مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2016) المجلد (32) ــ العدد 1 ــ الصفحات: 155-167

تأثير قطر البويضة في إنتاج الأجنة خارج الرحم داخل الفصل التناسلي وخارجه في المعز السوري

رافع الطعمة[1] وسليمان سلهب[2] ومجد الجمالي[3]

الملخَّص

نُفِّذت الدراسة في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق خلال عام 2013 بهدف دراسة تأثير قطر البويضة في إنتاج الأجنة خارج الرحم داخل الفصل التناسلي وخارجه في المعز السوري، وتحديد معدل حيويتها بعد التجميد والإذابة. جُمعت المبايض على مدار العام من عنزات مذبوحة في المسلخ ونقلت في محلول ملح الفوسفات الواقي (PBS) حرارته 37 °س مضافاً إليه الجنتامايسين إلى المخبر خلال ساعتين، واستخرجت البويضات بتشطيب سطح المبيض والغسيل بمحلول PBS. عُزلت البويضات وقُسِّمت حسب قطرها إلى أربع مجموعات (A: <100، وB: 100-110، وC: >110-120، وD: >120 مكروناً)، واستعملت الأوساط اللازمة لإنضاجها وإخصابها وتنميتها حتى مرحلة التويتة خارج الرحم، وجُمدَّت الأجنة باستخدام DMSO 15% وEG 15% بطريقة التزجيج vitrification، وحُفظت في الآزوت السائل ثم اختبرت حيويتها بعد الإذابة.حُلِّلت البيانت لمعرفة تأثير قطر البويضة وموعد الجمع في الصفات المستهدفة، وقورنت المتوسطات وفق اختبار فيشر (F- test) بوساطة برنامج SPSS 17. أظهرت النتائج أنَّ طريقة التشطيب سمحت بجمع نحو 40 بويضة/ أنثى، وبلغ المعدل العام لإنضاجها 42.54%، وإخصابها 29.35%، وانقسامها 28.8%، وحيوية الأجنة بعد التجميد والإذابة 47.17%، وكان هناك تأثير معنوي (p<0.01) لقطر البويضة في عدد البويضات التي جمعت خارج الرحم، ومعدل إنضاجها، وإخصابها، وانقسامها، ومعدل حيوية الأجنة بعد التجميد والإذابة. وتبيَّن أن البويضات التي جمعت سواء داخل الفصل التناسلي أو خارجه وقطرها أقل من 110 مكروناً فشلت في متابعة الانقسام والوصول إلى مرحلة التويتة. واستنتج أنه يمكن الاستفادة من المسالخ كمصدر منخفض التكلفة في إنتاج أجنة المعز خارج الرحم من بويضات قطرها أكبر من 110 مكروناً بغض النظر عن الفصل التناسلي، وضرورة متابعة الأبحاث للاستفادة من البويضات التي قطرها أقل من 110 مكرون في الحصول على أجنة خارج الرحم.

الكلمات المفتاحية: مبايض المعز، التشطيب، أوساط الإنضاج والإخصاب، موانع التجميد، التزجيج، إنتاج الأجنة خارج الرحم.

[1] طالب ماجستير، [2] أستاذ، قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

[3] أستاذ، قسم الكيمياء، الحيوية، كليةالصيدلة، جامعة دمشق، سورية.

Effect of oocytes diameter inside and outside of reproductive seasonon *invitro* embryo production of Syrian goats

Tohma, R[(1)], S. Salhab[(2)] and M. Jamali[(3)]

Abstract

This research was conducted at the laboratories of National Commission for Biotechnology in Damascus during 2013 to study the effect of oocytes diameter in and outside of reproductive season in *in vitro* embryo production of Syrian goats and determine the rate of survivability of post vitrified-thawed embryos. Ovaries of slaughtered goats collected and placed immediately into PBS at 37°C were transported to the laboratory within 2 hours. Each ovary was sliced with a sharp tool and washed with warm medium of PBS to rinse and collect oocytes. Collected oocytes were classified according to the diameter into four groups (<100, 100-110, >110-120, > 120 µm). Morula embryos were vitrified with DMSO 15% + EG 15% and evaluated to determine post thawed survivability. Data were layouted according to GLM using SPSS 17, and F-Test was used to compare among means. Results indicated that slicing technique allowed to collect 40oocyte/ female with overall rates of oocyte maturation, fertilization, cleavage and survivability of post vitrified- thawed embryos were 42.54%, 29.35%, 28.8% 47.17%, respectively. Analysis of variance showed significant effects (P<0.01) for oocyte diameter on studied traits. Matured oocytes collected with diameter less than 110 µm in and outside of reproduction season did not have the ability to divide and develop to give embryos. It was concluded that slaughtered animals house can be a good source of low-cost for the production of goats' embryos *in vitro* by oocytes with diameter >110 µm regardless of reproduction season and it is recommended that more investigations are needed to develop the competence of oocytes with < 110 µm to enable embryo production *ex vivo*.

Keywords: Goats, Oocytes diameter, Reproductive Season, *In Vitro*embryo production, Vitrification, Survivability.

[(1)] MS student, [(2)] Prof. Dep Anim. prod. Fac. Agric., Damascus Univ., Syria.
[(3)]Associate Prof. Fac. Pharm. Damascus Univ., Syria.

المقدمة

يوجد في سورية عرق المعز الشامي الذي قُدّر عدده بنحو 40 ألف رأس ويعيش تحت نظم إنتاج مكثفة، وعرق المعز الجبلي الذي بلغ عدده أكثر من 1.3 مليون رأس (المجموعة الإحصائية، 2010). يُعدّ المعز في سورية موسمي التناسل، ويمتد فصله التناسلي من شهر تموز إلى منتصف شهر كانون الأول.

تُعدّ بويضات المعز التي تجمع من المسالخ مصدراً أساسياً لإنتاج الأجنة مخبرياً ويمكن أن تساعد في تسريع تحسين الحيوانات وراثياً ورفع كفاءتها الإنتاجية والتناسلية (Samake وزملاؤه، 2000)، كما تُعد ممارسة تقانة إنتاج الأجنة خارج الرحم الوسيلة الرئيسية لإنقاذ الأنواع الحيوانية المهددة بالانقراض endangered (Paramio، 2010).

سمحت طرق توقيت الشبق وسفط البويضات aspiration سواء عبر المهبل الموجّهة بالأمواج فوق الصوتية transvaginal ultrasound- guided aspiration (TUGA) (Graff وزملاؤه، 1999)، أو جراحياً بالشق البطني Laparotomy في المجترات الصغيرة، أو جمع البويضات بطريقة التنظير البطني والسفط الالتقاطي laparoscopic ovum pick-up (OPU) (Baldassarre، 2002) في المجترات الكبيرة الحية، بجمع عدد كبير من البويضات لمداولتها مخبرياً لأغراض بحثية أو لإنضاجها ومن ثم إخصابها والسماح لها بالنمو والانقسام لإنتاج أجنة تُجمد أو تُنقل لحيوانات أخرى بهدف الإسراع بعمليات التحسين الوراثي في النوع الحيواني الواحد.

استخدم Martino وزملاؤه (1994) عدة طرق (التشطيب، والسحب، والتقطيع) لجمع البويضات من المبايض مخبرياً. واستنتج أن طريقة التشطيب تعطي أكبر عدد من البويضات بالمقارنة مع الطرق الأخرى. أشار Hamano وKuwayama (1993) أن البويضات المسحوبة من المبايض بطريقة التشطيب تمتلك قدرة أكبر على الإنضاج والإخصاب عند البقر. بينما أشار El-Gaafary وAbdel-Ghaffar (1994) أن معدل الإنضاج لبويضات الجاموس في المختبر كان أكبر في حالة الجمع بواسطة السحب منه في حالة الجمع بتشطيب سطح المبيض.

الهدف من البحث

نظراً لعدم وجود دراسات محلية في هذا المجال فقد هدفت الدراسة إلى:

1- إنتاج أجنة مخبرياً من المعز المحلي (إنضاج البويضات وإخصابها وتنميتها).

2- تحديد تأثير قطر البويضة في إنتاج الأجنة خارج الرحم داخل الفصل التناسلي وخارجه.

3- معرفة مدى تأثير عملية التجميد والإذابة في معدل بقاء الأجنة المنتجة خارج الرحم.

مواد البحث وطرائقه

اعتمدت الدراسة على إناث المعز المذبوحة في المذبح الفني كمصدر للحصول على المبايض خلال فترة الدراسة التي امتدت على مدار العام. وجُمعت المبايض من الذبائح بصورة دورية كل أسبوع وذلك بعد 10-15 دقيقة من الذبح وحُفظت في حافظة بلاستيكية تحوي محلول الفوسفات الواقي PBS (Phosphate Buffer Saline) مضافاً إليه جنتامايسين gentamycin 50 مغ/ل كمضاد حيوي، ثم نقلت إلى المخبر خلال مدة لاتتجاوز ساعتين (Romaguera وزملاؤه، 2011)، وأجريت عملية تشريط slicingلسطح المبيض بشكل كثيف بواسطة أداة تشريط حادة لضمان تحرير أكبر عدد من البويضات، وغسلت المبايض بمحلول PBS الدافئ عدة مرات في أثناء التشطيب واستقبلت البويضات الناتجة في طبق بتري.

جرى البحث عن البويضات بواسطة ماصة دقيقة (micropipette, Vipro) بالاستعانة بالمجهر المقلوب (Inverted microscope- Olympus)، وتم عزل البويضات الصالحة للإنضاج والحاوية على أكثر من طبقتين من الخلايا الركامية وقُسّمت حسب قطر البويضة وفق مايلي:

المجموعة A: <100 مكرون، المجموعة B: 100-110 مكرون، المجموعة C:110-120مكرون، والمجموعة D:>120 مكرونا).وُضع 5-7 بويضات في طبق بتري (culture dish, SPL) يحوي 350 مكرولتر من وسط الإنضاج Maturation medium (Hepes, 4g/L Human serum albumin., Fertipro) مضافا إليه 10% من مصل العجل المولود حديثاً (Fetal Calf Serum, Sigma)، وغطيت بزيت البارافين (mineral oil, Fertipro)، ونقلت إلى حاضنة (Shellab incubator) ضمن الشروط $5\%CO_2$، ودرجة حرارة 38.5 ºس، ورطوبة نسبية عالية 95% لمدة أقصاها 27 ساعة (Crozet وزملاؤه، 2000).

فُحصت البويضات تحت المهجر المقلوب، وعُزلت البويضات الناضجة التي تميزت بتمدد الخلايا الركامية وظهور الجسم القطبي الأول، ونُقلت إلى طبق بتري آخر وأزيلت طبقة الخلايا الركامية المحيطة بها بعملية سحب وإعادة البويضات عدة مرات باستعمال ماصة دقيقة.

استخدمت قشات السائل المنوي المجمد (0.5 مل) لتيوس المعز الشامي المربـاة في محطة إزرع التابعة للمركز العربي (أكساد)، وأجريت عملية استعداد النطف واستكمال إنضاجها حسب طريقةDesmedt وزملائه (1992). وقدرت حركة النطف باستخدام المجهر، مع تقدير تركيز النطف باستخدام جهاز عد الخلايا. ليصبح تركيز النطف

10^6x1.5 نطفة/ مل ثم نقلت إلى الحاضنة وتركت لمدة 4-5 ساعات بدرجة 38.5°س لتكون جاهزة لإخصاب البويضات.

نُقلت البويضات العارية الناضجة إلى طبق بتري خاص للإخصاب (IVF dish, SPL) يحوي 350 ميكروليتر من وسط الإخصاب IVF مضافا إليه 10% من مصل العجل المولود حديثاً ثم غطيت بزيت البارافين، وأضيف الوسط الحاوي على النطف النشطة، نقلت بعدها إلى حاضنة CO_2 بتركيز 5%، وبدرجة حرارة 38.5°س، ورطوبة 95%، وتركت لمدة 24 ساعة، ثم فحصت تحت المجهر المقلوب لملاحظة إخصاب البويضات من خلال ظهور الجسم القطبي الثاني (second polar body) والبداءتان النوويتان الذكرية والأنثوية (Romaguera وزملاؤه، 2011).

بعد 24 ساعة من الإخصاب، أخذت البويضات التي ظهرت عليها علامات الإخصاب وغسلت في الوسط Flash medium للتخلص من بقايا النطف المتعلقة بالبويضة (عملية سحب وإعادة باستعمال ماصة دقيقة).

تم نقلت البويضات المخصبة إلى أطباق بترية تحوي 350 مكرولتر من وسط الإخصاب IVF medium مضافاً إليه 10% من مصل العجل المولود حديثاً، ووضعت في الحاضنة ضمن الشروط CO_2 5%، رطوبة 95%، درجة حرارة 38.5° س، لمدة 8 أيام. وفُحصت الأطباق بفترات متعددة لملاحظة الانقسام الخلوي بدءاً من مرحلة الخليتين وحتى مرحلة التويتة (Romaguera وزملائه، 2011).

يتكون وسط التجميد من محلول التوازن (Equilibration Solution (ES، والثاني محلول التجميد (Vitrification solution (VS. حيث استعمل مزيج من مانعي التجميد EthyleneGlycol (EG) و DiMethylSulphOxide (DMSO) بنسب متساوية حسب Romaguera وزملائه (2011) الموضح في الجدول التالي:

المكونات	محلول التوازن	محلول التزجيج
DMSO + EG	% 15	% 30
sucrose	-	0.5 M
FCS	% 20	% 20
IVF medium	% 65	% 50

عُزلت الأجنة التي وصلت إلى مرحلة التويتة، وتمت معاملتها حسب Romaguera وزملائه (2011) كالتالي: وُضعت الأجنة في محلول التوازن ES لمدة 10-15 دقيقة حتى عادت إلى حجمها الطبيعي نظراً للتقلص الذي أصابها لحظة وضعها في محلول التوازن، ثم وُضعت في محلول التجميد VS لمدة 30- 40 ثانية. ووُضع 2-3 أجنة في القشة الواحدة وأغلقت، ثم وضعت القشة مباشرةً في الآزوت السائل. بعد تخزينها لمدة

48 ساعة، أُخرجت الأجنة من الآزوت السائل وأذيبت على درجة حرارة 38.5º س بوضعها في وسطين (مرحلتين) A وB. حسب Moussa وزملائه (2005) الموضح كالتالي:

المادة	الوسطA (المرحلة الأولى)	الوسطB (المرحلة الثانية)
sucrose	1M (3.24 g)	0.5 M (1.71 g)
FCS	%20	%20
IVF medium	% 80	% 80

حيث قُصت السدادة العلوية للقشة ووضعت الأجنة في المحلول A الموجود في طبق بتري وبدرجة حرارة 38.5 ºس لمدة دقيقة واحدة، ثم نقلت إلى المحلول B الموجود في طبق بتري آخر بدرجة حرارة 38.5ºس وتركت لمدة 3 دقائق، ثم نقلت إلى طبق بتري يحوي IVF medium مضافا إليه 10% من مصل العجل المولود حديثاً لمتابعة النمو وغُطيت بزيت البارافين وأعيدت إلى الحاضنة من أجل استئناف نموها.

حُددت حيوية الأجنة ومعدل بقائها بعد التجميد وتم تمييزها عن الأجنة غير الحيوية وذلك حسب عودة تمدد الجنين في مرحلة التويتة إلى حجمه الأصلي والزيادة في القطر الخارجي حسب Moussa وزملائه (2005).

خضعت النتائج للتحليل الإحصائي، إذ استخدم تحليل التباين لمعيارين (قطر البويضة والفصل التناسلي) عبر النموذج الخطي العام General Linear Model (GLM)، وتمت الإشارة إلى التداخلات المعنوية بين العاملين المدروسين، وحُسبت معنوية الفروق بين نسب الإنضاج والإخصاب والانقسام والحيوية في المجموعات التجريبية وفقاً لاختبار فيشر (F). وحُلّلت البيانات بوساطة برنامج SPSS17 (2010).

النتائج

أظهرت نتائج تحليل التباين (الجدول 1) وجود تأثير معنوي (P<0.01) لكل من الفصل التناسلي وقطر البويضة في العدد الكلي للبويضات التي جُمعت مخبرياً خلال فترة الدراسة، وفي معدلات إنضاجها وإخصابها وانقسامها، وفي عدد الأجنة الحية المتبقية بعد التجميد والإذابة، وكان التأثير معنوياً (P<0.01) للتآثر الثنائي للعاملين المدروسين (الفصل التناسلي، قطر البويضة) في عدد البويضات ومعدلات الإنضاج والإخصاب والانقسام وعدد حيوية الأجنة بعد التجميد والإذابة.

الجدول (1) تحليل التباين لتأثير الفصل التناسلي وقطر البويضة في مؤشرات إنتاج أجنة المعز مخبرياً.

مصدر التباين	درجة الحرية	متوسط المربعات				
		البويضات المجموعة	الإنضاج	الإخصاب	الانقسام	بعد الإذابة
الفصل التناسلي(1)	1	378.14**	1768.33**	380.25**	69.42**	15.34**
قطر البويضة(2)	3	6076.25**	19089.21**	1973.3**	160.93**	29.86**
2*1	3	258.47**	163.36**	89.04**	26.89**	6.08**
الخطأ التجريبي	96	508	50.31	8.26	2.35	0.96

n.s: تأثير غير معنوي، * (P<0.05)، ** (P<0.01).

كما بيّن (الجدول 2) تزايد عدد البويضات المجموعة مع زيادة قطر البويضة داخل الفصل التناسلي أو خارجه. فبلغ العدد الأكبر 398 بويضة بقطر >120 مكرون داخل الفصل التناسلي، وبفارق معنوي عن عدد البويضات المجموعة خارج الفصل التناسلي بالقطر نفسه (321 بويضة). واتضح أن أقل عدد بويضات جمعت خلال فترة الدراسة كانت تلك الخاصة بالمجموعة القطرية A (<100مكرون)، بغض النظر عن الفصل التناسلي.

الجدول (2) عدد البويضات المجموعة مخبرياً داخل الفصل التناسلي وخارجه وفق قطر البويضة

قطر البويضة (مكرون)	البويضات المحضنة	
	داخل الفصل التناسلي	خارج الفصل التناسلي
100 >	$^{d}66^{A}$	$^{c}60^{A}$
110-100	$^{c}104^{A}$	$^{c}83^{B}$
120 -110<	$^{b}263^{A}$	$^{b}177^{B}$
120<	$^{a}398^{A}$	$^{a}321^{B}$
الكلي	831	641

تشير الأحرف الصغيرة المختلفة في العمود الواحد والكبيرة في السطر الواحد إلى وجود فرق معنوي (P<0.05) بين المعدلات.

ويبين الجدول (3) تأثير قطر البويضة داخل الفصل التناسلي وخارجه في معدل إنضاج البويضات المحضنة مخبرياً، إذ تفوقت البويضات التي جمعت داخل الفصل التناسلي من المجموعة القطرية C (<110-120 مكروناً) بمعدل نضجها فبلغ 57.03%، تلتها بويضات المجموعة القطرية D (>120 مكروناً) في الفصل نفسه بمعدل 56.28%، وكان أقل معدل إنضاج (6.06%) للبويضات التي جمعت خارج الفصل التناسلي من المجموعة القطرية A (<100 مكرون).

كما بيّنت النتائج (الجدول 3) عدم وجود فرق معنوي (P<0.01) في معدل إخصاب بويضات المجموعة القطرية C (<110-120 مكرون) وD (>120مكرون) داخل الفصل

التناسلي، وكان أقل معدل إخصاب (21.62%) للبويضات المجموعة خارج الفصل التناسلي من المجموعة القطرية C.

الجدول (3) معدل إنضاج وإخصاب بويضات المعز مخبرياً داخل الفصل التناسلي وخارجه وفق قطر البويضة.

قطر البويضة (مِكرون)	البويضات الناضجة				البويضات المخصبة			
	داخل الفصل التناسلي		خارج الفصل التناسلي		داخل الفصل التناسلي		خارج الفصل التناسلي	
	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%
100 >	(66)4	^{c}6.06	0	-	0	-	-	-
110-100	(104)26	^{b}25^{A}	(83)11	^{b}13.25^{B}	0	-	0	-
120 -110<	(263)150	^{a}57.03^{A}	(177)74	^{a}41.81^{B}	46	^{a}30.67^{A}	16	^{a}21.62^{B}
120<	(398)224	^{a}56.28^{A}	(321)138	^{a}42.99^{B}	80	^{a}35.71^{A}	36	^{a}26.09^{B}
الكلي	(831)404	48.62	(641)223	34.79	126	31.19	52	23.39

تشير الأحرف الصغيرة المختلفة في العمود الواحد أو الكبيرة في السطر الواحد إلى وجود فرق معنوي (P< 0.01) بين المعدلات.

أشارت النتائج (الجدول 4) إلى تفوق البويضات التي جمعت داخل الفصل التناسلي من المجموعة القطرية (D >120 مكروناً) في قدرتها على الانقسام بمعدل بلغ 37.5%، تلتها بويضات المجموعة القطرية (C >110-120 مكروناً) بمعدل بلغ (30.43%)، وكان أقل معدل انقسام للبويضات المجموعة خارج فصل التناسل من المجموعة القطرية C بمعدل 12.5%.

الجدول (4) معدل انقسام بويضات المعز وحيوية الأجنة المُنتجة داخل الفصل التناسلي وخارجه وفق قطر البويضة.

قطر البويضة (مِكرون)	البويضات المنقسمة				حيوية الأجنة			
	داخل الفصل التناسلي		خارج الفصل التناسلي		داخل الفصل التناسلي		خارج الفصل التناسلي	
	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%
120 -110<	14	^{b}30.43^{A}	2	^{b}12.5^{B}	9	^{a}64.29^{A}	1	^{a}50^{B}
120<	30	^{a}37.5^{A}	7	^{a}19.44^{B}	12	^{a}40^{A}	2	^{b}28.57^{B}
الكلي	44	34.92	9	17.31	21	47.73	3	33.33

تشير الأحرف الصغيرة المختلفة في العمود الواحد أو الكبيرة في السطر الواحد إلى وجود فرق معنوي (P < 0.01) بين المعدلات.

وأوضحت نتائج الدراسة (الجدول 4) تفوق الأجنة التي جمعت داخل الفصل التناسلي من المجموعة القطرية (C >110-120 مكروناً) بمعدل حيوية 64.29% بعد التجميد والإذابة، وكانت أقلها حيوية تلك التي جُمعت خارج الفصل التناسلي من المجموعة القطرية (D >120مِكروناً) بمعدل حيوية28.57%.

المناقشة

سمحت طريقة تشطيب سطح المبيض في هذه الدراسة بالحصول على عدد كبير من البويضات بلغ معدلها40 بويضة/ العنزة المانحة، ما ساعد في عمليات المداولة، والاستخدام للإنضاج، والإخصاب، والانقسام، والتجميد، وهو أكبر من المعدل الذي حصل عليه Romaguera وزملاؤه (2011) البالغ 12.28 بويضة /العنزة المانحة بطريقة التشطيب، ومن الذي حصل عليه Baldassarre وKaratzas (2004) البالغ 13.5 بويضة/العنزة المانحة بطريقة السفط الجريبي بالتنظير البطني، وهذا يؤكد بأنّ طريقة الجمع تؤثر بعدد البويضات التي يمكن جمعها من الأنثى (Paramio، 2010) بهدف إنتاج الأجنة مخبرياً. على أية حال، تبقى طريقة الجمع بالتشطيب هي الأفضل لأغراض بحثية وليس تجارية (Camargo وزملاؤه، 2006) لأن قدرة الأجنة على التطور خلال مرحلة التكون الجريبي folliculogenesis أو خلال إنضاج البويضات في المختبر تؤثر في التطور الجنيني المبكر وفي عدد الأجنة الناتجة (Krisher، 2004).

أشارت نتائج الدراسة أنّ عدد البويضات التي جُمعت من العنزات المانحة خلال فترة الدراسة تأثر معنوياً ($P < 0.01$) بالفصل التناسلي وبلغ 56.45% داخل الفصل التناسلي و43.55% خارجه. وهذا قد يكون له علاقة باستجابة المبايض لهرمونات النخامية المنشطة للقند وانعكاس ذلك على معدل نشاطها ونمو البويضات الذي يزداد لدى إناث المعز في الفصل التناسلي.

كما وُجد تأثير كبير ($P < 0.01$) لقطر البويضات في عددها عند الجمع، فتزايدت نسبتها مع تزايد قطر البويضة وبلغت 8.7% و12.7% و29.8% و48.8% للبويضات التي قطرها (<100 مكرون) و(100-110 مكروناً) و(>110-120 مكروناً) و(>120 مكروناً)، وهذا يتوافق مع ما وجده Hyttel وزملاؤه (1997) الذين أكدوا أن البويضات التي يكون قطرها (<110 مكروناً) تكون بطور النمو ويصعب جمعها وهي الأقل قدرة على التطور، كما أشارت النتائج إلى زيادة عدد البويضات المجموعة داخل الفصل التناسلي التي قطرها (>120مكرون) وهذا قد يكون له علاقة بزيادة النشاط المبيضي داخل الفصل التناسلي.

الإنضاج: جاءت نتائج الدراسة مخالفة لما توصل إليه Samake وزملاؤه (2000) الذين لم يلاحظوا وجود تأثير لفصل التناسل في قابلية بويضات المعز لبلوغ الإنضاج المخبري، حيث أشارت نتائج الدراسة (الجدول 2) إلى وجود تأثير معنوي ($P<0.01$) لموعد جمع البويضات في معدلات إنضاج بويضات المعز، فكان أعلاها داخل الفصل التناسلي (48.62%) وزاد بنحو13.83% عن معدل الإنضاج خارجه، وهذا قد يعود إلى تأثير التغذية التي كانت سائدة خلال فصول السنة ومدى تأثيرها في الحالة الفيزيولوجية

للحيوان، فقد أشار O'Callaghan وزملاؤه (1997) إلى أن التغير في تغذية الحيوان يُسبب تغيرات سريعة وآنية في معدل الفعاليات الاستقلابية ولاسيما ما يتعلق بالإنسولين Insulin والغلوكوز glucose، إذ يؤثر التغير في الإنسولين بشكل كبير في تركيز العوامل المشابهة للإنسولين (IGF-I وIGF-II) التي تعد من العوامل الهامة التي تفرزها البويضة وتؤدي دوراً هاماً في إنضاج البويضات.

جاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع ما وجده الطائي (2003) الذي حصل على نسب إنضاج مخبري تختلف حسب قطر البويضات، وقد بلغت 10.66%، و35.71%، و48.5%، و74.2% في المجموعات (<100مكرون)، و(100-110مكروناً)، و(>110-120مكروناً)، و(>120مكروناً)، على التوالي. ويمكن أن يرجع سبب تدني معدل الإنضاج في بويضات المَعز في المجموعتين الأولى والثانية إلى عدم قدرة البويضة على استئناف الانقسام الاختزالي وبقائها عند مرحلة الـ G.V، وذلك لعجزها في تصنيع البروتينات الضرورية اللازمة لمتابعة التطور.

بيّن Pavlok وزملاؤه (1992) أن البويضات التي أقطارها (<110 مكرون) لايكتمل نضجها النووي أو السيتوبلازمي في وقت الإنضاج المخبري لذلك تكون غير قادرة على التطور بعد الإخصاب، أما البويضات الأكبر قطراً (>110 مكرون) وتمكنت من بلوغ الإنضاج المخبري بعد مرور 27 ساعة ضمن الوسط الزرعي، مما يشير إلى أن بويضات هاتين المجموعتين أتمت طور النمو مع حصول اكتمال للجزيئات المسؤولة عن إنضاج النواة والسيتوبلازم واكتمال تصنيع البروتينات الضرورية التي تحتاجها البويضة في أثناء الإنضاج المخبري (Block وزملاؤه، 2008)، أو نتيجة لإحاطتها بعدد أكبر من طبقات الخلايا الركامية مما أدى إلى زيادة الاتصال بينها وبين الوسط الزرعي المحيط بها (الطائي، 2003).

الإخصاب: أشارت نتائج الدراسة (الجدول 3) إلى وجود تأثير معنوي (P<0.01) لموعد جمع البويضات في معدل إخصاب بويضات المعز، فكان أفضلها داخل الفصل التناسلي (31.19%) وزاد بنحو7.8% خارجه. وجاءت نتائج الدراسة مخالفة لما توصل إليه Samake وزملاؤه (2000) وRocha وزملائه (1998) الذين لم يلحظوا وجود تأثير للفصل في نجاح إخصاب بويضات المعز.

كما أشارت نتائج الدراسة (الجدول 3) إلى وجود تأثير معنوي (P<0.01) لقطر البويضة في معدلات الإخصاب المخبري لبويضات المعز المجموعة داخل الفصل التناسلي فكان أفضلها (35.71%) في البويضات التي قطرها (>120مكرون) وزاد بنحو 5.04% عن معدل الإخصاب في البويضات التي قطرها (>110-120مكرون). في حين فشلت البويضات التي قطرها (<110مكرون) في الإخصاب بغض النظر عن فصل التناسل، ما يشير إلى أنّ تحضين البويضات في الأوساط الزرعية يمكن أن يكون له تأثير

سلبي في معدل الإخصاب بسبب افتقارها النسبي، وخاصة الصغيرة منها لبعض المكونات التي يمكن أن توجد في السائل الجريبي (Suzuki وزملاؤه، 1994).

الانقسام: أشارت نتائج الدراسة (الجدول 4) إلى تفوق معنوي (P<0.01) لمعدل انقسام بويضات المعز التي جُمعت داخل الفصل التناسلي (34.92%) وزاد بنحو 17.61% عن معدل انقسام البويضات خارجه. وأشار Al-Katanani وزملاؤه (2002) إلى أنَّ الموسم الحار يُخفّض من قابلية بويضات أبقار الهولشتاين على التطور الجنيني المبكر ضمن الوسط الزرعي بعد الإخصاب، وعللوا ذلك إلى أن بعض مكونات الجنين تصنعها البويضة خلال مرحلة التكون الجريبي، وبسبب الإجهاد الحراري تتخرب هذه المكونات، ما يعطي الدليل على تأثير الإجهاد الحراري في تغيير محتوى الفوسفولبيدات في البويضات.

كما أشارت نتائج الدراسة (الجدول 4) إلى فشل البويضات المخصبة التي قطرها أقل من 110 مكروناً في الانقسام والوصول لمرحلة التويتة سواء داخل الفصل التناسلي أو خارجه، وانخفض عدد الأجنة التي وصلت لمرحلة التويتة معنوياً (P<0.01) والمتطورة من البويضات المجموعة داخل الفصل التناسلي التي قطرها 110-120 مكروناً بنحو 7.07% عن نظيراتها ذات القطر الأكبر من 120 مكروناً (37.5%). وبيّن Pavlok وزملاؤه (1992) أن البويضات التي أقطارها (<110 مكرون) لايكتمل نضجها النووي أو السيتوبلازمي في وقت الإخصاب المخبري لذلك تكون غير قادرة على التطور بعد الإخصاب، وأشار Crozet وزملاؤه (2000) أن هناك علاقة ارتباط إيجابية بين قطر البويضة وتطورهاإلى جنين في المعز.

معدل حيوية الأجنة بعد التجميد والإذابة: أشارت نتائج الدراسة (الجدول 4) إلى وجود تأثير معنوي (P<0.01) لموعد جمع البويضات خلال فصل السنة في معدلات حيوية الأجنة بعد التجميد والإذابة، وكان أفضلها تلك التي جُمعت داخل الفصل التناسلي (47.73%) وزاد بنحو 14.4% عن التي جمعت خارجه.كما تبين أن الأجنة الناتجة عن بويضات مجموعة داخل الفصل التناسلي بقطر >110-120 مكروناً كان لها القدرة على البقاء بعد التجميد والإذابة (64.29%) بزيادة قدرها 24.29% عن نظيراتها الأكبر قطراً (>120مكروناً). وتُعزى الاختلافات في نتائج التجميد إلى محتوى الأجنة من الليبيدات، وقد يُعزى الارتفاع في معدلات بقاء الأجنة التي مصدرها بويضات جمعت داخل الفصل التناسلي ويزيد قطر البويضة فيها عن 110 مكروناً إلى انخفاض مستوى الليبيدات في خلاياها (Dobrinsky، 1999).

واستنتج أن طريقة جمع البويضات بالتشطيب سمحت بالحصول على عدد كبير من البويضات/مبيض من أجل استخدامها في عمليات الإنضاج، والإخصاب، والزرع، والتجميد، وأنّ البويضات المجموعة داخل الفصل التناسلي التي أقطارها<110 مكرون كانت الأفضل في برامج إنتاج الأجنة مخبرياً مقارنة بالبويضات المجموعة خارجهَ الأقل قطراً.

References المراجع

المجموعة الإحصائية الزراعية الـسورية. 2010. الحيوانــات الزراعيــة ومنتجاتهــا، وزارة الزراعــة والإصلاح الزراعي.

الطائي، محمد عبد الكريم. 2003. إنضاج وإخصاب بويضات المعز مخبرياً لنماذج مأخوذة مــن المجــازر وبعض العوامل المؤثرة بها. رسالة ماجستير، جامعة بغداد.

Al-Katanani, Y. M., F. F. Paula-Lopes and P. J. Hansen. 2002. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in holstein cows. J.dairy Sci., 85:390-396.

Baldassarre, H. and C. N. Karatzas. 2004. State of the art in the production of transgenic goats. Reprod. Fertil. Dev. 16.

Baldassare, H., B.Wang, N. Kafidi, C. Keefer, A. Lazaris and C. N. Karatzas. 2002. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *In Vitro* embryo production technologies. Theriogeno., 57:275-284.

Block, J., C. Chase and P. J. Hansen. 2002. Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal versus paternal contribution. Mol. Reprod. Dev. 63: 32-37.

Camargo, L., J. Viana., W. Sa., A. M. Ferreira., A. Romas., C. Freitas and V.R. Vale Filho. 2006. Developmental competence of oocytes obtained from *Bos taurus* and *Bos indicus* dairy cows raised in tropical climate. Reprod Fert Dev. 18: 243-244.

Crozet, N., M. Dahirel and L. Gall. 2000. Meiotic competence of *In Vitro* grown goat oocytes. J. Reprod. Fertil., 118 : 367-373.

Desmedt, V., N. Crozed and I. Gall. 1994. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocytes. J. ExP. Zool., 269: 128-139.

Desmedt, V., N. Crozed., M. Ahmed-Ali., A. Martino, and Y.Cogine, 1992. *In Vitro* maturation and fertilization of goat ocytes. Theriogeno., 37:1049-1060.

Dobrinsky, J. R. 1999. Cryopreservation of swine embryos Production for the future. Embr. Trans. News. 11: 18-23.

El-Gaafary, M. N. and A. E. Abdel-Ghaffar. 1994. *In Vitro* oocytes maturation, fertilization andcleavage in Egyptian buffaloes. Annals of Agric. Sci. Moshtohor. Egypt. 32: 1801-1810.

Graff, K. J., M. Meintjes and V. W. Dyer. 1999. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. Theriogeno., 51:1099-1119.

Hamano, S. and M. Kuwayama. 1993. *In Vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. Theriogeno., 39: 703-712.

Hyttel, P., T. Fair., H. Callesen and T. Greve. 1997. Oocytes growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogeno. 47: 23-32.

Krisher, R.L., 2004. The effect of oocyte quality on development. J. Anim. Sci., 82: 14-23.

Martino, A., T. Mogas, M. J. palomo and M. T. paramio 1994. *In Vitro* maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. Theriogeno., 41: 473-485.

Moussa, M., I. Bersinger, P. Doligez and F. Guignot. 2005. *In Vitro* comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. Theriogeno., 64:1619-1632.

O,Callaghan, D., M. G. Wade and M. P. Boland. 1997. Effect of urea and an ammonia-binding agent In Vivo on subsequent development of brovine oocytes cultured In Vitro. J. Agricultural and Food Res. 36:123-124.

Paramio, M. T. 2010. *In Vivo* and *In Vitro* embryo production in goats. Small Rumin. Res. 89:144-148.

Pavlok, A., A. Lucas-Hahn, and H. Niemann. 1992. Fertilization and development competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. Mol. Repord. Dev., 31: 63-67.

Rocha, A., R. D. Randel, J. R. Broussard, J. M. Lim, R. M. Blair, J. D. Roussel, R. A. Godke and W. Hansel. 1998. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in Bos taurus but not in Bos indicus cows. Theriogeno., 49:657-665.

Romaguera, R., X. Moll and R. Morato. 2011. Prepubertal goat oocytes from large follicles result in similar blastocyst production and embryo ploidy than those from adult goats. Review.Theriogeno., 76: 1-11.

Samake, S., E.A. Amoah, S. Mobini, O. Gazal and S. Gelaye. 2000. *In Vitro* fertilization of goat oocytes during the non-breeding season. Small Ruminant Res., 35:49-54.

SPSS17 for Windows. (2010) (http://www.spss.com).

Suzuki, K., T. Mori., and H. Shimizu. 1994. *In Vitro* fertilization of porcine oocytes in chemically defined medium.Theriogeno.,42: 1357–1368.

Received	**2014/12/04**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2014/12/18**	**قبول البحث للنشر**