Research Paper Ref. No 2452

حفظ السائل المنوي بالتجميد باستخدام مخفف تريلديل ومخفف ترس لذكور غزال الريم العربي (غزال الرمال)

Semen Cryopreservation using Triladyl and Tris Diluents of the Arabian and Gazelle Males *(Gazella subgutturosa marica)*

محمد سعد العيسى[1]، أحمد راشد الحميدي[2]، صالح محمد عبد الحميد قنديل[2]،

Mohamed Said Al-Eissa, Ahmed Rashed Al-Hamidi, and Salih Mohamed Abdulhameed Kandeal

[1] الهيئة الوطنية لحماية الحياة الفطرية وإنمائها

[2] جامعة الملك سعود ، كلية العلوم قسم علم الحيوان

ص.ب 2455 الرياض 11451 المملكة العربية السعودية

E.mail: ahimaidi@ksu.edu.sa

المستخلص: هناك العديد من الثدييات من الحيوانات الفطرية المهددة بالانقراض نتيجة فقدانها لمواطنها الطبيعية أو لاختلال التنوع الإحيائي للمنطقة، ومن إحدى التقنيات المساعدة على التكاثر المستخدمة حاليا والتي تمثل حلا للحفاظ على الكائنات الحية المهددة بالانقراض وإكثارها هي عملية حفظ الأمشاج بتقنية حفظ وتجميد السائل المنوي Semen Cryopreservation. في هذا البحث تم جمع السائل المنوي من عشر ذكور من غزلان الريم العربي (غزال الرمال) بواسطة جهاز التنبية الكهربائي على مدار عام كامل. واستخدم الأسلوب الأكثر شيوعاً في حفظ السائل المنوي وهو التجميد بالنيتروجين السائل (-196°م). وتم استخدام بيئتين لتخفيف السائل المنوي، الأولى هي بيئة تجارية هي بيئة التريلديل (Triladyl) والثانية هي بيئة ترس (Tris) التي تم تحضيرها في المختبر. وعند مقارنة متوسط الحركة الفردية للنطف قبل التجميد مع الحركة الفردية بعد الإسالة من التجميد خلال أشهر العام وجد تأثر عدد كبير من النطف نتيجة التجميد، وقد كان مستوى التأثر مختلفاً حسب أشهر العام وكذلك وجد اختلاف عند مقارنة الحركة الفردية بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف التريليديل مع الحركة الفردية بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف ترس عند مستوى معنوية ($p<0.01$) وذلك بالنسبة لشهري أكتوبر ونوفمبر، ويستدل من هذا الفرق بأن متوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف تريليديل أعلى من متوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف ترس. ولذا، فان إستخدام مخفف التريلديل عند تجميد السائل المنوي لذكور غزلان الريم أعطى نتائج أفضل من تلك النتائج التى تم الحصول عليها باستخدام مخفف ترس.

كلمات مدخلية: *تقنية تجميد الحيوانات المنوية، غزال الريم العربي، بيئة ترس، بيئة التريليديل.*

Abstract: The Arabian Sand Gazelle Males (*Gazella subgutturosa marica)* is one of the endangered species in Saudi Arabia. The assessment of its reproductive efficiency and semen characters have not been deeply investigated. The present study focuses on this issue, and investigates proper methods of semen dilution and freezing. The study indicated the suitability of the electro-ejaculation as a method of semen collection. Freezing of the semen at -196°C in plastic straws (0.25ml) is the most common method for semen preservation. Two semen diluents were used; the first was a commercial diluents (Triladyl) and the other was prepared in the laboratory (Tris) diluents. When the average of individual motility before freezing was compared with that after thawing, it was found that a large number of spermatozoa was significantly ($P<0.01$) adversely affected by freezing. There was also significant difference ($P<0.01$) between individual post thawing motility of the Triladyl-diluted frozen semen and that of the Tris-diluted one during October and November. Therefore, the best results were

obtained when Triladyl was used for extending the Arabian Sand Gazelle semen using freezing by liquid nitrogen rather than Tris diluents. It is recommended that the use of captive population program with the cryopreservation of genetic resources bank would be suitable for the preservation and protection of the endangered species, such as the Arabian Sand Gazelle (Arabian Oryx).
Keywords:*Semen, cryopreservation, Arabian Sand Gazelle, Triladyl, Tris.*

المقدمة

هناك العديد من الثدييات المهددة بالانقراض أو على وشك الانقراض نتيجة فقدانها لمواطنها الطبيعية. وخلال العشرين سنة الماضية حظيت فكرة إنشاء بنوك الأصول الوراثية Genome Resource Banks، وأحيانا يطلق عليها حدائق الحيوان المجمدة Frozen Zoos، بالقبول القوي من قبل الكثير من الهيئات العالمية والمهتمين بهذا الشأن. إحدى الوسائل المساعدة على التكاثر المستخدمة في الوقت الحالي، والتي تمثل حلا مؤقتا للحفاظ ولإعادة الكائنات المهددة بالانقراض إلى موضعها الطبيعي، هي عمليات حفظ الأمشاج بتقنية التجميد Cryopreservation ومنها الحيوانات المنوية. وتعتبر طريقة القذف الكهربائي Electro ejaculation method من أنسب الطرق لجمع السائل المنوي من الغزلان، حيث وصفت هذه الطريقة لعدد من الغزلان كما أشار إلى ذلك Holt, *et al.* (1988;1996) و Cassinello, *et al.* (1998) و Garde, *et al.* (2003;1996).

من الكائنات الحية المهددة بالانقراض الغزلان العربية، حيث انقرض غزال العفري (الدوركاس السعودي) من الجزيرة العربية (Habibi, 1987). لقد عرف القليل عن بيولوجية وتاريخ نشوء الغزلان العربية وظل وضعها مجهولا حتى السنوات القليلة الماضية، وتفيد المعلومات المتوفرة عن هذه الحيوانات بأن أعدادها قد تناقصت بصوره ملحوظة خلال العقود القليلة (Harrison, 1968). وحيث أن النطف المقذوفة من الذكور خارج الجسم غير قادرة على العيش لفترة طويلة ما لم يضف إليها بعض المواد الكيميائية والحيوية، لذا يعتبر التوصل إلى استخدام المخفف المناسب وطريقة التبريد والتجميد للسائل المنوي لغزال الريم العربي من الدراسات ذات الأهمية العلمية التطبيقية لكونه من الحيوانات الفطرية المهددة بالانقراض وسوف يخدم عمليه إنشاء وحدة مستقبلية لبنك الأصول الوراثية للحيوانات المهددة بالانقراض في المملكة. وتهدف هذه الدراسة إلى:

1. جمع السائل المنوي لغزلان الريم العربي باستخدام الطريقة المناسبة للجمع (جهاز القذف الكهربائي).
2. التوصل إلى اختيار المخفف المناسب لعمليات التخفيف وتجميد للسائل المنوي ثم تحديد نسبه التخفيف الملائمة ومقارنته مع مخفف جاهز التحضير (تجاريا). وحفظ السائل المنوي بالتجميد في النتروجين السائل عند (196°م) لفترات مختلفة ثم إعادة إسالة السائل المنوي المجمد وتقييم حيوية الحيوانات المنوية بعد التجميد.
3. دراسة تركيب الحيوان المنوي باستخدام عدد من الصبغات المختلفة واستخدام المجهر الفلوروسنتي لمعرفة مدى تكامل الاكروسوم بعد التجميد.

المواد وطُرق العمل

حيوانات التجربة

لقد تمت الدراسة في مركز الملك خالد لأبحاث الحياة الفطرية King Khalid Wildlife Research Center (KKWRC) بمنطقة الثمامة شمال الرياض الواقعة بين خط طول 24°N وخط عرض 46°E، التابع للهيئة الوطنية لحماية الحياة الفطرية وإنمائها، وقد استخدم في التجربة عشرة ذكور ناضجة من غزلان الريم العربي (غزال الرمال) (*Gazella subguttrousa marica*) تتراوح أعمارها ما بين السنتين إلى ثلاث سنوات ومتوسط وزن قدره 17 كجم. جميع الغزلان محصنة ضد الأمراض وذات صحة جيدة، ويتم تغذيتها جماعيا على العلف الأخضر والجاف والعلائق الجاهزة dry pellets والماء بكميات كافية.

طريقة جمع السائل المنوي من الغزلان وتقييمه

تم جمع عينة من السائل المنوي شهريا من كل ذكر (10 ذكور) لمدة أثنى عشر شهراً باستخدام طريقة القذف الكهربائي. وتم تقييم السائل المنوي بأسرع وقت ممكن بعد الجمع مباشرة والمحافظة على العينة في حمام مائي عند درجة حرارة 37°م ، وشمل التقييم قياس تركيز النطف (Sperm concentration) باستخدام جهاز العد للحيوانات المنوية (Photometer sperma cue) من شركة Minitube الألمانية، حيث تم قياس كثافة النطف باستخدام عينة غير مخففة من السائل المنوي حسب الطريقة التي وصفها (Ashok and Said, 2004). كما تم تقدير حركة النطف الجماعية (Mass motility) تحت المجهر وهي عبارة عن الحركة التموجية للنطف نتيجة للإلتحام القوى للعديد من النطف في إتجاه واحد في قطرة من السائل المنوي حسب الطريقة التي وصفها السعدي (1989)، وفيها يتم تقدير النسبة المئوية للحركة وتعطى درجات من صفر إلى 5، فإذا كانت لا توجد حركه تعطى التقدير صفر، وإذا كانت هناك حركة

لبعض النطف (نسبة 10- 20%) تعطى التقدير 1، وإذا كانت هناك حركة بسيطة للنطف (30-40) تعطى التقدير 2، وإذا كان هناك ظهور حركة تموجية بأقواس شاحبة (50- 60%) تعطى التقدير 3، وإذا كانت هناك حركة تموجية بأقواس بنية (70- 80%) تعطى التقدير 4، وإذا كان هناك حركة تموجية شديدة بأقواس داكنة (نسبة 90- 100%) تعطى التقدير 5. كما تم تقدير الحركة الفردية Sperm motility التي تعبر عن سرعة انتقال النطفة الواحدة بنفس المقياس للحركة الجماعية نقلا عن السعدي (1989) من صفر إلى 5 (صفر إذا كانت جميع النطف لا تتحرك و5 إذا كانت 90- 100% جميع النطف تتحرك، والبقية بينها). كما تم فحص شكل النطف Sperm morphology ونسبة الحيوانات المنوية الحية والميتة. وقد تمت دراسة الحيوانات المنوية للغزال بالفحص بالمجهر الضوئي العادي باستخدام قوى تكبير مختلفة (40 - 100×) وباستخدام صبغة الايوسين Eosin) (Madan and Waston, 1994، وكذلك الصبغة الفلوروسينتية، Acridine orange (AO)-ethidium bromid (EB) الأسترالية Fluro Quench أثناء الفحص بالمجهر الفلوروسيني، وهي من الطرق الحديثة لتقييم سلامة الغلاف البلازمي وسلامة أكروسوم الحيوان المنوي، وهي عبارة عن صبغة مزدوجة حيث يمكن تمييز النطف السليمة بوميض الضوء الأخضر نتيجة امتصاص الضوء لـ (AO)، أما الحيوانات المنوية الميتة أو ذات الخلل فتعطي الضوء الأحمر نتيجة امتصاص لون (EB). وتم تقدير تركيز النطف Sperm concentration باستخدام جهاز Photometer sperma cue من شركة Minitub الألمانية، حيث يتم قياس كثافة النطف باستخدام عينة غير مخففة من السائل المنوي (Ashok and Said, 2004).

المخففات المستخدمة لعملية التجميد

استخدمت في هذه الدراسة نوعين من المخففات، الأول مخفف الترليديل (Triladyl) من شركة Minitub الألمانية، وهو مخفف مسبق التحضير (Garde, *et al.* 2003)، والمخفف الثاني هو ما يطلق عليه بمحاليل ترس (Tris-base)، حيث تم تحضيره معمليا (Asher, *et al.* 2000؛ العيسى 1427هـ). ويبين جدول 1 مكونات كل منهما.

تخفيف السائل المنوي

خفف السائل المنوي إلى معدلات تتناسب مع تركيز النطف في القذفة الواحدة ونسبة الحيوانات المنوية المتحركة وعدد النطف المرغوب توفرها في جرعة التلقيح (القشة)، ويتم حساب معدل التخفيف كما أشار إلى ذلك Polge, *et al.* (1949) و Holt, *et al.* (2000 a, b).

جدول 1. المكونات الكيميائية للمخفف التجاري الترليديل ومخفف ترس.

Components	Triladyl	Tris
Egg Yolk % (v/v)	20	10
Tris[a] % (w/v)	?[b]	3.63
Fructose[b] % (w/v)	?[b]	0.50
Citric acid[b] % (w/v)	?[b]	1.99
Glycerol % (v/v)	6	5
pH	7.00	7.00
Osmolality[c] (mosm/kg)	340	450

[a] *N-Tris (Hydroxymethyl) methyl-2-amino ethane sulphoric acid,* [b] *The exact concentration of these components is unknown,* [c] *The osmoality was measured in the absence of glycerol. (Triladyl, a commercially available extender, Minitub, Tiefenbach, Germany).*

تجميد السائل المنوي وحفظه على درجة حرارة 196° م

عند تجميد السائل المنوي تم اختيار عينات لا تقل فيها نسبة الحركة التقدمية عن 60%، وقد استخدم جهاز التجميد الآلي Freeze control. CL-8000 لتجميد عينات السائل المنوي في هذه الدراسة (Purdy. 2005)، ويترك السائل المنوي المخفف لمدة ساعتين في أجل اتزانه وتأقلم النطف مع بيئة المخفف قبل التجميد، ثم يعبأ السائل المنوي المضاف إليه الجلسرول بعد فترة التوازن في أنابيب بلاستيكية Straws (قشات بلاستيكية) ذات حجم 0.25 مليمتر ويجرى لها عمليات التجميد حسب البرنامج المناسب (رقم 7) حتى وصول درجه حرارتها إلى -125°م، ثم تغمر القشات المجمدة مباشرة في النيتروجين السائل (- 196°م).

إسالة محتويات القشات

تم استخدم حمام مائي درجة حرارته 37°م ووضعت فيه القشات المحتوية على السائل المنوي المجمد لمدة 30 ثانية (Garde. *et al.* 2003)

النتائج

أثر التجميد على الحركة الفردية للنطف باستخدام مخفف الترايليديل

عند مقارنة متوسط الحركة الفردية للنطف قبل التجميد مع الحركة الفردية بعد الإسالة من التجميد خلال أشهر العام وجد تأثر عدد كبير من النطف نتيجة التجميد، حيث انخفض المتوسط العام للحركة الفردية قبل التجميد من 65.45% إلى متوسط قدره 35.8% بعد إسالة السائل المنوي المجمد بمخفف الترايليديل. وقد تراوحت نسب الاختلاف في الحركة الفردية قبل وبعد التجميد ما بين 43%-26. وقد كان

مستوى التأثر مختلفاً حسب أشهر العام، كما يظهر في جدول 2، الذي يوضح الفرق بين متوسط الحركة الفردية للنطف كل شهر قبل التجميد وبعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف الترايليديل Post-thawing triladyl.

ويلاحظ من الجدول 2 وجود فرق معنوي وذو دلالة إحصائية بين متوسطي صفة الحركة الفردية Individual motility قبل التجميد والحركة بعد الإسالة من التجميد Post thawing عند مستوى معنوي ($p<0.0001$)، بالنسبة للأشهر يناير، فبراير، إبريل، أكتوبر، نوفمبر، وديسمبر، مقارنة بباقي أشهر السنة أو فيما بينها. ويدل هذا الفرق على أن متوسط الحركة الفردية بعد التجميد كان أقل معنويا من متوسط الحركة قبل التجميد. كما يوجد فرق معنوي وذو دلالة إحصائية بين متوسطي صفة الحركة الفردية قبل التجميد والحركة بعد الإسالة من التجميد عند مستوى معنوي ($p<0.05$)، بالنسبة للأشهر مارس، مايو، يونيو، وسبتمبر، ويدل هذا الفرق على أن متوسط الحركة الفردية بعد التجميد أقل معنويا من متوسط الحركة قبل التجميد.

ولا يوجد فرق معنوي بين متوسطي صفة الحركة الفردية قبل التجميد والحركة بعد الإسالة من التجميد بالنسبة لشهر يوليو. وعند مقارنة نسبة الحركة الفردية بعد الإسالة بباقي صفات السائل المنوي كنوع من الارتباط نجد أنها معنوية عند مستوى ($p<0.05$)، بينما الحركة الفردية قبل التجميد كانت معنوية عند مستوى ($p<0.001$).

أثر التجميد على الحركة الفردية للنطف باستخدام مخفف ترس (Tris-base)

وجد من فحص النطف بعد تجميدها باستخدام المخفف ترس، أن جزءاً كبيراً منها لحق به ضرر نتيجة التجميد، مما أدى إلى انخفاض نسبة الحركة الفردية بعد التجميد، فقد كان المتوسط العام للحركة الفردية قبل التجميد 65.45% وانخفض إلى متوسط قدره 25.8% بعد إسالة السائل المنوي المجمد بمخفف ترس. وكان مستوى التأثر مختلفاً حسب أشهر العام كما يتضح من جدول 3 الذي يقارن نسبة متوسطي الحركة الفردية قبل التجميد وبعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف.

جدول 2. نتائج اختبار الفرق بين متوسطي الحركة الفردية قبل التجميد وبعد الإسالة باستخدام مخفف الترايليديل Post thawing على مدار العام.

Month	Diff.[a]	Std. Error Mean(±)	95% Confidence interval		t	df	Sig.
Jan	41.11	2.606	35.102	47.120	15.777	8	0.0001**
Feb	43.33	2.108	37.914	48.753	20.555	5	0.0001**
Mar	40.00	10.801	5.626	74.374	3.703	3	0.034*
Apr	37.77	2.778	31.372	44.183	13.600	8	0.0001**
May	31.25	6.575	10.326	52.174	4.753	3	0.018*
Jun	32.50	2.500	0.734	64.266	13.000	1	0.049*
Jul	30.00	10.000	-13.027	73.027	3.000	2	0.095
Aug[b]	-	-	-	-	-	-	-
Sep	26.66	3.333	12.324	41.009	8.000	2	0.015*
Oct	31.42	4.592	20.192	42.665	6.844	6	0.0001**
Nov	30.00	1.890	25.531	34.469	15.875	7	0.0001**
Dec	35.71	3.689	26.689	44.740	9.682	6	0.0001**

* الفرق معنوي عند مستوى معنوية $p< 0.05$-0.01 . ** الفرق معنوي عند مستوى معنوية $p< 0.0001$.

(a) الاختلاف بين متوسطي الحركة الفردية للحيوانات المنوية قبل التجميد وبعد الإسالة. (b) انظراً لقلة كمية السائل المنوي أو عدمها خلال شهر اغسطس لم نتمكن من تجميده.

جدول 3. نتائج اختبار الفرق بين متوسطي الحركة الفردية لكل شهر قبل التجميد وبعد الإسالة باستخدام مخفف ترس.

Month	Diff.[a]	Std. Error Mean (±)	95% Confidence interval		t	df	Sig.
Jan	47.78	3.239	40.308	55.248	14.749	8	0.0001**
Feb	48.00	2.000	42.447	53.553	24.000	4	0.0001**
Mar	43.33	6.667	14.649	72.018	6.500	2	0.023*
Apr	48.89	4.231	39.132	58.646	11.555	8	0.0001**
May	43.75	5.543	26.108	61.392	7.892	3	0.004**
Sep	36.67	6.667	7.982	65.351	5.500	2	0.032*
Oct	41.67	3.073	33.767	49.567	13.558	5	0.0001**
Nov	41.25	4.407	30.830	51.670	9.361	7	0.0001**
Dec	44.00	5.099	29.843	58.157	8.629	4	0.001**

* الفرق معنوي عند مستوى معنوية $p< 0.05$. ** الفرق معنوي عند مستوى معنوية $p< 0.0001$.

(a) الاختلاف بين متوسطي الحركة الفردية للحيوانات المنوية قبل التجميد وبعد الإسالة.

ويلاحظ من الجدول 3 وجود فرق معنوي بين متوسط الحركة الفردية قبل التجميد ومتوسط الحركة بعد التجميد باستخدام مخفف ترس عند مستوى معنوي ($p<0.01$)، وذلك بالنسبة لأشهر يناير، فبراير، إبريل، مايو، أكتوبر، نوفمبر، وديسمبر، ويستدل من هذا الفرق بأن متوسط الحركة الفردية قبل التجميد أكبر من متوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف ترس. كما يوجد فرق معنوي عند مستوى معنوي ($p<0.05$) بين متوسط الحركة الفردية قبل التجميد ومتوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف ترس، وذلك بالنسبة لشهري مارس وديسمبر، ويدل هذا الفرق على أن متوسط الحركة الفردية قبل التجميد أكبر من متوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف ترس.

ونظراً لعدم توافر عدد كافٍ من المشاهدات التي تمكن من إجراء اختبار معنوية الفرق بين المتوسطين خلال شهري يونيو ويوليو، فقد تم حساب متوسط الحركة الفردية قبل التجميد، ومتوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف ترس من البيانات المتاحة. ووجد أن متوسط الحركة الفردية قبل التجميد في شهر يونيو بلغ حوالي 60%، وفي شهر يوليو كان المتوسط حوالي 50%، بينما كان متوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد في شهر يونيو حوالي 10%، وفي شهر يوليو كان المتوسط حوالي 20%. ويستدل من ذلك على أن متوسط الحركة قبل التجميد أعلى منه للحركية بعد الإسالة من التجميد بالنسبة لهذين الشهرين.

وعند حساب معامل الارتباط Correlation Coefficient (r) لمتوسط صفات السائل المنوي بما فيها نسبة الحركة الفردية بعد الإسالة من التجميد Post-thawing خلال أشهر العام، طبقاً لمعامل الارتباط الخاص بـ Spearman's rho، وجد أن معامل الارتباط موجب القيمة بين جميع الصفات وعند مقارنة الصفات نجد أن معامل الارتباط للحركة بعد الإسالة من التجميد كانت ذات معنوية عالية عند $p<0.001$ بالنسبة للحركة الفردية قبل التجميد باستخدام مخفف الترايليديل وبالنسبة لمتوسط نسبة الحي. وكانت ذات معنوية عند مستوى $p<0.05$ بالنسبة لحجم السائل المنوي والتركيز كما يتضح من جدول 4.

ويبين جدول 5 مقارنة الحركة الفردية بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف الترايليديل، والتي كان متوسطها على مدار العام 35.8%، مع الحركة الفردية بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف ترس، التي كان متوسطها على مدار العام 25.8% لمعرفة أفضلهما على مستوى شهور السنه.

جدول 4. معامل الارتباط بين صفات السائل المنوي باستخدام مخفف الترايليديل في غزلان الريم العربي (غزال الرمال) علي مدار العام.

الصفات	الحجم	التركيز	الحركة الجماعية	الحركة الفردية	الحركة بعد الإسالة من التجميد	النطف الحية ٪
الحجم		**0.425	**0.331	**0.499	*0.301	**0.538
التركيز			**0.413	**0.500	*0.283	**0.477
الحركة الجماعية				**0.760	0.223	**0.708
الحركة الفردية					**0.599	**0.821
الحركة بعد الإسالة من التجميد						**0.454
النطف الحية ٪						

* الفرق معنوي عند مستوى معنوية $p<0.05$ ، ** الفرق معنوي عند مستوى معنوية $p<0.01$.

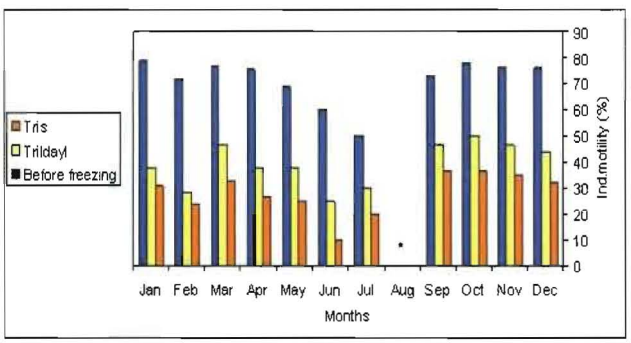
جدول 5. مقارنة بين متوسطي الحركة الفردية بعد التجميد باستخدام مخفف الترايليديل ومخفف الترس خلال شهور العام.

Month	(Diff.(a	Std. Error Mean	t	df	sig
Jan	6.66	2.357	2.828	8	*0.022
Feb	4.00	4.000	1.000	4	0.374
Mar	13.33	3.333	4.000	2	0.057
Apr	11.11	3.514	3.162	8	*0.013
May	12.50	2.500	5.000	3	*0.015
Sep	10.00	5.774	1.732	2	0.225
Oct	13.33	2.108	6.325	5	**0.001
Nov	11.25	2.950	3.813	7	**0.007
Dec	12.00	3.742	3.207	4	*0.033

* الفرق معنوي عند مستوى معنوية $p<0.05$ ** الفرق معنوي عند مستوى معنوية $p<0.0001$.

(a) مستوى قيمة الاختلاف بين الحركة الفردية بعد التجميد لكلا المخففين.

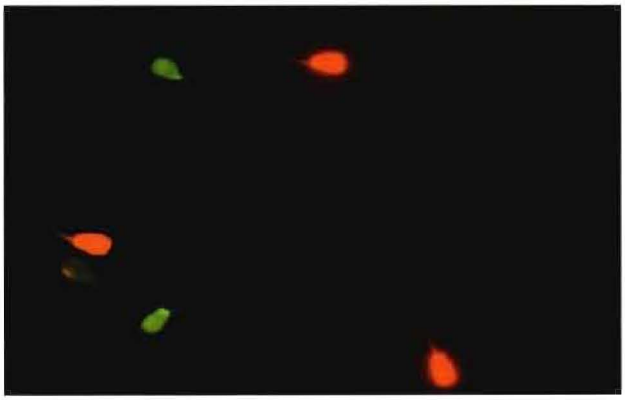
ويلاحظ من الجدول 5 وجود فرق معنوي ($p<0.01$) بين متوسط الحركة الفردية بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف الترايلديل، ومتوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف ترس، وذلك بالنسبة لشهري أكتوبر ونوفمبر، وأن هذا الفرق يستدل منه على أن متوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف الترايلديل أعلى من متوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف ترس، في حين يوجد فرق معنوي ($p<0.05$) بين متوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف الترايلديل، ومتوسط الحركة بعد التجميد باستخدام مخفف ترس وذلك بالنسبة لأشهر يناير، إبريل، مايو، وديسمبر، وبأن هذا الفرق يدل على أن متوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف الترايلديل أعلى من متوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف ترس في هذه الشهور. كما يلاحظ أن الفرق بين متوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف الترايلديل، ومتوسط الحركة بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف ترس غير معنوي بالنسبة للأشهر فبراير، مارس، وسبتمبر، ويدل هذا على أن المتوسطات متقاربة خلال هذه الأشهر. ويوضح شكل 1 اختلاف نسبة الحركة الفردية قبل التجميد وبعد التجميد للنطف بمحلول الترايلديل ومحلول ترس خلال أشهر السنة.



★ لم يتم إدراج الحركة قبل وبعد الإسالة من التجميد نظرا لانخفاض نسبة الحركة وحجم السائل المنوي خلال شهر أغسطس.

شكل 1. تأثير شهور السنة على نسب الحركة الفردية قبل التجميد وبعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف تريلديل ومخفف ترس.

تم خلال الدراسة ايضا تقييم سلامة القمة الطرفية (الأكروسوم) للنطف باستخدام صبغة (Acridine orange & Ethidium Bromide) وقد قسمت النطف تبعاً للفحص إلى حيوانات منوية سليمة القمة الطرفية Intact Acrosome وحيوانات منوية غير سليمة Damaged or Missing Acrosome. وقد استخدمت الصبغة الفلورسنتية عند قوة تكبير مختلفة وقد تجاوزت نسبة التشوهات في القمة الطرفية 50% بعد التجميد. ويوضح شكل 2 بعضاً من حالات فحص القمة الطرفية للحيوان المنوي باستخدام الصبغة الفلوروسنتية والمجهر الفلوروسنتي، حيث يتم إسالة السائل المنوي المجمد ثم يعد 200 نطفه لكل شريحة يتم فحصها.



شكل 2. بعضاً من حالات فحص القمة الطرفية للحيوان المنوي (الاكروسوم) باستخدام الصبغة الفلورسنتية *(الحيوان المنوي المصبوغ باللون الأخضر حيوان منوي حي، وباللون الأحمر حيوان منوي ميت).*

المناقشة

للمحافظة على أنواع معينة من الحيوانات المهددة بالانقراض فإن مجال الإكثار تحت الأسر Captive Breeding يمثل المجال الأفضل لتجنب الانقراض مع تحاشي ما يعرف التربية الداخلية Inbreeding بالتكاثر بين أفراد المجموعة الواحدة لنوع واحد في القطيع الواحد. ويعتبر مجال تجميد السائل المنوي والتلقيح الاصطناعي من الوسائل المساعدة في تقنيات التكاثر (ART) وتنطبق هذه التقنيات على مجال التكاثر في الغزلان حسب ما ذكره Holt، (1996) *et al.*، حيث أوضحوا جدوى التلقيح الاصطناعي وصعوبة تجميد السائل المنوي وصعوبة إيجاد نظام تجميد معين لعدد من الغزلان من ضمنها غزال الداما. وبسبب محدودية توفر دراسات سابقة عن فسيولوجيا تكاثر الغزلان بوجه عام وطريقة تجميد السائل المنوي لها أو إتباع نظام معين للتلقيح الاصطناعي حسب ما أشار إلى ذلك كل من Garland (1989 و Holt، *et al.* (1988 و Boever، *et al.* (1980)، فإن إتباع طريقة معينة لتجميد السائل المنوي للحيوانات البرية أو ذوات الحافر شبه الأليفة Semi-domesticated ungulates وكذلك بعض أنواع المجترات، قد يكون ذو تأثير إيجابي لفهم العوامل المؤثرة في طريقة الجمع والتخفيف والتجميد. بعد تجميد السائل المنوي بوجه عام لجميع الكائنات فإن جزءاً من حيوية السائل المنوي بما فيها الحركة ونسبة الحي تنخفض نتيجة الضرر الذي يلحق بالنطف نتيجة التجميد سواء من حدوث صدمة البرودة أو تكون البلورات الثلجية داخل خلايا الحيوانات المنوية، وتنخفض نسبة الحركة الفردية بعد الإسالة من التجميد وتبقى نسبة معينة تحدد مدى صلاحية السائل

المنوي المجمد للاستخدام من عدمه، وكذلك يلحق ضرر بشكل النطف غالباً في منطقة الذيل يؤدي إلى انثناء أو التفاف في منطقة الذيل bent folded tail وأحياناً تشوهات في منطقة قمة الرأس Acrosome كما أشار إلى ذلك Hishinuma, *et al.* (2003) عن انخفاض نسبة الحركة لنطف ظبي السيكا Sika deer مع استمرار عملية التبريد وعدم تأثر نسبة الحي بشكل كبير على مدار سبعة أيام من التبريد.

وبالنسبة لتجميد النطف لغزال الريم العربي وجد أن حركتها تقل نتيجة الحفظ بالتجميد، ويلاحظ انخفاض متوسط حركتها خلال فترة الدراسة من حركية فردية قدرها 65.55±6.4% قبل التجميد إلى حركية فردية قدرها 35.8±4% بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف الترليديل و 25.8±3.2 باستخدام مخفف الترس. وفي دراسة مشابهة قام بها Garde, *et al.* (2003) على ثلاثة أنواع من الغزلان باستخدام عدة أنواع من المخففات، وجد أن الحركة انخفضت لنطف غزال كافيري من 81.1±2% قبل التجميد إلى 27.7±7.1% بعد الإسالة من التجميد باستخدام مخفف الترليديل، وانخفضت إلى نسبة 34.7±8.4% بعد التجميد باستخدام مخفف Tes-Tris-Yolk (TEST)، أما نسبة الحي فانخفضت من 72.2±6.8% قبل التجميد إلى 37.7±3.9% بعد التجميد باستخدام مخفف الترليديل و 34.1±4.5% بعد التجميد باستخدام مخفف (TEST). أما غزال *G. dama* فكانت الحركة قبل التجميد 81.5±4.0% وانخفضت بعد التجميد إلى 17.3±3.8% باستخدام مخفف الترليديل وإلى 43.5±6.0% باستخدام مخفف (TEST)، وكانت نسبة الحي 79.1±2.8% قبل التجميد وانخفضت إلى 25.7±3.3% و 27.9±4.8% باستخدام نفس المخففين، على التوالي، أما غزال *G. dorcas* فكانت الحركة قبل التجميد 78.0±3.3% وانخفضت بعد التجميد إلى 55.5±8.5% و 54.0±2.5% باستخدام مخفف الترليديل و(TEST)، على التوالي، ونسبة الحي كانت 34.1±4.5% قبل التجميد وانخفضت إلى 57.5±4.1% و 62.8±6.8% باستخدام نفس المخففين، على التوالي.

ومما سبق يلاحظ أنه لا يوجد مخفف معين يوصي به كمخفف مثالي لنوع معين من الكائنات، فنسبة نجاح التجميد وعودة الحركة والحيوية إلى النطف بعد التجميد تعتمد على عدة عوامل متداخلة منها طبيعة النطف وقدرتها على مقاومة الآثار الضارة لعملية التجميد ونسبة المواد الداخلة في تركيب المخفف كالجلسرول وصفار البيض ومدى تداخل مواد المخفف مع بعضها البعض ونظام التبريد المتبع وتعتمد زيادة نسبة النجاح على تكرار التجارب لأكثر من مخفف للوصول إلى التراكيز المثالية الداخلة في تركيب المخفف (Garde, *et al.* 2003).

يتضح من الدراسة الحالية أن استخدام مخفف الترايلديل أعطى نتائج أفضل مقارنة باستخدام مخفف الترس بالنسبة لحركة وحيوية الحيوانات المنوية بعد عمليه الإسالة، وقد يرجع ذلك إلى أن مخفف الترايلديل جاهز الصنع ويحتوي على مكونات غير معروفة النسب تحتفظ الشركة المنتجة لهذا المخفف بتفاصيل تراكيزها. ولذا قد يكون هذا المخفف هو الأنسب عند عمليه التخفيف والتجميد لحفظ السائل المنوي لذكور غزلان الريم باستخدام النيتروجين السائل. ومما سبق نجد أن التقنيات الحيوية للتكاثر Reproductive biotechnologies للحفاظ على أنواع الثدييات المهددة بالانقراض ومنها الغزلان محدودة بعدة عوامل، حيث أن إنتاج أجنة أو ذرية من هذه الأنواع يعتمد بدرجة كبيرة على فهم فسيولوجيا تكاثر هذه الأنواع، ولذا نجد في الأنواع المدروسة من الكائنات المهددة بالانقراض أن استخدام التقنيات المساعدة للتكاثر (ART) مطورة أو معدلة من تلك الطرق المستخدمة للأنواع المحلية أو الأليفة. ومما يزيد الأمر تعقيداً حساسية الكائنات البرية للضغوط والتعامل معها مقارنة بالحيوانات الأليفة بالإضافة إلى ضرورة تعديل المواد والأدوات المستخدمة للكائنات البرية للتعامل معها في الحقل. وعلى مستوى العالم فإن هناك أنواع مهددة بالانقراض، بغض النظر عن نوعها وهناك كائنات محلية أو أليفة قد تخضع لبرامج تكاثر أو حماية معينة. ولذا، فإن نظام الإدارة الأفضل يتحقق عن طريق الإكثار تحت الأسر Captive population ومتزامناً مع برنامج آخر هو إنشاء بنوك كنواة لحفظ الأصول الوراثية Cryopreservation of genetic resources.

شكر وتقدير

نتقدم بالشكر والعرفان للهيئة الوطنية لحماية الحياة الفطرية وإنمائها، ولإدارة مركز الملك خالد لأبحاث الحياة الفطرية King Khalid Wildlife Research Center (KKWRC)) بمنطقة الثمامة شمال الرياض التابع للهيئة الوطنية لحماية الحياة الفطرية وإنمائها على إتاحة الفرصة لعمل البحث وتزويدنا بحيوانات التجربة ومساعدتنا على إجراء البحث. كما نتقدم بالشكر الجزيل لمركز أبحاث كلية العلوم وكلية الدراسات العليا بجامعة الملك سعود، وكذلك مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم ولتقنية للمساعدة في تمويل البحث، سائلين المولى العلي القدير أن يوفق المسئولين على دعم عجلة البحث العلمي والإستفادة من نتائج هذا البحث ومجال تطبيقاته.

Deer (Cervus Nippon) Spermatozoa from Epididymides Stored at 4° C. *Theriogenology* **59** (3-4): 813-820.

Holt, WV, Abaigar, T, and **Jabbour, H** (1996) Oestrus Synchronization, Semen Preservation and Artificial Insemination in the Mohor Gazelle (*Gazella dama mhorr*) for the Establishment of Genome Resource Bank Programme. *Reproduction, Fertility and De*velopment, **8** (8)**:** 1215-1222.

Holt, WV (2000a) Basic Aspects of Frozen Storage of Semen. *Animal Reproduction Science* **62** (1- 2): 3-22.

Holt, WV (2000b) Fundamental Aspects of Sperm Cryobiology: the Importance of Species and Individual Differences. *Theriogenology* **53** (1)**:** 47-58.

Holt, WV, Moore, HD, North RD, Hartman, TD, and Hodges, JK (1988) **Hormonal** and Behavioural Detection of Oestrus in Blackbuck, Antilope Cervicapra, and Successful Artificial Insemination with Fresh and Frozen Semen. *Journal of Reproduction and Fertility* **82:** 717-725.

Garland, P (1989) Artificial Insemination of Scimitar-horned Oryx (*Oryx dammah*). *Bull. Zoo Management* **27** (1): 29-30.

Madan, K, Tamuli, and **Watson, P** (1994) Use of Simple Staining Technique to Distinguish Acrosomal Changes in the Live Sperm Sub-population. *Animal Reproduction Science* **35** (3-4): 247-254.

Polge, C, Smith, AU, and **Parkes, AS** (1949) Revival of Spermatozoa after Verification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature.* **164:** 666.

Purdy PH *(2005)* A review on Goat Sperm Cryopreservation. *Small RuminantResearch.* **63:** 215-225.

Ref. No (2452
Rec. 05/ 09/ 2007
In- revised form 23/ 11/ 2007

المراجع باللغة العربية

السعدى، حسين عبدالكريم (1989) *التناسل الإصطناعي*، بيت الحكمة، جامعة بغداد، العراق.

العيسى، محمد سعد (1427هـ) *تقدير الكفاءة التناسلية لذكور غزال الريم العربي (غزال الرمال) وحفظ السائل المنوي بالتجميد*، رسالة دكتوراة غير منشورة ، قسم علم الحيوان، كلية العلوم، جامعة الملك سعود، الرياض، المملكة العربية السعودية .

المراجع باللغة الإنجليزية

Asher, GW, Berg, DK, and **Evans, G** (2000) Storage of Semen and Artificial Insemination in Deer. *Animal Reproduction Science Review* **62** (1-3): 195-211.

Ashok, A, and **Said T** (2004) Sperm Chromatin Assessment. Gardner DK. *In: Textbook of Assisted Reproductive Techniques: laboratory and Clinical Perspectives.* Taylor & Francis, Philadelphia, USA.

Boever, J, Knox, D, Merilan, C, and **Read, B** (1980) Estrus Induction and Artificial Insemination with Successful Pregnancy in Speke's Gazelle. Proc. 9th Int. Congr. *Anim Reprod. Artif. Insem* 2: 265-269.

Cassinello, J, Abaigar, T, Gomendio, M, and **Roldan, ERS** (1998) Characteristics of the Semen of three Endangered Species of Gazelles (*Gazelle dama mhorr*, *Gazelle dorcas neglecta* and *Gazelle cuvieri). Journal of Reproduction and Fertility* **113** (1): 35-45.

Garde J, Soler, A J, Cassinello J, Crespo C, MaloAF, Espeso G, Gomendio M, and **Roldan E RS** (2003) Sperm Cryopreservation in Three Species of Endangered Gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorr*, and *G. dorcas neglecta*). *Biology of Reproduction* **69** (2)**:** 602-611.

Habibi, K (1987) *Second Quarter Report,* King Khaled Wildlife Research Center. National Commission for Wildlife Conservation and Development, Riyad, Kingdom of Saudi Arabia.

Harrison, DL (1968) *Mammals of Arabia, vol. II.* Ernest Benn, London, UK.

Hishinuma, M, Suzuki, K, and **Sekine, J** (2003) Recovery and Cryopreservation of Sika