 82.22 ± 1.00 و6.52 ± 0.69 % على التوالي. أما بعد عملية غسل النطف فقد انخفضت الحركة الجماعية والفردية وارتفعت النسبة المئوية للنطف الميتة فقد بلغ المعدل العام لهذه الصفات، 69.09 ± 1.19، 68.03 ± 1.24 و19.97 ± 1.99 % على التوالي .كما استمرت حيوية النطف بصورة فعالة لمدة أربع ساعات بعد الإسالة، وقد بلغ المعدل العام للحركة الفردية للنطف بعد الإسالة 44.50 ± 0.95، 22.91 ± 1.32 و14.00 ± 2.08 % وذلك بعد مرور 0، 2 و4 ساعات من الإسالة.

يتضح من ذلك أن هنالك إمكانية لتجميد السائل المنوي لذكور الماعز الشامي بالطريقة المبينة في الدراسة الحالية على الرغم من أن حيوية النطف بعد الإسالة لم تكن فعالة بدرجة جيدة لغاية أربع ساعات بعد الإسالة وهذه بحاجة لمزيد من الأبحاث.

الكلمات الدالة: الماعز الشامي، السائل المنوي، تجميد، طريقة غسل النطف.

1. المقدمة

نظرا لتزايد الطلب على المنتجات الحيوانية, وخصوصا اللحم والحليب في العالم بشكل عام والبلدان العربية بشكل خاص, فقد اتجهت أنظار الباحثين واهتماماتهم نحو تحسين إنتاجية الحيوانات وبالأخص المجترات الصغيرة من خلال إدخال تقنيات حديثة تضمن حدوث هذا التغيير المهم, ومن هذه التقنيات المقترحة التلقيح الاصطناعي؛ إذ بالرغم من وجود حيوانات محلية بأعداد ليست قليلة إلا أنها تفتقر إلى الإنتاجية الجيدة وذلك لضعف تراكيبها الوراثية المسؤولة عن الإنتاج (Ahmed وزملاؤه، 1997)، لذا فإن التلقيح الاصطناعي يعد إحدى هذه الطرق التي تزيد من معدلات التحسين الوراثي لهذه الحيوانات, إضافة إلى أن تطبيقه يضمن السيطرة على التناسل ويمنع انتقال الأمراض التناسلية بين الحيوانات, كما أنه يوفر مجالا لتحقيق اختبار النسل للذكور (Progeny testing) بأقصر فترة ممكنة كما يقلل من الجهود المبذولة للسيطرة على الولادة لضمان عدم حدوث هلاك مبكر للمواليد، وغير ذلك من الفوائد (Leboeuf وزملاؤه، 2000).

إن نجاح تقانة التلقيح الاصطناعي في المجترات الصغيرة يعتمد بصورة أساسية على توفير السائل المنوي المجمد, الذي يجب أن يمتاز بحركة فردية وحيوية عالية للنطف بعد الإسالة, ويمكن القول ان كلا من Smith وPolge (1950) وBarker

* قسم الثروة الحيوانية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، أبو غريب، العراق.
** مركز إباء للأبحاث الزراعية، بغداد، العراق .
تاريخ استلام البحث 2005/5/10، وتاريخ قبوله 2006/5/24.

(1957) هم أول من قاموا بإجراء تجارب حول تجميد السائل المنوي لذكور الماعز، إلاّ أن الكثير من محاولاتهم التي جرت لم تلق النجاح وذلك لوجود بعض المشاكل المتعلقة بحيوية النطف بعد الإسالة؛ إذ ان هنالك بعض الانزيمات الموجودة في البلازما المنوية التي تفرز اصلاً من الغدة البصلية الاحليلية وهذه الانزيمات تتفاعل مع بعض مكونات المخفف ولاسيما الحليب المفرز وصفار البيض.

وتسمى هذه الانزيمات احيانا بـ Egg Yolk (EYCE) Coagulating Enzymes ومن هذه الانزيمات Phospholipase A، Phospholipase C، Lysophospholipase، وان Phospholipids الموجودة في المخففات تتفاعل مع الانزيمات الآنفة الذكر وتؤدي إلى إنتاج أحماض دهنية وLysolecithine وهما تعدان مادة سمية للنطف، وتسببان انخفاضاً في حركة وحيوية النطف (Ritar، 1992 و1993 وDunner، 1993)؛ لذلك فقد فكر العديد من الباحثين بطرق حديثة للتخلص من هذه الظاهرة، منها إزالة أو نبذ البلازما المنوية (غسل النطف Washing of spermatozoa) (Ritar وSalamon ، 1983، Ritar وزملاؤه، 1990).

لذا فإن هدف الدراسة الحالية هو محاولة تجميد السائل المنوي لذكور الماعز الشامي باستخدام طريقة نبذ البلازما المنوية كمحاولة لتوفيره بشكل يتسنى معه للمربين استخدامه في التلقيح الاصطناعي لتحسين إنتاجية الحيوانات المحلية.

2. المواد وطرق العمل

استعملت في هذه التجربة سبعة ذكور شامية مربأة في محطة تحسين الماعز, التابعة لمركز إباء للأبحاث الزراعية, خلال الفترة من حزيران ولغاية تشرين الثاني لعام 2001، تم تدريبها لمدة شهرين على جمع السائل المنوي باستعمال المهبل الاصطناعي (Artificial Vagina)، كما تم إجراء تقييم فيزيائي للسائل المنوي وذلك بقياس حجم القذفة بأنابيب مدرجة ومهيأة لهذا الغرض، أما الحركة الفردية والجماعية للنطف فتم تقديرها طبقاً إلى Walton (1933)، كما تم حساب النطف الميتة استناداً إلى Swanson وBeardon (1951)، في حين اعتمدت طريقة Salisbury وزملائه (1943) لغرض تقدير تركيز النطف.

ولغرض الدخول في مجال تجميد السائل المنوي لذكور الماعز فقد تم اختيار المخفف المعد من قبل (Ritar, 1993) والمتكون من:

1. Tris (Hydroxy methyl amino ethene), 375 mM.
2. Citric acid, 124 mM.
3. Glucose, 41.625 mM.
4. Glycerol, 7%.
5. Egg Yolk, 10%.

كما تم اللجوء إلى إجراء غسل النطف (Ritar وزملاؤه، 1990) مباشرة بعد عملية الجمع. وقد استعمل المحلول نفسه المستعمل لتخفيف السائل المنوي (قبل إضافة الكليسرول وصفار البيض) في عملية الغسل. أما خطوات عملية الغسل (Leboeuf وزملاؤه، 2000) فيمكن تلخيصها بالنقاط الآتية:

1. أجريت الفحوصات الأولية للسائل المنوي لاختبار صلاحيته للتجميد مباشرة بعد عملية الجمع، ثم تم تخفيفه بمحلول الغسل (Washing Solution) بنسبة 1: 10 وبدرجة حرارة 30°م .
2. وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي المبرد (Cold centrifuge) من نوع Heraeus-CHRIST لمدة 15 دقيقة وبسرعة 600 – 1000 g (أي ما يعادل 2000 – 2500 دورة/ دقيقة) علما بأن درجة حرارة جهاز الطرد المركزي كانت 30°م.
3. أهمل الراشح، وأعيدت الخطوتان 1 و2 مرة ثانية .
4. بعدها تم إجراء تخفيف للنطف وذلك بإضافة المحلول المخفف (Tris solution) كخطوة أولية قبل عملية التجميد، بحيث تم الحصول على تركيز نطف 1000 مليون نطفة في الملليتر الواحد، واحتوى المخفف في تلك المرحلة على النسبة الاعتيادية من صفار البيض (10%) وكان خالياً من الكليسرول.

بعد ذلك تم الدخول في مراحل التجميد Freezing processes التي تتمثل بالنقاط الآتية:

تم وضع السائل المنوي بعد تخفيفه بالنسبة المقررة من المخفف في الثلاجة وكان يراقب باستمرار لضمان انخفاض

درجة حرارته إلى 5°م، واستغرقت هذه العملية بين 1.00- 1.30 ساعة.

ب. عند وصول المخفف إلى درجة حرارة 5°م، تم تخفيفه بالمحلول المخفف الذي يحتوي على تركيز الكليسرول بمقدار ضعف النسبة المقررة في المخفف وهي (14%)، وكانت كمية المخفف المضاف في هذه المرحلة مساوية للكمية نفسها التي تم التخفيف بها عند درجة حرارة 30°م، بحيث تم الحصول في النهاية على سائل منوي مخفف يحتوي تركيز نطف بمقدار 500 مليون نطفة في الملليتر الواحد ونسبة الكليسرول فيه هي 7% فقط.

ج. ترك السائل المنوي المخفف، لمدة 1.5 - 3.0 ساعات في درجة حرارة 5°م لإتمام فترة التعادل (Equilibration period).

د. بعدها تمت تعبئة السائل المنوي المخفف والمبرد في قصبات بحجم 0.25 ملليتر حيث كان تركيز النطف فيها بحدود 100 مليون نطفة في القصبة الواحدة.

هـ. تمت تهيئة حوض النتروجين السائل (Liquid Nitrogen Tank)؛ إذ وضع جهاز قياس حرارة الحوض (Thermometer) وتم الانتظار إلى أن وصلت حرارة الحوض إلى –75°م، عندها تم رفع الغطاء ووضعت الرفوف (Racks) التي تحتوي على القصبات على ارتفاع 4 سم من سطح النتروجين السائل لمدة 5 دقائق داخل حوض النتروجين، وبعد انتهاء المدة رفع الغطاء بسرعة وغمرت القصبات في النتروجين السائل, وبذلك تكون مراحل التجميد قد اكتملت بشكل نهائي. ولغرض اختبار قابلية السائل المنوي لذكور الماعز الشامي على التجميد فقد أجريت عليه الاختبارات الاتية:

1. قياس الحركة الفردية (Individual Motility) للنطف قبل عملية التجميد وبعدها.
2. قياس القابلية الحيوية للنطف بعد الإسالة (Viability of sperm after thawing) وذلك لمدة 0، 2، 4 و6 ساعات بعد الاسالة؛ إذ تمت إذابة قصبات السائل المنوي المجمد في ماء بدرجة حرارة 37°م لمدة دقيقة واحدة، ووضع في انابيب تحتوي على 0.2 ملليتر من سترات الصوديوم 2.9% ووضع المزيج في حاضنة بدرجة حرارة 37°م وتم قياس الحركة الفردية كل ساعتين ولمدة 6 ساعات (Ritar، 1992، 1993).
3. كما تمت دراسة قابلية النطف للتجميد للفترات الطويلة؛ إذ كانت تؤخذ قياسات الحركة الفردية للنطف شهرياً لمدة ستة اشهر بعد التجميد، حيث تمت إسالة العينات وقراءة النماذج لمرة واحدة بعد الإسالة مباشرة.

التحليل الإحصائي

أجري التحليل الإحصائي باستعمال البرنامج الإحصائي الجاهز (Statistical Analysis System 2001 ,SAS)، كما أجري اختبار دنكن Duncan (1955) للمقارنة بين متوسطات المعاملات للصفات الفيزيائية للسائل المنوي؛ إذ تم تحليل الصفات الفيزيائية للسائل المنوي (حجم القذفة، الحركة الجماعية، الحركة الفردية، تركيز النطف في الملليتر وتركيزها في القذفة، تركيز الأس الهيدروجيني والنطف الميتة والحية) للمقارنة بين ذكور الماعز الشامي وذلك بعد جمع السائل المنوي مباشرة وفق النموذج الرياضي الآتي:

$$\mathbf{Y_{ij} = \mu + S_i + e_{ij}}$$

حيث:

Y_{ij} = قيمة المشاهدة للصفة المدروسة.

μ = تأثير المتوسط العام.

S_i= تأثير الذكر i، حيث i = ذكور الماعز الشامي (A, B, C, D, E, F, G).

e_{ij} = تأثير الخطأ العشوائي.

أما النموذج الرياضي الخاص بدراسة تأثير عملية غسل النطف فهو:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

حيث:

Y_{ij} = قيمة المشاهدة للصفة المدروسة.

μ = تأثير المتوسط العام.

T_i= تأثير عملية الغسل، حيث i تمثل (قبل عملية الغسل وبعد عملية الغسل).

e_{ij} = تأثير الخطأ العشوائي.

في حين استخدم النموذج الرياضي التالي لدراسة تأثير

الذكر وحيوية النطف لساعات بعد الإسالة:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + T_j + e_{ijk}$$

حيث:

Y_{ij} = قيمة المشاهدة للصفة المدروسة.

μ = تأثير المتوسط العام.

S_i = تأثير الذكر i، حيث i = ذكور الماعز الشامي (A, B, C, D, E, G, F).

T_j= تأثير وقت قياس حيوية النطف المسالة، حيث j = حيوية النطف بعد 0، 2 و4 ساعات من الإسالة.

e_{ijk} = تأثير الخطأ العشوائي.

ولدراسة تأثير التجميد الطويل لعينات السائل المنوي المجمد، فقد استخدم النموذج الرياضي التالي:

$$Y_{ij} = \mu + N_i + e_{ij}$$

حيث:

Y_{ij} = قيمة المشاهدة للصفة المدروسة.

μ = تأثير المتوسط العام.

N_i= تأثير التجميد الطويل للسائل المنوي، حيث i = التجميد بعد (24 ساعة، 1، 2، 3، 4، 5، 6 أشهر من التجميد).

e_{ij} = تأثير الخطأ العشوائي.

ومن الجدير بالذكر أن كافة هذه التحاليل قد أجريت لجميع الذكور في هذه الدراسة بوقت واحد مع وجود التأثيرات.

3. النتائـج

1. تقييم الصفات الفيزيائية للسائل المنوي لذكور الماعز الشامي بعد الجمع مباشرة

أشارت نتائج الدراسة إلى وجود اختلافات معنوية ($P<0.05$) في حجم القذفة بين الذكور قيد الدراسة؛ ففي الوقت الذي أظهر فيه الذكر A تفوقاً واضحاً في حجم القذفة سجل الذكرG أدنى معدلاتها (الجدول 1).

بلغ المعدل العام للنسبة المئوية للحركة الجماعية والفردية 82.31 ±0.95 و82.22 ±1.00% على التوالي. كما اتضح أن هنالك تغايراً كبيراً بين الذكور ($P<0.05$) في النسبة المئوية للحركة الجماعية والحركة الفردية للنطف.

أشارت النتائج إلى انعدام الاختلافات المعنوية ($P>0.05$) بين الذكور في صفة تركيز النطف في الملتر الواحد، أما تركيز النطف في القذفة فقد كان منخفضا معنوياً ($P<0.05$) للذكر(G) مقارنة بالذكرA (الجدول 1) .

أوضحت نتائج الدراسة عدم وجود أي اتجاه للتغاير بين الذكور في صفة تركيز أيون الهيدروجين في السائل المنوي والنسبة المئوية للنطف الميتة (الجدول 1)؛ فقد بلغ المعدل العام لتركيز أيون الهيدروجين (درجة الحموضة) 6.66± 0.04 والنسبة المئوية للنطف الميتة 6.52± 0.69 %.

2. تقييم ذكور الماعز الشامي من ناحية بعض صفات السائل المنوي بعد عملية الغسل

أشارت النتائج (الجدول 2) إلى انعدام الاختلافات ($P>0.05$) بين الذكور في الصفات الفيزيائية المدروسة للسائل المنوي بعد عملية غسل النطف التي تتمثل في النسبة المئوية للحركة الجماعية والحركة الفردية للنطف والنسبة المئوية للنطف الميتة (الجدول 2)، وبلغ المعدل العام 69.09 ± 1.19، 68.03 ± 1.24 و19.97 ± 1.99 % للصفات المذكورة أعلاه على التوالي.

وبالمقابل فقد تبين أن لعملية غسل النطف تأثيراً سلبياً على حيويتها؛ إذ انخفضت بشكل معنوي ($P<0.05$) الحركة الجماعية والفردية ونسبة النطف الحية (الجدول 3). وقد تراوحت نسبة الانخفاض في الحركة الجماعية (9-17%) والحركة الفردية (10-18%) والنطف الحية (7-20%). وقد سجلت أعلى نسبة للنطف الميتة للذكور G، B، E وD، بينما الذكور A وC امتازت بحصول تدهور أقل لنطفها عند إجراء عملية الغسل (الجدول 4).

3. قياس حيوية النطف بعد الإسالة

بلغ المعدل العام لحيوية النطف بعد الإسالة مباشرة 44.50± 0.95 %. كما يتضح من الجدول (5) عدم وجود اختلافات بين الذكور($P>0.05$) في الحركة الفردية للنطف بعد الإسالة مباشرة.

كذلك أشارت النتائج إلى عدم وجود تأثير معنوي

(P>0.05) للذكور في النسبة المئوية للحركة الفردية للنطف بعد الإسالة بساعتين. ولم تكن هنالك اختلافات معنوية (P> 0.05) في نسبة الحركة الفردية للنطف بين الذكور بعد الإسالة بأربع ساعات (الجدول 5) ، فقد بلغ معدلها العام 14.00± 2.08 %. ولم يتم تسجيل أي حركة فردية للنطف بعد مرور 6 ساعات من الإسالة، باستثناء الذكرC وقد بلغت 10% فقط. كما اتضح أن هنالك اختلافا معنويا (P<0.01) في الحركة الفردية للنطف بعد الإسالة بتقدم فترة الإسالة بعد التجميد (الجدول 5).

4. تأثير الخزن لمدة طويلة بالتجميد في حيوية النطف

أشارت نتائج خزن السائل المنوي المجمد لمدة طويلة إلى أنه خلال الشهرين الأولين من التجميد لم تتغير الحركة الفردية للنطف بعد الإسالة معنوياً (P>0.05) (الجدول 6). بينما كان انخفاضها معنوياً(P<0.05) ابتداء من الشهر الثالث من التجميد ولغاية ستة أشهر، وان هذا الانخفاض كان اكثر من 20%.

4. المناقشـة

لقد جرت محاولات عديدة سابقة لتجميد السائل المنوي لذكور الماعز الشامي في عام 1998 (لنفس الباحثين- نتائج غير منشورة) بالتعاون مع الملاك الفني المتخصص لقسم التلقيح الاصطناعي في وزارة الزراعة واستمرت التجربة لأكثر من أربعة أشهر متواصلة (آب– تشرين الثاني) واستعملت فيها أنواع متعددة من مخففات السائل المنوي بتراكيز مختلفة لصفار البيض (1.5، 4، 5 و10%) وبخطوات تجميد تختلف الواحدة عن الأخرى (تعبئة القصبات إما بدرجة 30° أو 4°م)، إلا انها جميعاً لم تجدِ نفعاً؛ إذ لم يتم الحصول على أية نسبة للحركة الفردية للنطف بعد الإسالة. أما في هذه الدراسة وبعد إدخال إحدى الخطوات الجديدة وهي عملية غسل النطف (Washing of Spermatozoa) بعد الجمع مباشرة، فقد نجحت محاولة تجميد السائل المنوي لذكور الماعز الشامي لأول مرة في القطر.

يعتمد نجاح الإخصاب في التلقيح الطبيعي أو الاصطناعي بصورة أساسية فيما يخص الذكور على نوعية وكمية السائل المنوي الذي يتم إيداعه في الجهاز التناسلي الأنثوي، كما ان خصوبة الذكور لا تعتمد فقط على كمية السائل المنوي الذي يتم التلقيح به ويضمن حصول الإخصاب وإنما تعتمد على أقل عدد ممكن من النطف التي تكفي للوصول إلى أعلى خصوبة ممكنة (Saacke وزملاؤه، 1994).

إن نتائج تقييم ذكور الماعز الشامي الداخلة في هذه الدراسة التي تمت من خلال قياس الصفات الفيزيائية للسائل المنوي بعد الجمع مباشرة (الجدول 1) بينت أن جميع الذكور تميزت بصفات تناسلية جيدة عدت مؤشراً جيداً لغرض الاستمرار في التقييم والدخول في محاولات التخفيف والتبريد والتجميد، ويمكن القول إن نتائجها كانت متقاربة ماعدا الذكر (G)، وقد يعود السبب في تقارب نتائجها إلى أن أعمارها كانت متقاربة (2.5-3.5 سنة) وأنها مرباة تحت إدارة تغذوية ورعوية واحدة . ومن الجدير بالإشارة أن الذكرينA وC تميزا عن بقية الذكور في صفات السائل المنوي، وعلى العموم فإن المعدل العام للنسبة المئوية للحركة الجماعية لنطف ذكور الماعز الشامي في هذه الدراسة (82.31 ± 0.95%) كانت مقاربة لما وجده Roca وزملاؤه (1992) في ذكور ماعز Marciano-Grandina؛ إذ سجلت (86.81 ± 0.52%).

بينما بلغ حجم القذفة وتركيز النطف في الملتر الواحد وتركيزها في القذفة في الدراسة الحالية 0.97 ± 0.04 ملتر، 2.61×10^9 نطفة/ ملتر و2.34×10^9 نطفة/ ملتر، على التوالي وهي أقل مما تم الحصول عليه في دراسة Roca وزملائه (1992) التي بلغت 1.05± 0.01 ملتر، 3.49×10^9 نطفة/ ملتر و3.36×10^9 نطفة/ ملتر، بنفس الترتيب السابق أعلاه، وقد يرجع ذلك إلى اختلاف السلالات والظروف البيئية.

إن الغاية الرئيسية من إضافة صفار البيض إلى المخففات المستعملة في تخفيف السائل المنوي هي المحافظة على النطف عند الاحتفاظ بالسائل المنوي لعدة أيام في التبريد أو للفترات الطويلة في حالة تجميده؛ إذ يعمل صفار البيض على حماية النطف من الصدمات الحرارية وإن ميكانيكية الحفاظ على النطف من الصدمات الحرارية في أثناء التجميد باستعمال

صفار البيض تتم من خلال وجود الليسثين (Lecithin) الذي يبلغ تركيزه في صفار البيض بحدود (8.6%)؛ إذ يعمل الليسثين على حماية الأغشية الخارجية للنطف، وان هذه الحماية لا يوفرها الليسثين وحده وإنما يعود ذلك إلى مركبات أخرى موجودة في صفار البيض ومن أمثلتها "Cephalin" (Saacke, 1993).

كما يعد مصدراً غذائياً جيداً للنطف (Jones وMarting، 1973 وRoca وزملاؤه، 1997). إن ذكور الماعز بصورة عامة لها القابلية على إفراز بعض الانزيمات من الغدة البصلية الإحليلية، ومن هذه الانزيمات أنزيم phospholipase A، phospholipase C وLysophospholipase ويزداد إفرازها عند الدخول في ذروة النشاط التناسلي، وتتفاعل هذه الانزيمات مع صفار البيض الموجود في المخففات وينتج عنها بعض المواد (الأحماض الدهنية و Lysolecithine) التي تعد ضارة للنطف وقد تختلف حدة هذه الحالة باختلاف الموسم والأنواع (Ritar، 1993).

كما ان هنالك إشارة إلى أن لسلالة الطيور تأثيراً على حدوث هذه الحالة؛ فقد لاحظ بعض الباحثين الألمان أن صفار البيض المأخوذ من البيض الذي تم جمعه من السلالات ذات الأوزان الثقيلة امتاز بقلة هذه الحالة مقارنة بصفار البيض المأخوذ من السلالات الخفيفة (Leboeuf وزملاؤه، 2000). كما اقترح Ritar وSalamon (1982) طريقة لتخفيف السائل المنوي لذكور الماعز وتجميده باستعمال تركيز منخفض من صفار البيض (1.5% فقط) وان هذه الطريقة فقط تتلاءم مع السائل المنوي المجمع من ذكور الماعز في بداية ونهاية الموسم التناسلي, وكذلك الذي يتم جمعه خارج الموسم التناسلي علماً بأن السائل المنوي المجمع خلال المراحل المذكورة غالباً يكون ذا نوعية غير جيدة وان فعاليته ضعيفة، أما في قمة النشاط التناسلي فإن تجميد السائل المنوي لذكور الماعز يتطلب إجراء عملية غسل للنطف مباشرة بعد عملية الجمع لغرض التخلص من الانزيمات التي تفرز بكميات كبيرة من الغدة البصلية الإحليلية (Ritar وزملاؤه، 1990؛ Pellicer، 1995) لغرض الدخول في عمليات التخفيف والتبريد والتجميد، لذلك فقد اتبعت في الدراسة الحالية طريقة غسل النطف لغرض تجميد السائل المنوي، وقد اتضح أن عموم الصفات الفيزيائية المدروسة للسائل المنوي بعد الغسل التي تتمثل في النسبة المئوية للحركة الفردية والجماعية ونسبة النطف الحية انخفضت قياساً إلى معدلاتها المثبتة بعد جمع السائل المنوي مباشرة، وقد بلغ هذا الانخفاض لجميع الذكور في هذه الدراسة بحدود 16، 17 و14 % للصفات المذكورة آنفاً على التوالي. ويعود سبب هذا الانخفاض إلى الظروف غير الطبيعية التي تتعرض لها النطف خلال عملية الغسل وتتمثل في إجراء التخفيف المناسب للسائل المنوي بمحلول الغسل ثم الترسيب بجهاز الطرد المركزي وبمرحلتين, وبالنتيجة فإن هذه الخطوات بالتأكيد لها تأثير سلبي على حيوية النطف ونسبة بقائها حية (Watson، 1995).

إن استعمال المحلول المخفف (Tris diluent) في هذه الدراسة والمتكون من Tris، وحامض الستريك والكلوكوز وبالتراكيز المثبتة كان بناء على توصيات بحوث سابقة (Ritar وSalamon ، 1982؛ Evans وMaxwell، 1987) أكدت أن هذا المحلول المخفف يوفر حماية أفضل للنطف من التغيرات التي قد تحصل في درجة الحموضة خلال مراحل التخفيف والغسل والتجميد؛ إذ ان buffering capacity لهذا المركب يتراوح بين 7.0-9.0، لذلك فإن له القابلية على ادمصاص الغازات الناتجة وتقليل الحموضة المتكونة، كما ان لهذا المركب قابلية للنفاذ إلى داخل الخلايا وتزداد هذه القابلية بتقدم المدة، ويعمل Tris في هذه الحالة كمحلول منظم داخلي، لذلك فانه يعمل على الحفاظ على درجة الحموضة بين 6.0–7.0 (Steinbach, 1963; Chemineau and Cagnie, 1991; Pintado and Perez, 1992).

أثبتت الدراسة الحالية أن لعملية غسل النطف دوراً مهماً في نجاح تجميد السائل المنوي لذكور الماعز الشامي؛ إذ تم الحصول على نسبة حيوية للنطف استمرت لغاية أربع ساعات بعد الإسالة، وبالإمكان تطبيق هذه التقانة لغرض تكوين خزين للسائل المنوي المجمد لذكور الماعز الشامي؛ إلا انه من الملاحظ في هذه الدراسة أن حيوية النطف تتدهور بعد مرور ساعتين من الإسالة (الجدول 5)، وقد يعود ذلك

إلى وجود بعض المواد المؤكسدة التي تتكون في أثناء العمليات الايضية للنطف مما يؤثر سلباً في حيوية النطف فتعمل على تدهورها (Upreti وزملاؤه، 1993) أو قد يعود السبب إلى أن نسبة صفار البيض المستعملة في هذه الدراسة (10%) غير مناسبة وتحتاج إلى المزيد من التجارب، أو قد يرجع السبب إلى أن نسبة الكليسرول المضافة إلى المخفف في هذه الدراسة (7%) كانت عالية؛ إذ إن إحلال الكليسرول محل الماء الموجود في خلية النطفة سبب حدوث تركيز عالٍ للأملاح داخل النطف مما أدى إلى حدوث تأثير سلبي عليها (Memon وOtt، 1981). بينما ذكر Ritar وزملاؤه (1990) أن حيوية النطف بعد الإسالة بلغت نسبتها مدى يتراوح بين 34.3-39.0% للفترة من 0-6 ساعات بعد الإسالة وذلك عند اتباع طريقة غسل النطف.

إن جميع عينات السائل المنوي التي تم فحصها بعد الإسالة مباشرة ولجميع الذكور الداخلة في الدراسة كانت بحيوية جيدة (الجدول 5)، وقد بلغ المعدل العام للنسبة المئوية للحركة الفردية (44.50±0.95%). لقد أشارت نتائج دراسة حيوية النطف بعد الإسالة للسائل المنوي المخزون لفترات طويلة في التجميد (الجدول 6) إلى أن حيوية النطف المجمدة لم تتأثر بدرجة كبيرة بتقدم مدة الخزن بالتجميد في هذه الدراسة (لغاية 6 أشهر)؛ إذ كانت تنخفض بمعدلات بسيطة وهذا مما يدل على قابلية نطف ذكور الماعز الشامي للتجميد لفترات طويلة. وهذه النتائج جاءت متفقة تماماً مع ما وجده كل من Corteel (1975) وRitar وSalamon (1991) الذين بينوا أن هنالك انخفاضاً في النسبة المئوية لحركة النطف بتقدم مدة الخزن بالتجميد، وأن هذا الانخفاض يتضح بصورة أكثر بعد ثلاثة أشهر من الخزن. وقد ذكر الباحثون أن معدل هذا الانخفاض في حيوية النطف بتقدم مدة الخزن بالتجميد ليس له علاقة بوجود صفار البيض أو عدم وجوده في المخففات أو بإجراء عملية الغسل للنطف أو بعدمها، لذلك لا يمكن أن يعزى السبب في انخفاض حيوية النطف المخزونة للفترات الطويلة إلى عدم وجود البلازما المنوية (Corteel، 1981) بينما لا يحدث مثل هذا الانخفاض في حيوية النطف المخزونة لفترات طويلة في التجميد في بقية الأنواع من الحيوانات الزراعية (Ritar, 1993).

ومن الجدير بالإشارة أن تجميد السائل المنوي لذكور الماعز الشامي في هذه الدراسة قد تم بطريقة تختلف عن الطرق السابقة المتبعة في التجميد في البلدان الأجنبية، وتتمثل هذه الخطوة الجديدة بوضع القصبات المبردة (4°م) على بعد 4 سم من سطح النتروجين السائل لمدة 5 دقائق وذلك عندما تصل درجة حرارة الخزان المحتوي على النتروجين السائل إلى درجة – 75°م، بعد ذلك يتم غمر القصبات في النتروجين السائل مباشرة. وفي إشارة لـ Dunner (1993) الذي أجرى محاولة لتجميد السائل المنوي لذكور الماعز في اسبانيا بطريقة مشابهة تقريباً للدراسة الحالية، فقد تم التجميد بوضع القصبات المبردة على ارتفاع 5 سم من سطح النتروجين السائل لمدة 10 دقائق ثم تم غمرها في النتروجين السائل، وكانت نتائج حيوية النطف بعد الإسالة جيدة (50%) وهي مقاربة للدراسة الحالية (44.50%). بينما تم في دراسات أخرى (Leboeuf وزملاؤه، 1998 و2000) أجريت في فرنسا استعمال عدة خطوات في التجميد متمثلة في وضع القصبات على ارتفاع 16 سم من سطح النتروجين السائل لمدة دقيقتين, ثم يتم بعد ذلك وضع القصبات على ارتفاع 4 سم من سطح النتروجين السائل لمدة 3 دقائق ثم غمرت القصبات بعد ذلك في النتروجين السائل، وفي الدراسة الحالية تمت الاستعاضة عن هذه الخطوات بخطوة واحدة تضمن تجميد النطف بدرجة جيدة جداً وتختصر بذلك وقت العمل بشكل كبير.

يتضح من الدراسة الحالية أن هنالك إمكانية كبيرة في تجميد السائل المنوي لذكور الماعز الشامي وخصوصا عند إجراء عملية غسل النطف (إزالة البلازما المنوية)، إلا أن الموضوع يستحق المزيد من الأبحاث للوصول إلى نتائج مرضية فيما يخص حيوية النطف بعد الإسالة.

الجدول رقم (1): بعض الصفات الفيزيائية للسائل المنوي للماعز الشامي (المتوسط ± الخطأ القياسي) بعد الجمع مباشرة.

رمز الذكر	عدد القذفات	حجم القذفة (ملليتر)	الحركة الفردية (%)	الحركة الجماعية (%)	تركيز النطاف بالملليتر (10^9 ×)	تركيز النطاف في القذفة (10^9 ×)	تركيز الأس الهيدروجيني (+H)	النطاف الميتة (%)
A	9	a 1.12 ± 0.10	a 87.22± 1.88	a 88.33±1.86	2.86 ±0.18	a 3.47 ±0.35	6.53±0.06	7.30± 1.94
B	4	ab 1.00± 0.12	ab 80.00± 5.40	b 78.75±5.15	2.94±0.48	ab 2.55±1.14	6.72±0.19	9.10± 4.89
C	9	ab 1.07± 0.09	ab 84.44± 2.27	ab 85.00±1.66	2.50±0.19	ab 1.76±0.26	6.70±0.16	4.41± 0.91
D	8	ab 0.92± 0.10	ab 85.00± 2.50	ab 85.00±1.88	2.90±0.16	ab 2.17±0.46	6.65±0.11	6.27± 2.14
E	6	ab 1.12± 0.15	b 75.83± 1.53	b 77.50±2.14	2.04±0.34	ab 2.64±0.49	6.72±0.14	4.36± 1.02
F	7	ab 0.88± 0.15	b 77.85± 2.64	b 78.57±2.82	0.45 2.85	ab 2.37±0.47	6.70±0.15	7.50± 1.46
G	9	b 0.72± 0.10	ab 80.00± 1.88	b 78.33±1.86	1.98±0.39	b 1.35±0.27	6.76±0.21	7.86± 1.85
المعدل العام	52	0.97± 0.04	82.22± 1.00	82.31±0.95	2.61±0.12	2.34±0.18	6.66±0.04	6.52± 0.69

المتوسطات التي تحمل أحرفا مختلفة ضمن العمود نفسه تختلف معنويا ($P<0.05$).

الجدول رقم (2): بعض الصفات الفيزيائية للسائل المنوي للماعز الشامي (المتوسط ± الخطأ القياسي) بعد إجراء عملية غسل للنطاف.

رمز الذكر	عدد القذفات	الحركة الجماعية (%)	الحركة الفردية (%)	النطاف الميتة (%)
A	8	2.64 ± 72.85	3.05 ± 72.85	3.91 ± 14.62
B	2	12.50 ± 62.50	10.00 ± 60.00	18.50 ± 27.50
C	7	1.70 ± 69.28	2.36 ± 68.57	2.40 ± 14.85
D	4	1.25 ± 71.25	0.00 ± 70.00	4.99 ± 21.50
E	4	2.88 ± 65.00	5.00 ± 65.00	6.53 ± 20.25
F	3	1.66 ± 61.66	0.00 ± 60.00	7.16 ± 22.80
G	6	1.53 ± 70.83	2.10 ± 68.33	4.68 ± 28.00
المعدل العام	**32**	1.19 ± 69.09	1.24 ± 68.03	1.99 ± 19.97

المتوسطات التي تحمل أحرفا متشابهة ضمن العمود نفسه لا تختلف معنويا ($P>0.05$).

الجدول رقم (3): بعض الصفات الفيزيائية للسائل المنوي للماعز الشامي(المتوسط ± الخطأ القياسي) قبل عملية الغسل وبعدها.

الصفات	قبل الغسل	بعد الغسل	مقدار الانخفاض(%)
الحركة الجماعية	(52)a	(32)b	16
(%)	82.22±1.00	69.09±1.11	
الحركة الفردية	(52) a	(32)b	17
(%)	82.31±0.95	68.03±1.24	
النطف الحية	(48) a	(36)b	14
(%)	93.41±0.69	80.02±1.99	

المتوسطات التي تحمل أحرفا مختلفة ضمن الصف نفسه تختلف معنوياً ($P<0.01$).
الرقم بين الأقواس يمثل عدد القذفات التي تم تحليلها.

الجدول رقم (4): مقدار الانخفاض (%) في بعض الصفات الفيزيائية للسائل المنوي لذكور الماعز الشامي بعد إجراء عملية غسل النطف (المتوسط ± الخطأ القياسي).

رمز الذكر	عدد القذفات	الحركة الجماعية (%)	الحركة الفردية (%)	النطف الحية (%)
A	8	2.64 ± 17.14	17.86±2.86	4.32 ± 9.77
B	2	2.89 ± 15.00	3.75 ± 13.75	7.51 ± 15.32
C	7	2.10 ± 16.43	2.64 ± 17.14	2.27± 9.66
D	4	3.54 ± 15.00	1.44 ± 17.50	7.02 ± 16.37
E	4	2.89 ± 10.00	4.41 ± 11.67	9.35 ± 15.80
F	5	3.39 ± 17.00	2.92 ± 19.00	5.43 ± 13.68
G	6	3.00 ± 12.00	3.54 ± 15.00	8.17 ± 21.32

المتوسطات التي تحمل أحرفا متشابهة ضمن العمود نفسه لا تختلف معنويا($P>0.05$).

الجدول رقم (5): النسبة المئوية للحركة الفردية للنطف المجمدة (المتوسط ± الخطأ القياسي) للماعز الشامي خلال المراحل المختلفة بعد الإسالة.

رمز الذكر	حيوية النطف بعد الإسالة		
	(0) ساعة	ساعتان	(4) ساعات
A	a 43.75±2.12 (12)	a 24.50±2.94 (7)	a 5.00±0.00 (1)
B	a 42.72±3.83 (11)	a 19.28±2.02 (7)	a 10.00±0.00 (1)
C	a 46.66±1.54 (12)	a 19.37±2.57 (8)	a 12.50±2.50 (2)
D	a 47.08±2.49 (12)	a 23.33±4.21 (6)	a 10.00±5.00 (2)
E	a 44.45±2.47 (11)	a 23.00±4.35 (5)	a 15.00±0.00 (1)
F	a 42.72±3.59 (11)	a 30.00±3.53 (5)	a 22.50±2.50 (2)
G	a 46.00±2.33 (10)	a 27.50±7.50 (4)	a 25.00±0.00 (1)
المعدل العام	A 44.50±0.95 (89)	B 22.91±1.32 (45)	B 14.00±2.08 (10)

المتوسطات التي تحمل أحرفاً صغيرة متشابهة ضمن العمود نفسه لا تختلف معنوياً ($P>0.05$).
المتوسطات التي تحمل أحرفا كبيرة مختلفة ضمن الصف نفسه تختلف معنويا ($P<0.01$).
الأرقام داخل الأقواس تمثل عدد العينات التي تم تحليلها.

الجدول رقم (6): النسبة المئوية للحركة الفردية لنطف ذكور الماعز الشامي (المتوسط ± الخطأ القياسي) خلال المراحل المختلفة بعد التجميد.

المدة بعد التجميد	عدد النماذج	الحركة الفردية (%)
24 ساعة	9	a 54.44±2.42
شهر واحد	12	a 57.50±1.89
شهران	8	a 54.37±3.46
3 أشهر	9	b 45.00±1.85
4 أشهر	8	b 45.62±1.75
5 أشهر	8	b 43.75±2.26
6 أشهر	9	b 43.33±1.66

المتوسطات التي تحمل أحرفا مختلفة ضمن العمود نفسه تختلف معنويا ($P<0.05$).

المراجـع

Ahmed, M. M. M., Makawi, S.A. and Gadir, A.A. 1997. Reproductive of Sannen Bucks under Tropical Climate. *Small Rumn*. Res. 26: 151-155.

Barker, C. A. 1957. Some Aspects of Artificial Insemination in Swine and Goats. In: Proc. 10th. Ann. Conf. National Assoc. Artif. Breeders, Toronto, PP. 127 - 132. (Cited by Lebouef et. al., 2000).

Chemineau, P. and Cagnie, Y. 1991. Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. FAO Animal Production and Health Paper: 83.

Corteel, J. M. 1975. Du Lavage Sur La Conservation Des Spermatozoides De Boue Abase Temperature. Ann. *Biol. Anim. Biochim., Biophys*., 15: 525 – 528. (Cited by Leboeuf et al., 2000).

Corteel, J.M. 1981.Collection, Processing and Artificial Insemination of Goat Semen. In: Gall, C. (Ed) Goat Production. Academic Press, London, 171-191. (Cited by Corteel et al., 1988).

Corteel, J. M., G. Baril and B. Leboeuf. 1987. Development and Application of Artificial Insemination with Deep Frozen Semen and Out of Season Breeding of Goats in France, in: Proc. 4th Conf. Goat., Brasilia, 1, 523-547.

Corteel, J.M., B. Leboeuf and G. Baril. 1988. Artificial Breeding of Adult Goat and Kids Induced with Hormones to Ovulate Outside the Breeding Season. *Small Rumn. Res*. 1:19-35.

Duncan, D. 1955. Multiple Range and Multiple F- test. *Biometrics*. 11: 1 -24.

Dunner, S. 1993.Freezing Buck Semen Diluted in Amine-organic Buffers. *Anim. Prod*. 66:387-391.

Evans, G. and W. M. C. Maxwell. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats, Butterworths, Sydney, 194.

Jones, R. C. and I.C.A. Martin.1973.The Effect of Dilution, Egg Yolk and Cooling to 5° C on the Ultrastructure of Ram Spermatozoa. *J. Reprod. Fert*. 35: 311-320.

Leboeuf,B., E. Manfriedi, P. Boue, A. Piacere, G. Brice, G. Baril, C. Broqua. P. Humblot and M. Terqui. 1998. Artificial Insemination of Dairy Goats in France. *Livestock Prod. Sci*. 55: 193- 203.

Murciano - Grandina Goats in the Mediterranean Area. *Anim. Reprod. Sci*. 9:255-262.

Roca, J., J. A.Carrizosa, I. Campos, A. Lafuente, J. M.Vazquez and E. Martinez. 1997. Viability and Fertility of Washed Murciano–Granadina Goat Spermatozoa Diluted in Tris - Egg Yolk Extender and Stored at 5ºC. *Small Rum. Res*. 25: 147-153.

Saacke,A. G.1993.Factors Affecting Spermatozoa Viability from Collection to Use. Dep. of Dairy Sci. Virginian Polytechnic Institute and State University. Blacksburk, Virgina. Saacke,A.G., S. Nadir and R. L. Nebel.1994. Relationship of Semen Quality to Sperm Transport, Fertilization, and Embryo Quality in Ruminants. *Theriogenology* 41: 45-50.

Salisbury, G. W., Beek, G. H., Elliet, I. and Willett, E. L. 1943. Rapid Method of Estimating the Number of Spermatozoa in Bull Semen. *J. Dairy Sci.* 26: 483-486.

SAS, 2001. SAS/STAT User Guide for Personal Computers. Release 6.01. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Smith, A. H. and C.Polge. 1950.Survival of Spermatozoa at Low Temperatures. *Nature (Lond.).* 166:658-671.

Steinbach, J. 1963. *Investigations on Media and Methods for Freezing Bovine Semen.* MSc. Thesis, Faculty of the Graduate School of Cornell Univ.

Swanson, E. W. and Beardon, H. J. 1951. An Eosin Nigrosin Stain Differentiating Live and Dead Bovine *Spermatozoa. J. Anim*. Sci. 10:981-987.

Upreti, G.C., Oliver, J. E., Pitt, C. and Vishwanath, R. 1993. Recent Technological Development in Liquid Semen Diluents. Workshop in Ruakura Agriculture Center, Private Bag 3123.Hamilton, New Zealand.

Walton, A.1933.Technique of Artificial Insemination. *Mp. Bur.Anim. Genet*. 56, Edinburgh.

Watson, P. F. 1995. The Roles of Lipid and Protein in the Protection of Ram Spermatozoa at 5ºC by Egg Yolk Lipoprotein.J. *Reprod. Fert*., 62: 483 - 492.

Leboeuf, B., Restall, B. and Salamon, S. 2000. Production and Storage of Goat Semen for Artificial Insemination. *Anim. Reprod*. Sci. 62:113-141.

Memon, M. A. and Ott, R. S. 1980. Methods of Pregnancy Diagnosis in Sheep and Goats. *The Cornell Veterinarian*. 70:226-231.

Pellicer, M. T. 1995. Purification Y. Caracterizacion del Componende de la Secretion Bulbouretral de Macho Cabrio Implicado en el. Deterioro de la calida de los espermatozoides diluides en teche. In; Tesina de Licenciatura Universidad de Murcia, PP. (Cited by Leboeuf et. al., 2000).

Pintado, B. and B. Perez. 1992. Effect of Conservation Length on Buck Ejaculates Frozen with Egg-yolk. In: Proc. of 5th Inter. Conf. on Goat. New Delhi, India, 1. 286.

Ritar, A. J. and Salamon, S. 1982. Effects of Seminal Plasma and of its Removal and of Egg Yolk in the Diluent on the Survival of Fresh and Frozen– Thawed Spermatozoa of the Angora Goat. *Aust. J. Biol. Sci*. 35:305-312.

Ritar, A. J. and S. Salamon. 1983. Fertility of Fresh and Frozen–thawed Semen of the Angora Goat. *Aust. J. Biol. Sci,* 36:49-59.

Ritar, A.J., Ball, P. D. and May, P. J. O. 1990. Examination of Methods for the Deep Freezing of Goat Semen. *Reprod. Fertil. Dev*, 2:27-34.

Ritar, A. J. and Salamon, S. 1991. Effect of Month of Collection, Method of Processing, Concentration of Egg Yolk and Duration of Frozen Storage on Viability of Angora Goat Spermatozoa. *Small Rum. Res*. 4:29-37.

Ritar, A. J. 1992. Artificial Insemination of Fiber Production Goats.5th Int. Conf. on Goat., New Delhi. 2:1166-1173.

Ritar,A. J.1993. Control of Ovulation, Storage of Semen and Artificial Insemination of Fiber–Production Goat in Australia: a Review.*Aust.J.Exp.Agric*.33:807-820.

Roca, J., E. Mrtinez, J. M. Vazquez and P. Coy. 1992. Characteristics and Seasonal Variations in the Semen of

Deep Freezing of the Shami Bucks' Semen

Abdul-Karim A. Hobi[*]*, Monther K. Asofi*[**] *and Amira H. Hamra*[*]

ABSTRACT

This study was conducted at Agragof goat breeding station, IPA Agriculture Research Center over a period of six months from June 2001 to November 2001. Seven Shami bucks aged 2.5-3.0 years were used in this experiment, in order to evaluate the semen of these bucks and try to freeze it.

Results revealed that there were individual differences between bucks in the semen physical properties such as volume, individual motility, mass wave activity and concentration of sperm in the ejaculate. The overall means of the mass wave activity, individual motility and the dead sperm after semen collection were (82.30 ± 0.95, 82.22±1.00 and 6.52 ± 0.09 %, respectively). After the washing of spermatozoa, the mass activity and individual sperm motility decreased while the percentage of the dead sperm increased; the overall means were (69.09 ± 1.19, 68.03 ± 1.24 and 19.97 ± 1.99 %, respectively). After thawing, the viability of sperms was continuously inactive for 4 hrs. at maximum, and the overall means of the individual activity of sperms after thawing were (44.50±0.95, 22.91 ± 1.32 , 14.03 ± 2.08 % at 0 ,2 and 4 hrs., respectively).

In conclusion, although the viability of sperms after thawing was not in a satisfied degree but the freezability of bucks semen achieved was successful in our study, and it needs more attention from researchers to improve it.

KEYWORDS: Semen, Shami bucks, freezing, Washing of spermatozoa.

*Department of Animal Resources, College of Agriculture, University of Baghdad, Abu-Ghraib, Baghdad.

** IPA Agriculture Research Center, Baghdad, Iraq, P.O. BOX 39094.

Received on 10/5/2005 and Accepted for Publication on 24/5/2006.