بسم الله الرحمن الرحيم

امكانية تجميد السائل المنوي لذكور الطيور الداجنة واستخدامها على النطاق التجاري

الدكتور

محمد علاء البيار

قسم الإنتاج الحيواني
كلية الزراعة – جامعة الانبار

المقدمة

مرت عملية حفظ السائل المنوي بالتجميد بفترات طويلة, إذ يعد SHAFFNER واخرون (1941) أول من جمد السائل المنوي للطيور الداجنة ولكن كان الناتج هو سائل منوي قليل الحركة بعد الإسالة.

تمكن POLGE(1951). من الحصول على عدد قليل من الافراخ الحية باستعمال السائل المنوي المجمد المذاب وباستخدام الكليسيرول كمادة واقية ضد التجميد مع مخففات السائل المنوي.

وتطورت طرق حفظ السائل المنوي بالتجميد في العقود اللاحقة لما لها من اهمية بالغة في صناعة الدواجن.

ولحد هذه اللحظة لا يوجد استخدام على النطاق التجاري لهذه التقنية لأنها تعاني العديد من المشاكل وما زالت في طور البحث والدراسة (BLESBOIS, 2007 ; الدراجي, 2011).

ويستخدم لحد الان في القطعان التجارية طرق التلقيح الاصطناعي باستخدام السائل المنوي الطازج Fresh semen المخفف او غير المخفف (Lesson و Summers, 2009)

أهمية استخدام تقنية تجميد السائل المنوي

هنالك عدة فوائد لتجميد السائل المنوي اهمها:

1- استخدام تقنية التلقيح الاصطناعي لقطعان الأمهات

2- نقل الصفات الوراثية المرغوبة للطيور إلى مسافات بعيدة بشكل أسهل من نقل الطيور وتعرضها لمخاطر الموت أو الإجهاد.

3- التخلص من عملية استبدال ذكور القطيع عند العمر 46 أسبوع ذلك لوجود خزين كافي من السائل المنوي.

4- خزن السائل المنوي للطيور المهددة بالانقراض كما هو معمول به الان في في البنوك الوراثية Cryobank في شمال امريكا وفرنسا وهولندا.

5- اجراء برامج تطوير العروق التي تتضمن التضريبات العكسية (اي مع الاباء).

6- اختبار النسل عن طريق اعادة تكرار التزاوجات مع الذكور الاصلية لمدة 3-4 سنوات لاختبار قابليتها الوراثية.

(1986,Lake)

اهمية استخدام التلقيح الاصطناعي للدواجن

1- زيادة نسبة الخصوبة والفقس للقطيع عن المعدلات الطبيعية للتلقيح الطبيعي.
2- اختصار عدد الديكة للقطيع من 1 – 10 في التلقيح الطبيعي الى 1 – 150 في التلقيح الاصطناعي
3- استخدام نظام التربية بالاقفاص لتربية الامهات والاستفادة من مزايا هذا النظام.
4- الفحص الدوري لخصوبة الذكور والاناث واستبعاد الغير كفؤ منها.
5- إمكانية التحكم بكميةالعلف المقدم لكلا الجنسين وكذلك استخدام نوعين من العلائق في نفس الوقت. مما يقلل من كلفة العلف ويساعد في الحصول على اوزان مثالية للذكور والاناث.
6- التغلب على ظاهر عدم التماثل بأوزان وحجوم الذكور والإناث والتي تؤدي إلى فشل عملية التلقيح الطبيعي وانخفاض نسبة الخصوبة.
7- زيادة شدة الانتخاب بالنسبة للذكور .
8- المحافظة على مستوى ثابت من الخصوبة بالقطيع على مدار الفترة الإنتاجية.

تعرف عملية تجميد السائل المنوي بانها مجموعة الطرق الفسيولوجية التي تتطلب تكيف خلايا الحيامن لتحمل الصدمة البيولوجية نتيجة للانخفاض الحاد لدرجة الحرارة والضغط الاوزموزي التي تحدث خلال عمليات التجميد والإذابة (Holt, 1992 و Watson, 2000).

الاختلافات الفسلجية بين حيامن الطيور وحيامن الابقار وتأثيرها على خصائص الحيامن اثناء عملية التجميد

إن الاختلافات الفسلجية لحيامن الطيور وحيامن الابقار ادت الى اختلاف قابليتها على تحمل الحفظ بالتجميد للاسباب التالية:

1- حيامن الابقار لها القابلية على الاحتفاظ بـ ATP بشكل اعلى من حيامن الدواجن عند الحفظ بالتجميد (Wishart و Palmer, 1986).

2- حيامن الدواجن عرضة للتغيرات المورفولوجية, اذ ان عملية التجميد-الاذابة سوف تزيد نسبة تشوهات الحيامن للقطعة الوسطية Midpiece, المايتوكوندريا والجسم الطرفي (الاكروسوم) مقارنة بالسائل المنوي الطازج (Xia واخرون, 1988).

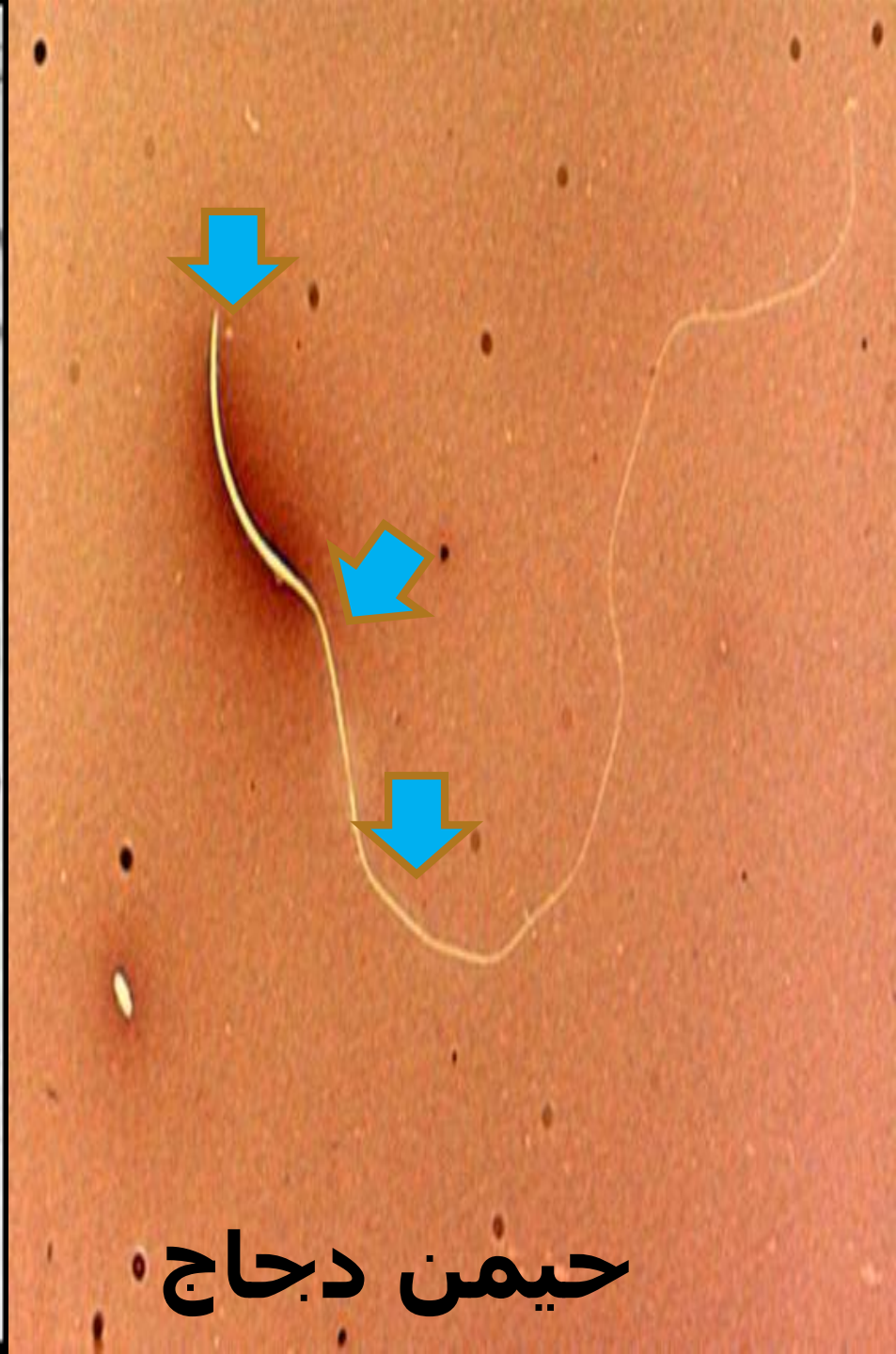
3- حيامن الديكة لها القابلية على تحمل التغير بالضغط الاوزموزي اقل من حيامن الثيران بنسبة 50 %, اذ ان حيامن الطيور تتحمل ضغط 17 ملي اوزمو وحيامن الثور تتحمل ضغط أكثر من 35 ملي اوزمو كما ان حيامن الطيور قابليتها على التكيف لتغير الضغط الاوزموزي اقل من قابلية حيامن الثيران (Watson وآخرون, 1992).

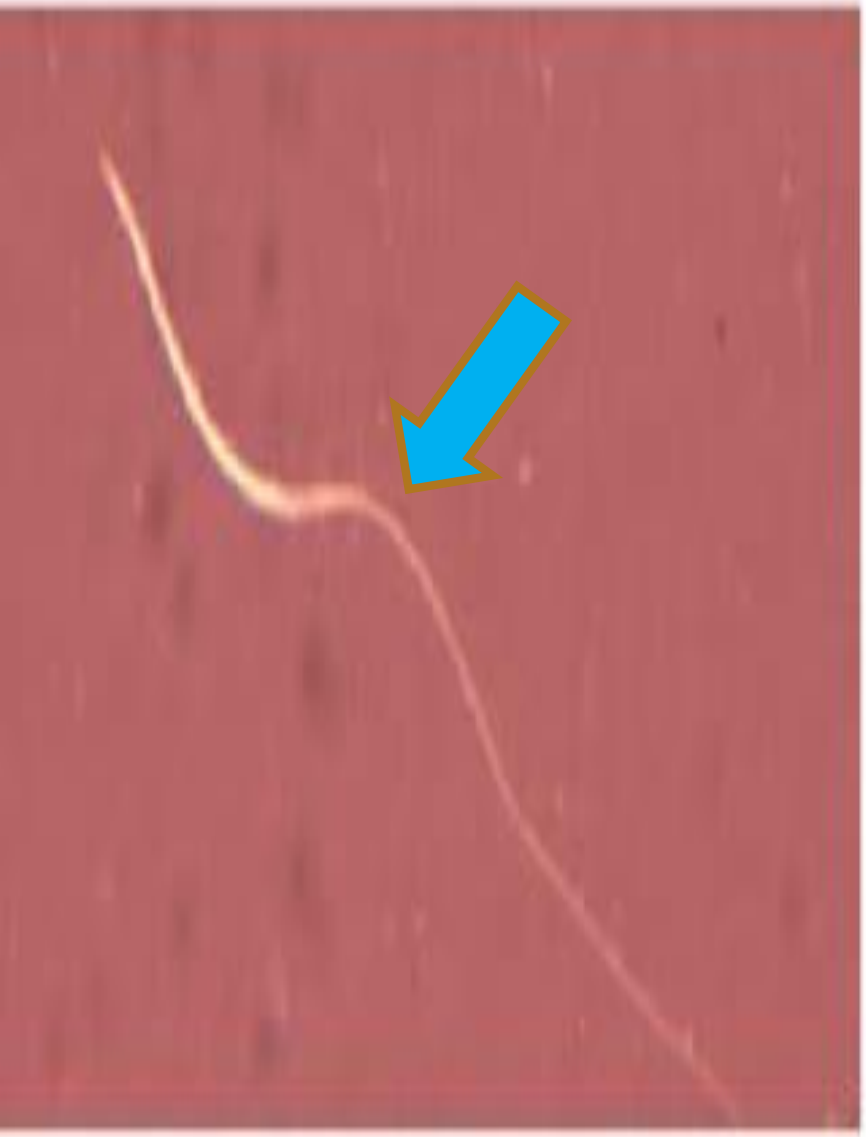
4- ان ذيل حيامن الطيور اكبر 8 مرات من رأسها وهذا من شأنه ان يجعلها اكثر حساسية لاضرار التجميد (Donoghue و Wishart, 2000)

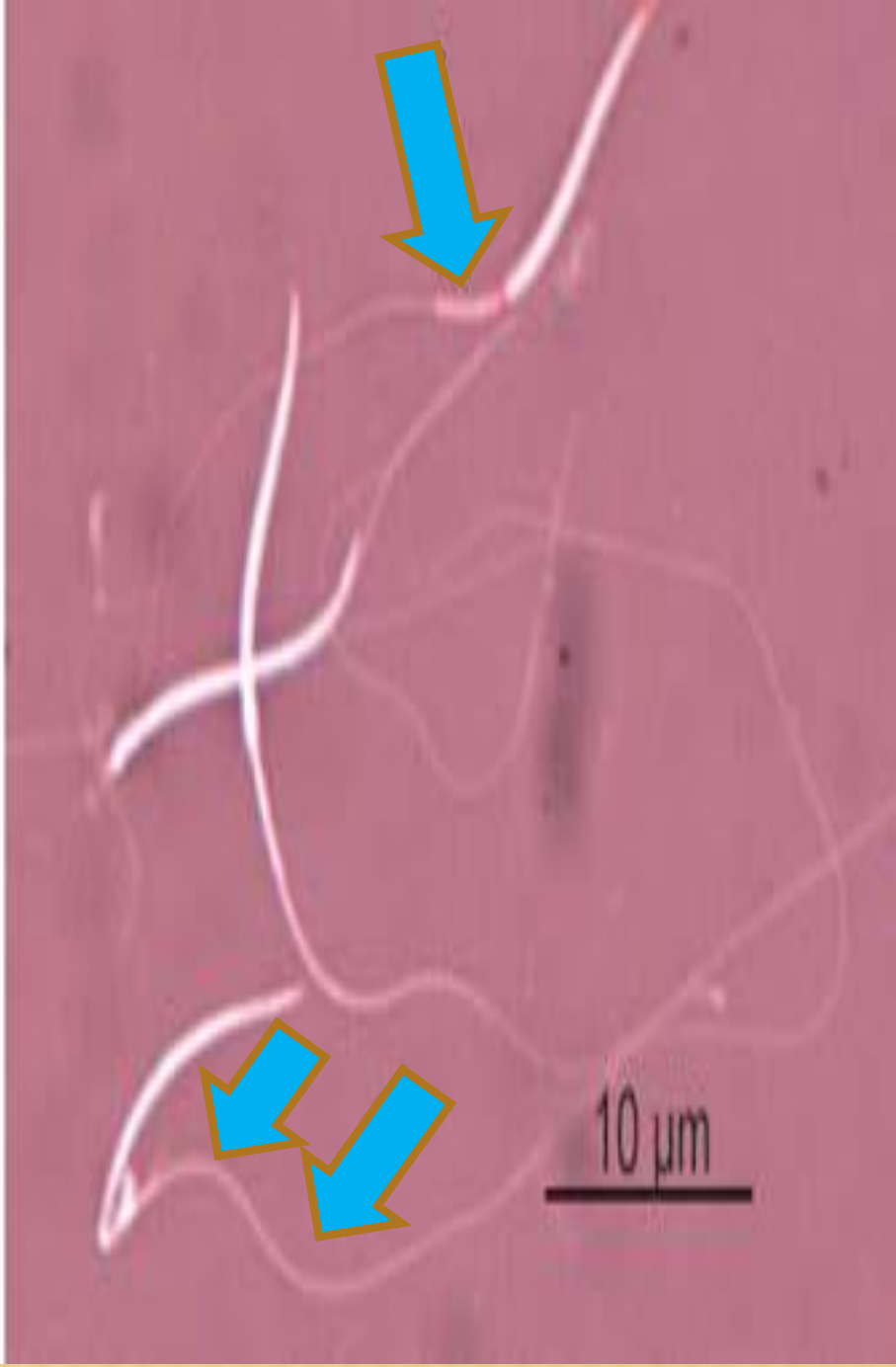
5- حيامن الطيور ذات طول يتراوح بين (80 – 90 مايكرومتر) وان حيامن الأبقار يتراوح طولها بين (50-60 مايكرومتر) وهذا بدوره يزيد من تعرض حيامن الطيور الى الاضرار الميكانيكية اثناء معاملتها بالماصات الدقيقة والطرد المركزي خلال عمليات التجميد (Agca و Crister, 2002).

6- حيمن الطيور يكون اصغر حجما وخيطي الشكل مما يعطيها نسبة مساحة سطحية الى حجم الحيمن اقل مما هي عليه بالابقاروهذا بدوره يؤدي الى زيادة كثافة النواة لها (Long, 2006).

حيامن ثور


حيمن دجاج




10 µm

هنالك عدة نقاط حرجة رئيسية تؤثر على تركيب وايض خلايا الحيامن خلال عملية التجميد وهي :

1- التفاعل بين الحيامن وعامل الانجماد الذي يؤثر على الحيامن وطرق تخفيف إجهاد البرودة.

2- سرعة حرارة التجميد والإسالة.

3- طريقة تعبئة وتغليف السائل المنوي, سواء كانت التعبئة في قصبات او على شكل بلورات او في أوعية زجاجية خاصة.

ونتيجة لذلك فقد أجريت العديد من الدراسات لإيجاد أفضل طريقة لتجميد السائل المنوي. أي إيجاد أحسن طريقة للمزج بين طرق الذوبان والتجميد لتحديد اقل ضرر قد يحدث للحيامن (Massip وآخرون, 2004).

طرق تجميد السائل المنوي

جاءت أول المحاولات الناجحة لتجميد السائل المنوي من قبل Lake و Stewart (1978) إذ استخدموا طريقة التجميد البطئ باستخدام مادة الكليسيرول Glycerole كواقي من صدمة التجميد ذلك بخلطها مع مخفف Lake بنسبة g 64-13 لكل 100 مل.

يتم وضع السائل المنوي بدرجة حرارة من 1-5 م مدة 5 دقائق كما يتم وضع المخفف كذلك بنفس درجة الحرارة.

يتم مزج 0.45 مل من الكليسيرين الى 100 مل من المخفف بواسطة ماصة دقيقة. ويتم مزج السائل المنوي والمخف وتعبأ في انبولات وتوضع في الثلاجة ويتم تبريدها تدريجيا بوحدة التبريد البويولوجية لحد الوصول الى درجة -35 م

بعدها تغمر الامبولات في النتروجين السائل (-196م)

طريقة الإسالة

تتم عن طريق وضع الانبولات في حمام مائي بدرجة (5م) لازالة الجليد المتكون لمدة 5 دقائق وبعد ذلك يتم التلقيح .

وكانت نسبة الاخصاب للحيامن المجمدة 53 % مقارنة ب 90 % للسائل المنوي الطازج.

Fertilised eggs produced during days 2 to 6 and 2 to 8 inclusive after single inseminations of pooled semen stored between 7 and 8 months at −196 °C

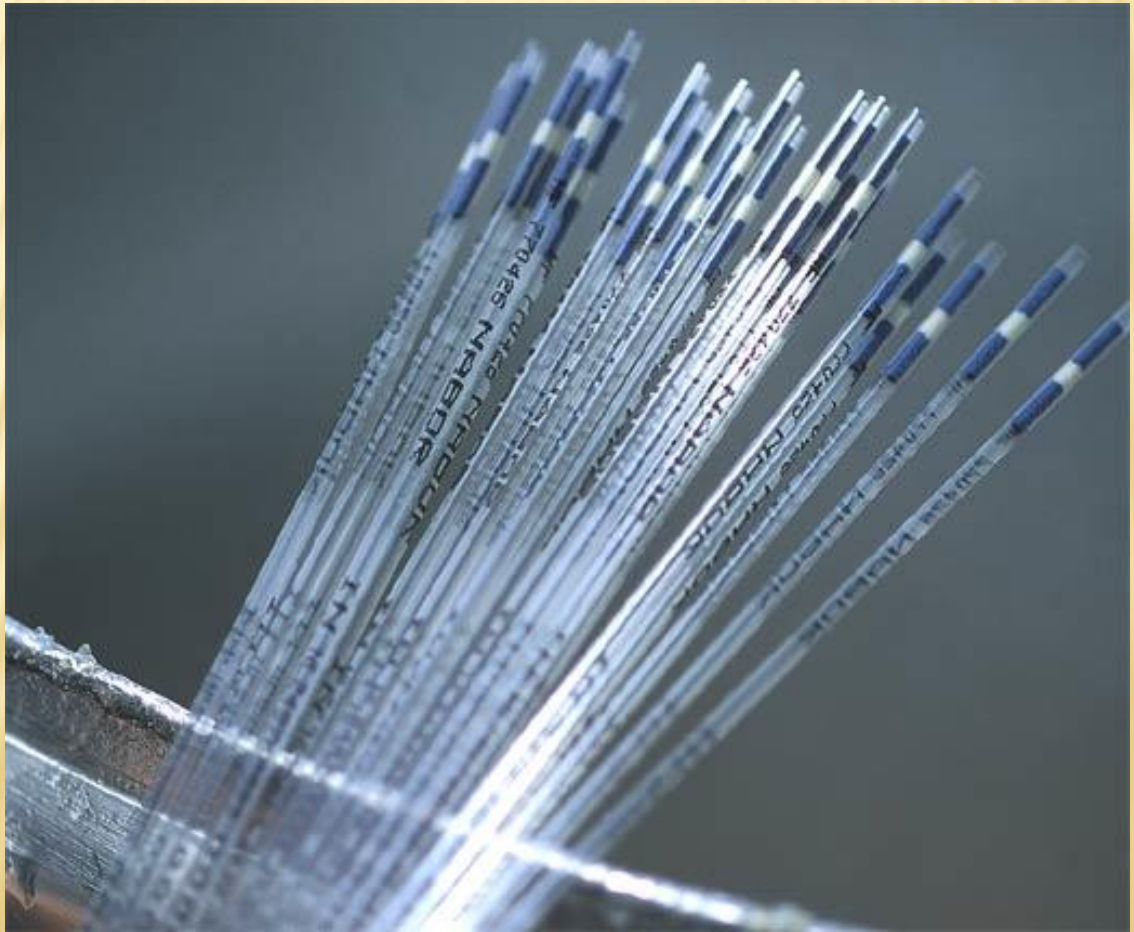
Source of males	Days 2 to 6 inclusive		Days 2 to 8 inclusive	
	All ♀♀	♀♀ producing 2 or more fertilised eggs	All ♀♀	♀♀ producing 2 or more fertilised eggs
Thornber	78/155[1] (50·3%) 39 ♀♀	67/93 (72%) 22/39 ♀♀	94/214 (43·9%)	83/129 (64·3%)
Thornber ♂♂ × Shaver ♀♀	97/153 (63·4%) 37 ♀♀	90/114 (78·9%) 25/37 ♀♀	114/215 (53%)	107/159 (67·3%)
Control: Thornber (freshly diluted, 0·06 ml/♀; semen diluted 1 to 1 with deglycerolising fluid for details see text	94/102 (92%) 25 ♀♀	94/98 (96%) 24/25 ♀♀	124/141 (88%)	124/135 (92%)

Fertilised eggs produced during days 2 to 6 and 2 to 8 inclusive after single inseminations of semen samples containing a high proportion of spermatozoa judged to survive well after freezing, storing at −196 °C for 2¼ years and thawing

	Days 2 to 6 inclusive		Days 2 to 8 inclusive	
Males	All ♀♀	♀♀ producing 2 or more fertilised eggs	All ♀♀	♀♀ producing 2 or more fertilised eggs
Thornber	45/56[1] (80·3%) 14 ♀♀	44/50 (88%) 13/14 ♀♀	52/80 (65%)	51/74 (69%)

[1] No. of fertile eggs/total eggs laid during period.

كما قام sexton (1979) بتبريد وتجميد حيامن الدجاج بنفس طريقة Lake و Stewart (1978) ولكن باستخدام داي مثيل سلفوكسايد كمادة حافظة للحيامن من صدمة التجميد وحفظت بواسطة قصبات بلاستيكية خاصة, وايضا اعطت هذه الطريقة نسبة اخصاب منخفضة نسبيا 56 % بالمقارنة مع السائل المنوي الطازج اكثر من 90 %.



بين Lake واخرون (1980) ان اكتشاف طريقة التجميد باستخدام الكليسيرول ادت الى انجاح طرائق التجميد ولكن يجب خفض تركيز الكليسيرول بعد اذابة السائل المنوي المجمد مقبل التلقيح الى اقل من 2 %. اذ بين Hood واخرون (1970) بان الكليسيرول يسبب فقدان في البوتاسيوم والمغنيسيوم الموجود داخل النطف.

وبين Westfall و Birkett (1977) ان الكليسيرول ادى الى تقليل انتقال الحيامن الطبيعية الى الرحم فضلا عن انخفاض عدد النطف المخزونة في الغدد الخازنة للنطف.

ان تبريد السائل المنوي الى درجات قليلة فوق الانجماد بطريقة صحيحة فان مستوى الفعاليات الحيوية تنخفض الى حد كبير ولكنها ترتفع بصورة سريعة عند ارتفاع درجة الحرارة واذا اريد تجميد سائل منوي فيصبح من الضروري اضافة مادة واقية مناسبة لمنع تكوين البلورات الثلجية او تقليل حجمها داخل النطفة (عجام واخرون, 1989).

ووجد Gill واخرون (1996) بان استعمال تركيزين من الكليسيرول 13 % و 16 % ادى الى الحصول على نسبة خصوبة 62 و 65 % على التوالي بعد ان ازيل الكليسيرول قبل التلقيح باستعمال طرق الديلزة الحديثة.

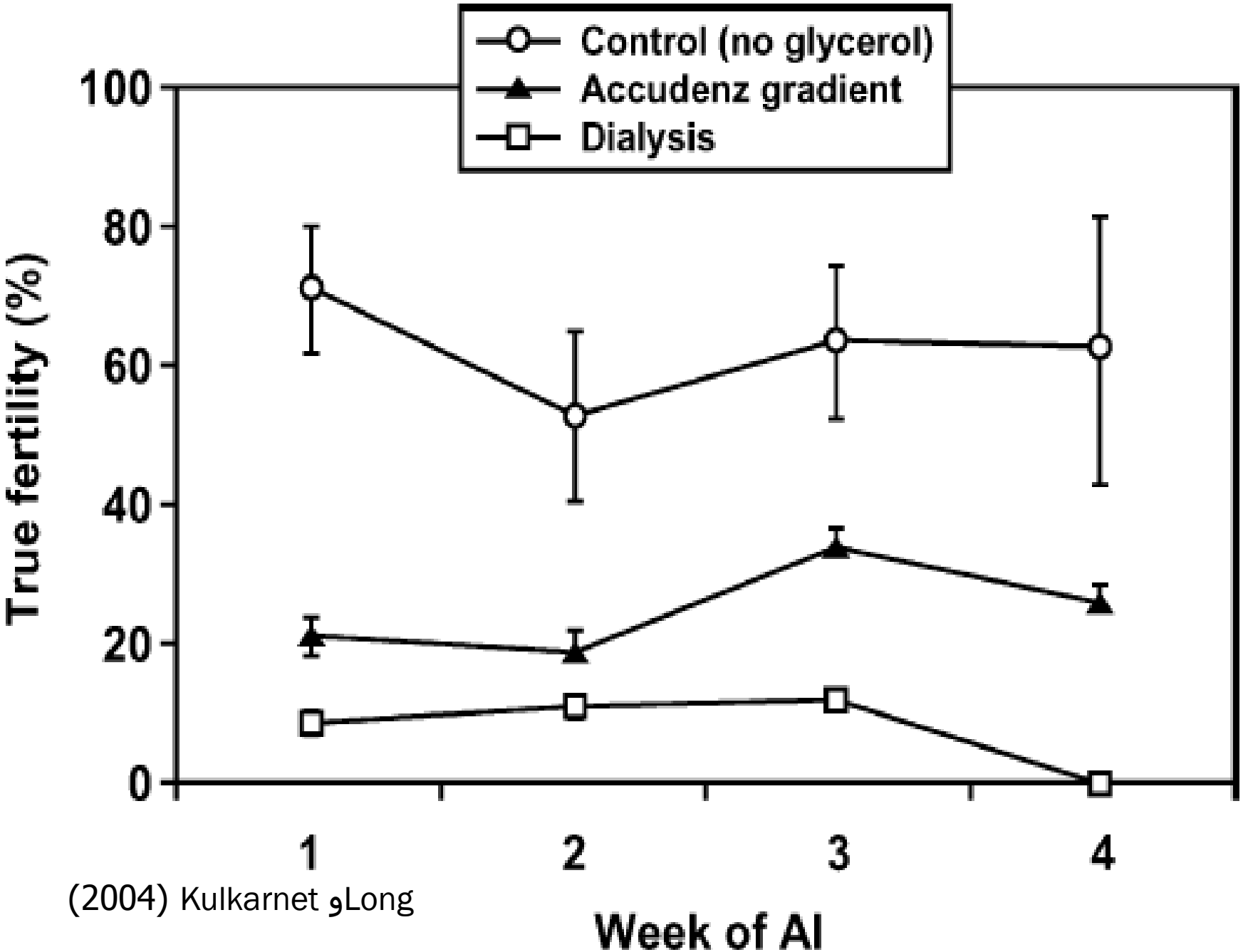
Characteristics of rooster sperm before and after freeze-thaw in varying amounts of glycerol

Characteristic	Fresh semen	Thawed semen	
		13%	16%
Count, 100 millions/100 μL	2.2 ± 0.1	1.9 ± 0.5	1.5 ± 0.4
Swirl, 0 to 4 scale	3.7 ± 0.2	4.0 ± 0	4.0 ± 0
Motility, %	66.9 ± 5.2	42.3 ± 6.7	60.0 ± 5.0
Hypo-osmotic swell test, % damaged	13.3 ± 2.3	46.0 ± 3.7	29.0 ± 2.6
Residual glycerol, %		0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.02

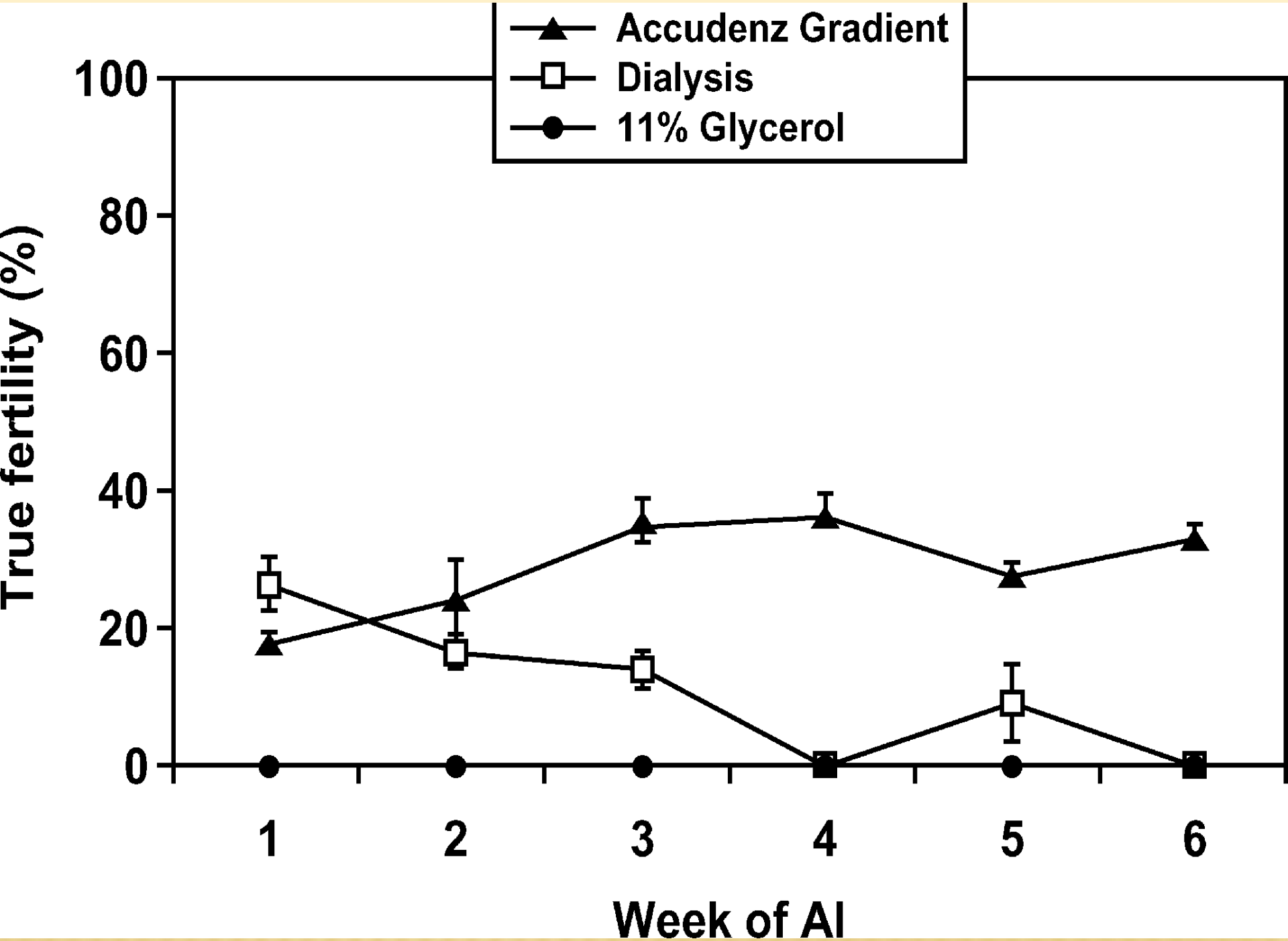
Average fertility with frozen semen

Days	Glycerol concentration 13%	Glycerol concentration 16%
	(%)	
1 to 4	58.4 ± 5.2	57.1 ± 4.6
5 to 8	61.8 ± 7.1	67.2 ± 4.8
9 to 10	71.4 ± 7.1	77.0 ± 2.3
1 to 10	62.4 ± 3.7	65.1 ± 3.4

وبين Long و Kulkarni† (2004) بان التخلص من الكليسيرول للسائل المنوي المجمد-المسال بطريقة Lake و Stewart (1978) عن طريق الطرد المركزي البطيئ Accudenz centrifugation قد زادت من قابلية اخصاب الحيامن لذكور الرومي مقارنة بالسائل المنوي المجمد-المسال المزال منه الكليسيرول عن طريق عملية الديلزة.



(2004) Kulkarnet وLong


Accudenz Gradient
Dialysis
11% Glycerol
100
80
60
40
20
0
True fertility (%)
1
2
3
4
5
6
Week of AI

واضافت Tselutine واخرون (1999) مادة dimethylsulfoxide (DMSO) و dimethylacetamide (DMA) و Glycerol الى مخفف Lakeلتخفيف السائل المنوي وتم تجميد النماذج حسب طريقة Lake و Stewart (1978) وتم اجراء مقارنة بين الإضافات المختلفة فكانت النتائج كما مبين

Liver and morphologically normal fowl spermatozoa (eosin-nigrosin) incubated in Lake diluent with the addition of glycerol, DMA, or DMSO[1]

Cryoprotectant level	Glycerol	DMA	DMSO
	(%)		
0	93 ± 0.8[a]	92 ± 1.3[a]	94 ± 0.7[a]
4	76 ± 2.1[b]	68 ± 1.6[cd]	22 ± 1.4[ef]
6	72 ± 2.5[bc]	62 ± 1.9[d]	20 ± 1.7[f]
8	74 ± 2.7[b]	68 ± 2.8[cd]	26 ± 2.6[e]
11	74 ± 2.6[b]	62 ± 2.6[d]	27 ± 2.6[e]

[a–f]Means ± SE with no common superscript differ significantly (n = 8, $P < 0.05$).

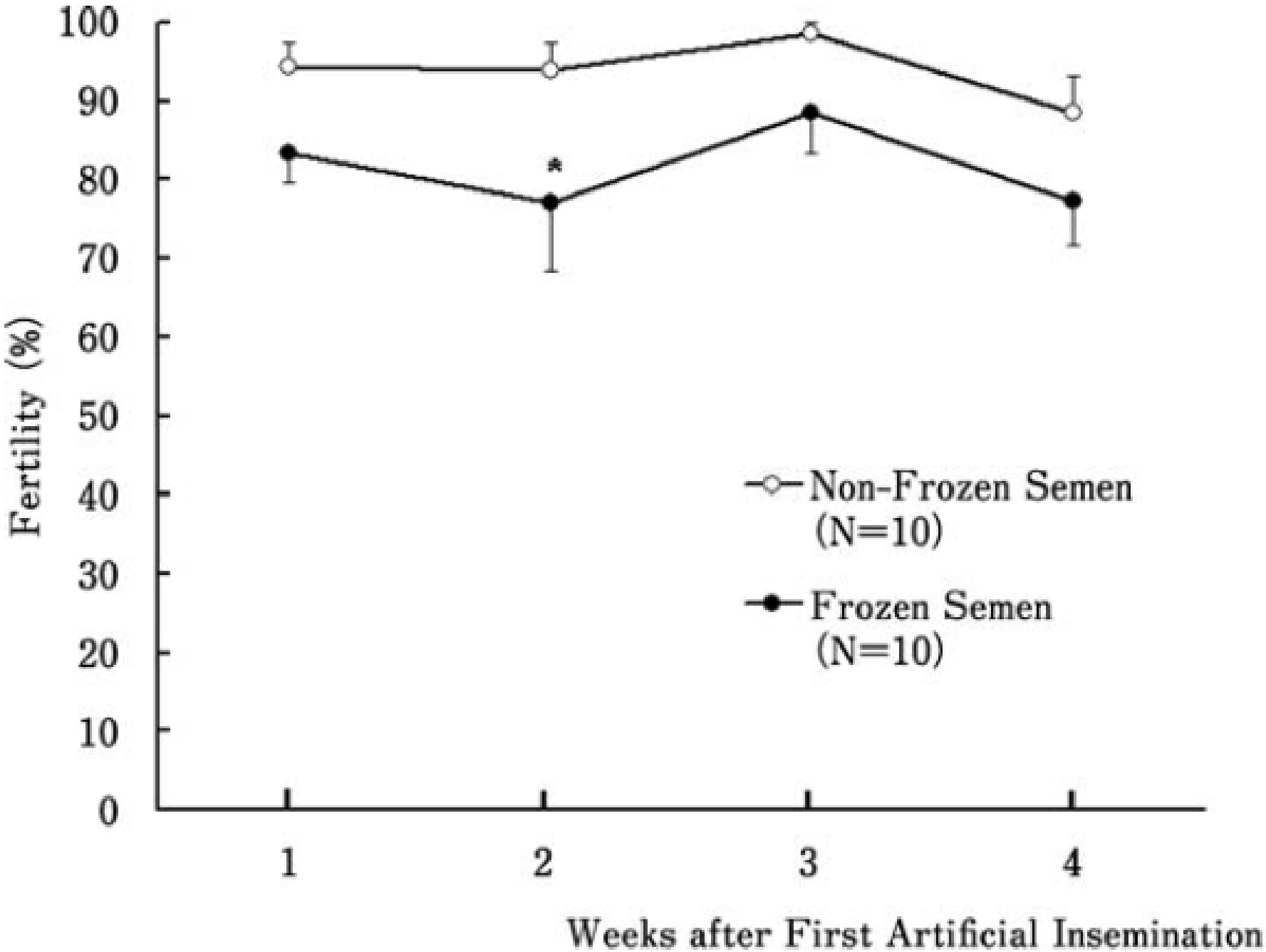
[1]DMA = dimethylacetamide; DMSO = dimethylsulfoxide.

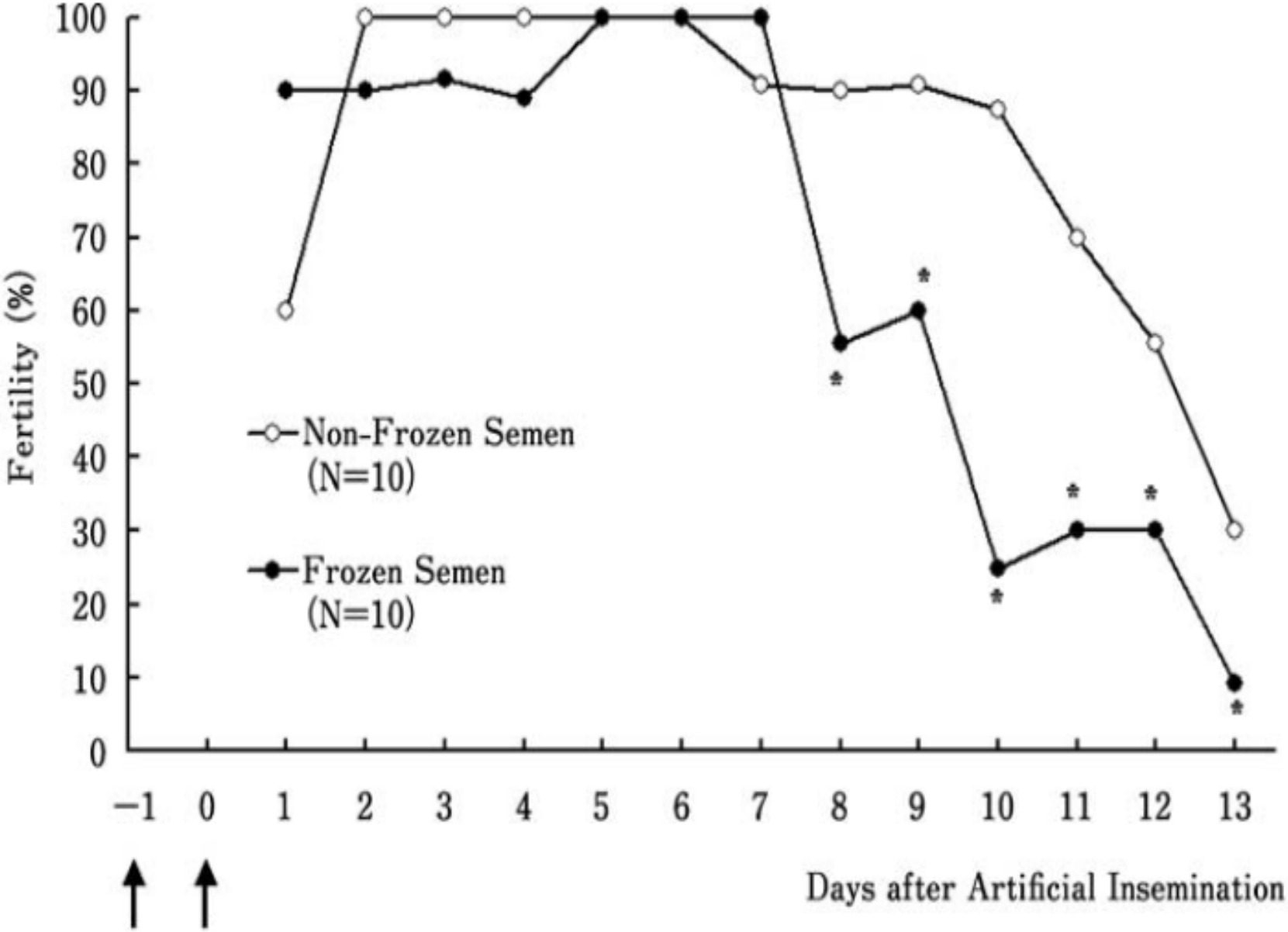
Individual and mean ± SE fertility rates obtained from fowl semen frozen with glycerol or dimethylacetamide (DMA) in diluents submitted to various temperature, equilibration, and packaging conditions

Treatment	Cryoprotectant	Temperature of chamber during cooling	Time of equilibration	Packaging	Fertility (n eggs) Successive artificial inseminations 1	2	3	4	5	Mean fertility (n eggs)
		(C)	(min)		(%)					
1	Glycerol	5	30	Straws	67.4 (132)	62.9 (132)	57.4 (127)	62.3 (130)	67.9 (131)	63.9 ± 1.9[b] (652)
2		5	1	Straws	36.2 (138)	62.3 (130)	56.8 (125)	61.4 (135)	52.5 (139)	53.7 ± 4.7[b] (667)
3	DMA	-6	1	Pellets	73.7 (118)	88.5 (131)	92.4 (133)	94 (134)	97 (136)	92.7 ± 4.1[a] (630)
4		5	1	Pellets	78.9 (109)	81.2 (133)	83 (124)	87 (131)	92.4 (132)	84.7 ± 5.3[a] (629)
5		5	1	Straws	25.9 (135)	42.5 (134)	27.5 (127)	22.3 (130)	15.4 (136)	26.7 ± 4.5[c] (662)
Control	Fresh undiluted semen				94 (167)		94.9 (197)		95.5 (112)	94.7 ± 0.4[a] (476)

[a-c]Means with no common superscript differ significantly ($P < 0.05$).

بين Sasaki وآخرون(2010) بان تجميد السائل المنوي لديكة سلالة Yakido (سلالة محلية يابانية) باستخدام نسبة 9 % من مادة N-methylacetamide وتخفيف السائل المنوي بنسبة 1:1 وتعبئة السائل المخفف بقصبات خاصة بحفظ السائل المنوي. ثم حفظت في النتروجين السائل مباشرة (-196 م) لمدة شهر, ثم جرى اذابة السائل المنوي بشكل تدريجي باستخدام الماء المثلج. ثم جرى التلقيح الاصطناعي بعد عملية الاذابة مباشرة وكانت النتيجة كما مبين:


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Fertility (%)
*
Non-Frozen Semen
(N=10)
Frozen Semen
(N=10)
1
2
3
4
Weeks after First Artificial Insemination


Fertility (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Non-Frozen Semen
(N=10)
Frozen Semen
(N=10)
−1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
Days after Artificial Insemination

تأثير نوع المادة الواقية ضد التجميد في الحركة الجماعية والفردية للنطف ، النسب المئوية للنطف الميتة والمشوهة وتشوهات الاكروسومات .

الصفات المدروسة	المادة الواقية ضد التجميد			
	كليسرول 11%	داي مثيل سلفوكسايد 4.5 %	داي مثيل فورم امايد 4.5 %	داي مثيل اسيت امايد 4.5 %
الحركة الجماعية للنطف (%)	B (1) 73.9 ± 7.8	C 41.6 ± 3.8	C 39.7 ± 6.1	A 86.7 ± 9.0
الحركة الفردية للنطف (%)	B 77.1 ± 3.6	C 44.8 ± 2.2	C 42.8 ± 7.7	A 89.9 ± 4.2
النسبة المئوية للنطف الميتة (%)	B 24.9 ± 1.8	C 45.7 ± 8.1	D 61.9 ± 3.6	A 18.0 ± 1.3
النسبة المئوية للنطف المشوهة (%)	B 28.6 ± 3.0	C 50.7 ± 6.9	D 69.8 ± 5.5	A 20.6 ± 2.7
النسبة المئوية لتشوهات الاكروسومات (%)	B 30.3 ± 6.7	C 41.7 ± 8.0	D 58.7 ± 6.1	A 22.9 ± 1.9

(1) القيم تمثل المتوسط ± الخطأ القياسي.

الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية بين المعاملات الاربعة عند مستوى معنوية (أ < 0.01).

الدراجي, 2011

تأثير نوع المادة الواقية ضد التجميد في نشاط انزيمات LDH و ALP و ACP في البلازما المنوية وفي نسب الاخصاب والفقس والهلاكات الجنينية .

الصفات المدروسة	المادة الواقية ضد التجميد			
	كليسرول	داي مثيل سلفوكسايد	داي مثيل فورم امايد	داي مثيل اسيت امايد
نشاط انزيم LDH (وحدة دولية / مل)	(1)B 1715.3±91.6	C 2013.9±101.3	D 2416.3±71.9	A 1644.3±83.0
نشاط انزيم ALP (وحدة كنك ارمسترونك)	B 81.9 ± 3.6	C 55.7 ± 1.9	D 21.6 ± 3.2	A 93.7 ± 2.6
نشاط انزيم ACP (وحدة كنك ارمسترونك)	B 8411.3±118.3	C 6103.2±111.0	D 5337.9±219.8	A 9870.9±125.6
نسبة الاخصاب (%)	D 20.3 ± 1.9	B 56.9 ± 4.8	C 27.9 ± 2.8	A 75.9 ± 6.9
نسبة الفقس (%)	D 40.8 ± 6.6	B 78.9 ± 6.3	C 59.2 ± 3.7	A 93.7 ± 8.7
نسبة الاجنة الهالكة (%)	D 59.2 ± 3.1	B 21.1 ± 3.2	C 40.8 ± 1.8	A 6.3 ± 1.0

(1) القيم تمثل المتوسط ± الخطأ القياسي.

الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية بين المعاملات الاربعة عند مستوى معنوية (أ< 0.01).

الدراجي, 2011

بين Donoghue وWishart (2000) بان اسباب انخفاض الخصوبة في الدجاج نتيجة التلقيح بسائل منوي مجمد اضافة الى اسباب تدهور الصفات النوعية والمورفولوجية للحيامن هو كمية السائل المنوي الملقح به وعدد مرات التلقيح ومسافة التلقيح داخل قناة بيض الاناث. وان في الغالب هذه الاسباب لا تذكر ولا يعمل بها وهي اسباب جوهرية لانخفاض نسبة الخصوبة اثناء التلقيح الاصطناعي, لذلك يجب عمل بحوث مستفيضة في هذا المجال.

نستنتج مما سبق بان تأثير التجميد في تركيب وايض النطف لحيامن الطيور يكمن في النقاط التالية:

1- الخلل الذي يصيب الحيامن خلال التجميد والاذابة ينعكس على القابلية الايضية للنطفة بسبب نضوح الانزيمات الى خارج النطفة (Quinn واخرون, 1966).

2- عمليات التجميد والاذابة تؤدي الى تجريد انزيم الاكروسين من فعاليته والذي يكون موجودا في منطقة الاكروسوم في راس النطفة (Lessly و Brown, 1974).

3- انخفاض حركة النطف وقابليتها الاخصابية نتيجة الاضرار التي تصيب تركيب النطفة خلال التجميد (Maeda و Terada, 1982).

4- انخفاض النشاط الايضي للنطف المجمدة والمسالة (Wishart و Polmer, 1985).

شكرا لإصغائكم