تأثير فصل السنة وعمر الأم المانحة في إنتاج الأجنة خارج الرحم في المعز السوري

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

الملخَّص

نفذت الدراسة في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق خلال الفترة من 2013/3/1-2014/2/28 بهدف دراسة تأثير فصل السنة وعمر الحيوان في إنتاج الأجنة خارج الرحم في المعز السوري، وتحديد معدل حيويتها بعد التجميد والإذابة. جمعت المبايض على مدار العام من عنزات مذبوحة في المسلخ خلال 10-15 دقيقة بعد الذبح ونقلت في محلول ملح الفوسفات الواقي (PBS) حرارته 37 °س مضافاً إليه الجنتامايسين إلى المخبر في مدة لاتتجاوز ساعتين، واستخرجت البويضات منها بطريقة تشطيب سطح المبيض مع الغسيل بمحلول PBS، وقُسِّمت حسب فصل السنة، وعمر الأم المانحة (<1 سنة، 1-2 سنة، >2 سنة)، واستعملت الأوساط المناسبة المستعملة في تقانة طفل الأنبوب لإنضاج بويضات المعز وإخصابها وتنميتها حتى مرحلة التويتة خارج الرحم، وجُمِّدت الأجنة باستخدام مزيج من مانعي التجميد (15% DMSO و15% EG) بطريقة التزجيج vitrification. حُلّلت البيانات لمعرفة تأثير العوامل المدروسة في الصفات المستهدفة، وقورنت المتوسطات وفق اختبار فيشر (F-test) بوساطة برنامج SPSS 17.

أظهرت النتائج أنّ طريقة التشطيب سمحت بجمع 1474 بويضة من المسالخ وبمعدل بلغ 20 بويضة/مبيض، وبلغ المعدل العام لإنضاجها 42.54%، وإخصابها 29.35%، ومعدل انقسامها 28.8%، ومعدل حيوية الأجنة بعد التجميد والإذابة 47.17%، وكان هناك تأثير معنوي (p<0.01) لفصل السنة وعمر الأم المانحة وتآزرهما في عدد البويضات التي جمعت خارج الرحم، ومعدلات إنضاجها، وإخصابها، وانقسامها، ومعدل حيوية الأجنة بعد التجميد والإذابة.

يستنتج من الدراسة الحالية أنّ البويضات التي جُمعت في فصلي الصيف والخريف ومن أمهات مانحة بعمر أكبر من سنة كانت الأفضل لإنتاج الأجنة مخبرياً والأكثر قدرة على مقاومة ظروف التجميد والإذابة. ما يتيح فرصة أكبر في تأمين الأجنة لاستخدامها في المجالات البحثية والتطبيقية الأخرى، والعمل على متابعة الأبحاث للتمكن من الاستفادة من البويضات العائدة لعنزات غير بالغة في الحصول على أجنة.

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، كلية الصيدلة، جامعة دمشق، سورية.

effect of season and donor's age in production Syrian goat embryos In Vitro

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

Abstract

This research was conducted at the laboratories of the National Commission for biotechnology in Damascus during period1/3/2013-28/2/2014 to study the effect of season and donor's age in produce goat embryos *in vitro* and the rate of survivability of post vitrified- thawed embryos. Ovaries of slaughtered goats collected throughout the year approximately 10-15 minutes post slaughtering were placed immediately into PBS supplemented with gentamycin at 37˚C and transported to the laboratory within 2 hours. Each ovary was sliced with a sharp tool along the whole surface and washed with warm medium (PBS). Oocytes were divided according to the year seasons and based on goat's age into three groups (<1 year, 1-2 years, > 2 years). Morula were vitrified with DMSO 15% + EG 15% into liquid nitrogen. Data were analyzed according to GLM using SPSS 17, and two ways analysis of variance (ANOVA) were applied to determine the effect of studied factors and F-Test was used to compare the means.

Results indicated that slicing technique allowed to collect 1474 oocytes (20 oocyte/ ovary) with overall rates of 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 the season, donor's age and their interactions on studied traits.

It was concluded that oocytes collected during the summer and autumn from donors aged > 1 year had the best competence to produce embryos *In Vitro* and showed the highest survival rate against vitrification and thawing processes, to produce many of embryos for other uses in research and applied fields. and it is recommended that more investigations are needed to develop the competence of oocytes obtained from prepubertal donors to enable embryo production *ex vivo*.

Keywords: Goat, Age of donor, Season, *In Vitro* embryo production, Vitrification.

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

المقدمة

يعدُّ المعز من الحيوانات الهامة في عديد من دول العالم بسبب قدرتها على العيش تحت ظروف مختلفة وانخفاض تكاليف رعايتها وقلة تعرضها للأمراض. وعلى الرغم من أهميتها، لم تلق الاهتمام الكافي كغيرها من الأنواع الحيوانية الزراعية الأخرى كالبقر والغنم، ويُوجد في سورية عرق المعز الشامي الذي قدّر 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) يُعد المعز في سورية موسمي التناسل، ويمتد فصله التناسلي من شهر تموز إلى منتصف شهر كانون الأول.

تُعدّ البويضات المستخلصة من مبايض الحيوانات المذبوحة في المسالخ متغايرة Hetrogeneous لأنها تأتي من جريبات مبيضية في مراحل نمو مختلفة. أشار Duby وزملاؤه (1996) إلى أنّ الجريبات المبيضية للحيوانات غير البالغة أمكن تحفيزها على النمو عند المعاملة بهرمونات موجهات القند الخارجية. لوحظ أن المعاملة بهرمون FSH يحسن قدرتها التطورية، وخاصة في الإناث غير البالغة (Lu وزملاؤه، 1991). أوضح الطائي (2003) عدم وجود فرق معنوي بين نسب إنضاج وإخصاب البويضات التي مصدرها إناث معز بالغة وغير بالغة، وعدم وجود تأثير لعمر المانحات على انقسام البويضات المخصبة. أوضح Martino وزملاؤه (1994) أنّ عدد البويضات المستخلصة ونوعيتها في المعز يتأثر تأثراً كبيراً فيما إذا كانت تلك الإناث بالغة أو غير بالغة. أشار Izquierdo وزملاؤه (1999) إلى عدم تمكّن أجنة المعز التي مصدرها حيوانات غير بالغة جنسياً من الوصول إلى مرحلة الكيس الأرومي، ما أعطى دليلاً على عدم اكتمال الإنضاج، أو حصول نقص في سيتوبلازم البويضات من الحيوانات غير البالغة الذي نتج عنه انخفاض في القدرة على دعم ومساندة تطور الجنين مخبرياً (Earl وزملاؤه، 1998).

ذكر المزيد (1986) أن موسم التناسل عند الغنم يرتبط بالعوامل المناخية بالدرجة الأولى، وأضاف زكريا وسلهب (1991) أن فترة الفصل التناسلي والإباضة لأي سلالة من الأغنام والمعز تختلف حسب الموقع الجغرافي، والظروف البيئية، والحالة الغذائية. كما أوضح الطائي (2003) في دراسة على المعز تأثير فصل السنة في الإنضاج المخبري إذ كانت أعلى نسبة إنضاج خلال فصلي الصيف والخريف، كما أظهرت نتائجه وجود اختلافات معنوية بين فصول السنة، وعدم قدرة البويضات على الانقسام خلال فصل الشتاء مقارنة ببقية فصول السنة.

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 فصل السنة وعمر الأم المانحة في إنتاج الأجنة خارج الرحم في المعز السوري.

مواد البحث وطرائقه

اعتمدت الدراسة على إناث المعز المذبوحة في المذبح الفني وهي بأعمار مختلفة كمصدر للحصول على المبايض خلال الفترة الممتدة من 2013/3/1 حتى 2014/2/28.

جُمعت المبايض من الذبائح بصورة دورية كل أسبوع وذلك بعد 10-15 دقيقة من الذبح وحفظت 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 slicing لسطح المبيض بشكل كثيف بواسطة أداة تشريط حادة لضمان تحرير أكبر عدد من البويضات، وغُسلت 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)، وتمّ عزل البويضات الصالحة للإنضاج والحاوية على أكثر من طبقتين من الخلايا الركامية.

قسمت البويضات إلى مجموعات تتناسب ونوع العوامل المدروسة وفق الآتي:

1- فصل السنة Season: جمعت البويضات من مبايض العنزات المذبوحة على مدار العام، وقسمت إلى أربع مجموعات حسب تاريخ الجمع بما يتناسب وفصول السنة الأربعة.

2- أعمار العنزات المانحة: جمعت البويضات من مبايض العنزات وصنفت حسب أعمارها المقدرة بطريقة التسنين إلى 3 فئات: (< 1 سنة)، (1-2 سنة)، (> 2 سنة).

وُضع 5-7 بويضات في طبق بتري (culture dish, SPL) يحوي 350 ميكرو لتر من وسط الإنضاج Maturation medium (,.Hepes, 4g/L Human serum albumin) Fertipro مُضافاً 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°س، ورطوبة نسبية عالية 95% لمدة أقصاها 27 ساعة (Crozet وزملاؤه، 2000).

بعد انتهاء مدة الحضن فُحصت البويضات تحت المهجر المقلوب، وعُزلت البويضات الناضجة التي تميزت بتمدد الخلايا الركامية وظهور الجسم القطبي الأول، نقلت

البويضات الناضجة 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 طريقة Desmedt وزملاؤه (1992). وقدرت حركة النطف باستخدام المجهر، مع تقدير تركيز النطف باستخدام جهاز عد الخلايا cell counting. 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 والبدائتين النوويتين الذكرية والأنثوية (Romaguera، 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). ثم نقلت البويضات المخصبة إلى أطباق بترية تحوي 350 مكرولترٍ من وسط الإخصاب IVF medium مضافاً إليه 10% من مصل العجل المولودَ حديثاً، ووضعت في الحاضنة ضمن الشروط CO_2 5%، رطوبة 95%، درجة حرارة 38.5°س، لمدة 8 أيام. وفُحصت الأطباق على فترات متعددة لملاحظة الانقسام الخلوي بدءاً من مرحلة الخليتين وحتى مرحلة التويتة (Romaguera وزملاؤه، 2011).

تجميد الأجنة:

يتكون وسط التجميد من قسمين الأول محلول التوازن (ES) Equilibration Solution، والثاني محلول التزجيج (VS) Vitrification solution. حيث استعمل مزيج من مانعي التجميد EthyleneGlycol (EG) و(DMSO) DiMethylSulphOxide 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 معاملة الأجنة حسب Romaguera وزملائه (2011) كالتالي:

1. مرحلة التعرض لمحلول التوازن: وُضعت الأجنة في محلول التوازن ES لمدة 10-15 دقيقة حتى عادت إلى حجمها الطبيعي نظراً للتقلص الذي أصابها لحظة وضعها في محلول التوازن.
2. مرحلة التعرض لمحلول التزجيج: وُضعت في محلول التزجيج VS لمدة 30-40 ثانية.
3. وُضع 2- 3 أجنة في القشة الواحدة وأغلقت، ثم وضعت القشة مباشرةً في الآزوت السائل.

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

المادة	الوسط A (المرحلة الأولى)	الوسط B (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°س لمدة دقيقة واحدة، ثم نقلت إلى المحلول B الموجود في طبق بتري آخر بدرجة حرارة38.5 °س وتركت لمدة 3 دقائق، ثم نقلت إلى طبق بتري يحوي IVF medium مضافا إليه 10% من مصل العجل المولود حديثاً لمتابعة النمو وغطيت بزيت البارافين وأعيدت إلى الحاضنة من أجل استئناف نموها.

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

خضعت النتائج للتحليل الإحصائي ، إذ استُخدم تحليل التباين لعاملين (فصل السنة وعمر الأم المانحة) عبر النموذج الخطي العام General Linear Model (GLM)، وتمت الإشارة إلى التداخلات المعنوية بين العوامل المدروسة، وحسبت معنوية الفروق بين نسب الإنضاج والإخصاب والانقسام والحيوية في المجموعات التجريبية وفقاً لاختبار فيشر (F). حللت البيانات بوساطة برنامج SPSS 17 (2010).

النتائج

أظهرت نتائج تحليل التباين (الجدول 1) وجود تأثير معنوي (P<0.01) لكل من فصل السنة وعمر الحيوان في العدد الكلي للبويضات التي جمعت 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 (فصل السنة، عمر الأم المانحة) في عدد البويضات ومعدلات الإنضاج (ماعدا تآثر فصل السنة والعمر)، والإخصاب والانقسام وعدد الأجنة الحية المتبقية بعد التجميد والإذابة.

الجدول (1) تحليل التباين لتأثير فصل السنة وعمر الحيوان في مؤشرات إنتاج الأجنة مخبرياً

مصدر التباين	درجة الحرية	متوسط المربعات				
		البويضات المجموعة	الإنضاج	الإخصاب	الانقسام	الحيوية بعد التجميد
فصل السنة (1)	3	378.14**	1768.33**	380.25**	69.42**	15.34**
العمر (2)	2	942.39**	2278.39**	393.6**	37.23**	22.41**
2*1	6	107.61**	$57.6^{n.s}$	40.09**	11.57**	4.77**
الخطأ التجريبي	96	508	50.31	8.26	2.35	0.96

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

تأثير فصل السنة:

بلغ العدد الكلي للبويضات التي جمعت من المبايض على مدار العام 1474 بويضة، وبمتوسط عام قدره 20 بويضة /المبيض. بلغ عدد البويضات التي جمعت في فصل الشتاء 277، والربيع 364، والصيف 399، والخريف 434 بويضة. بيّنت نتائج الدراسة أن العدد الكلي للبويضات التي اكتسبت القدرة على الإنضاج بلغ 627 بويضة، وكان المعدل العام لإنضاج بويضات المعز خارج الرحم 42.54%.

أشارت نتائج الدراسة (الجدول 2) أن أفضل معدل إنضاج كان في فصلي الخريف 50.46%، والصيف 46.37% دون وجود فرق معنوي، بينما كان أقل معدل في فصلي الربيع والشتاء 39.56%، 28.52%، على التوالي دون وجود فرق معنوي بينهما، عن فصلي الخريف والصيف.

بينت نتائج الدراسة (الجدول 2) أن عدد البويضات المخصبة بلغ 184بويضة، والمعدل العام للإخصاب 29.35%، وكان أفضل معدل إخصاب لبويضات فصلي الصيف (32.97%) والخريف (32.42%) دون وجود فرق معنوي، وأقل في الربيع 27.08% وبفارق معنوي عن الفصلين السابقين، بينما كان معدل البويضات المخصبة في فصل الشتاء الأقل وبلغ 16.46%.

أشارت نتائج الدراسة (الجدول 2) أن المعدل العام لانقسام البويضات المخصبة ووصولها إلى مرحلة التويتة بلغ 28.8%، وأن أفضل معدل للبويضات المنقسمة والقادرة على النمو حتى مرحلة التويتة كان خلال فصلي الخريف (36.62%) والصيف (29.51%) دون وجود فرق معنوي بينهما، وبفارق معنوي عن معدل الانقسام في فصل الربيع 23.08%، بينما لم تنجح البويضات التي جمعت في فصل الشتاء في الانقسام.

أشارت النتائج (الجدول 2) أن المعدل العام للأجنة التي أظهرت حيوية بعد التجميد والإذابة بلغ 47.17%، وتفوقت معدلات الأجنة المتبقية بعد التجميد والإذابة خلال فصلي الصيف (50%) والخريف (46.16%) دون وجود فرق معنوي، وبفارق معنوي عن معدلها في فصل الربيع الذي بلغ 44.44%.

الجدول (2) معدل إنضاج بويضات المعز وإخصابها وانقسامها والأجنة الحية المتبقية بعد التجميد والإذابة وفقاً لفصول السنة.

فصل السنة	البويضات المحضنة	البويضات الناضجة		البويضات المخصبة		البويضات المنقسمة (مرحلة التويتة)		الأجنة الحية بعد التجميد والإذابة	
	العدد	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%
الشتاء	[c]277	79	[b]28.5	13	[c]16.46	0	0	0	0
الربيع	[b]364	144	[b]39.5	39	[b]27.08	9	[b]23.08	4	[b]44.4
الصيف	[a]399	185	[a]46.3	61	[a]32.97	18	[a]29.51	9	[a]50
الخريف	[a]434	219	[a]50.4	71	[a]32.42	26	[a]36.62	12	[a]46.1
الكلي	1474	627	42.54	184	29.35	53	28.8	25	47.17

تشير الأحرف المتشابهة في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي ($P < 0.01$) بين المعدلات.

تأثير عمر الأم المانحة:

بلغ عدد البويضات المجموعة وفق الفئة العمرية للأنثى 326 بويضة في الفئة العمرية الأولى (< 1 سنة)، و528 بويضة في الفئة العمرية الثانية (1–2 سنة)، و620 بويضة في الفئة العمرية الثالثة (> 2 سنة).

بيّنت النتائج (الجدول 3) أن أفضل معدل إنضاج كان للبويضات المأخوذة من عنزات الفئة العمرية الثانية (1-2 سنة) وبلغ 47.16%، والثالثة (>2 سنة) 42.74% دون وجود فرق معنوي، وبفارق معنوي عن الفئة العمرية الأولى (<1سنة) البالغ (34.66%).

كما أشارت النتائج (الجدول 3) إلى تفوق البويضات المأخوذة من عن ذات الفئة العمرية الثانية (1-2 سنة) بمعدل إخصاب بلغ 34.54%، وبفارق معنوي عن الفئة العمرية الثالثة (>2 سنة) بمعدل 27.17%، بينما سجلت الفئة العمرية الأولى (<1 سنة) أقل معدل 23.01%.

بينت النتائج (الجدول3) وتفوقت بويضات الفئة العمرية الثانية (1-2 سنة) بمعدل انقسام 31.4%، وبفارق معنوي عن الفئتين الباقيتين.

أظهرت نتائج الدراسة(الجدول 3) تفوق الفئة العمرية الثالثة (>2 سنة) بمعدل بلغ 68.42% تلتها الفئة العمرية الثانية بمعدل44.44% دون وجود فرق معنوي، بينما لم تتمكن أجنة الفئة العمرية الأولى (<1 سنة) من البقاء على قيد الحياة.

الجدول (3) معدل إنضاج بويضات المعز وإخصابها وانقسامها والأجنة الحية المتبقية بعد التجميد والإذابة وفقاً لعمر الأم المانحة

العمر	البويضات المحضنة	البويضات الناضجة		البويضات المخصبة		البويضات المنقسمة (الجسم التوتى)		الأجنة الحية بعد التجميد والإذابة	
	العدد	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%
< 1 سنة	[b]326	113	[b]34.66	26	[c]23.01	7	[c]26.92	0	0
1-2 سنة	[a]528	249	[a]47.16	86	[a]34.54	27	[a]31.4	12	[a]44.44
> 2 سنة	[a]620	265	[a]42.74	72	[b]27.17	19	[b]26.39	13	[a]68.42
الكلي	1474	627	42.54	184	29.35	53	28.8	25	47.17

يشير تشابه الأحرف في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي (p<0.01) بين المعدلات

التآثر المشترك لفصل السنة وعمر الأم المانحة:

أظهرت النتائج (الجدول 4) أنّ التآثر بين فصل السنة وعمر الأم المانحة كان معنوياً (P<0.05) في عدد البويضات المجموعة. إذ تزايد عددها مع زيادة عمر الأم المانحة واقتراب فصل التناسل. فبلغ العدد الأكبر (189 بويضة) في فصل الخريف والفئة العمرية الثالثة (>2 سنة)، وتلتها البويضات التي جمعت في فصل الصيف من الفئة العمرية نفسها (166 بويضة) دون أن تختلف معنوياً عن عدد البويضات التي جمعت خلال فصل الربيع من الفئة العمرية نفسها والبالغ 149 بويضة، ثم جاءت البويضات التي جمعت في فصلي الصيف (143 بويضة) والربيع (131 بويضة) من الفئة العمرية الثانية (1-2 سنة). واتضح أنّ أقل عدد بويضات جمعت خلال فترة الدراسة كانت تلك الخاصة بالفئة العمرية (<1 سنة)، بغض النظر عن فصل الجمع.

الجدول (4) عدد البويضات المجموعة مخبرياً في الفئة العمرية الواحدة وفق فصل السنة

العمر (سنة)	فصل السنة			
	الربيع	الصيف	الخريف	الشتاء
1 >	[c]84[A]	[c]88[A]	[b]83[A]	[c]71[B]
2-1	[b]131[C]	[b]143[B]	[a]162[A]	[b]90[D]
2 <	[a]149[B]	[a]166[A]	[a]189[A]	[a]116[C]

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

ويبين الجدول (5) التآثر المشترك بين فصل السنة وعمر الأم المانحة في معدل إنضاج البويضات المحضنة مخبرياً، إذ تفوقت البويضات التي جمعت في فصل الخريف من الفئة العمرية الثانية (1-2 سنة) بمعدل نضجها فبلغ56.17%، تلتها بويضات الفئة العمرية الأولى المجموعة في الفصل نفسه بمعدل 51.52%، ثم جاءت البويضات المجموعة في فصل الصيف من الفئة العمرية الثانية (1-2 سنة) بمعدل إنضاج قدره 50.35%، وكان أقل معدل إنضاج (28.45%) للبويضات المجموعة في فصل الشتاء من الفئة العمرية الثالثة (>2 سنة).

الجدول (5) معدل إنضاج بويضات المعز مخبرياً في الفئة العمرية الواحدة وفق فصل السنة

العمر	الربيع		الصيف		الخريف		الشتاء	
	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%
1> (سنة)	(67)26	$^{b}38.81^{B}$	(73) 35	$^{b}47.95^{A}$	(66)34	$^{b}51.52^{A}$	(57)18	$^{a}31.58^{C}$
2-1	(131)58	$^{a}44.27^{C}$	(143)72	$^{a}50.35^{B}$	(162)91	$^{a}56.17^{A}$	(90)28	$^{a}31.11^{D}$
2<	(149)60	$^{b}40.27^{B}$	(166)78	$^{b}46.99^{A}$	(189)94	$^{b}49.74^{A}$	(116)33	$^{b}28.45^{C}$

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

بيّنت النتائج (الجدول 6) عدم وجود فرق معنوي (P>0.01) في معدل إخصاب بويضات الفئة العمرية الثانية (1-2سنة) التي جمعت في فصل الصيف (38.89%)، وفصل الخريف (36.26%) ،وفصل الربيع (34.48%)، وبفارق معنوي عن معدل إخصاب بويضات الفئة العمرية الثالثة (>2سنة) المجموعة في فصلي الصيف (28.21%) والخريف (29.79%)، وكان أقل معدل إخصاب (11.11%) للبويضات المجموعة في فصل الشتاء من الفئة العمرية الأولى (<1سنة).

الجدول (6) معدل إخصاب بويضات المعز مخبرياً في الفئة العمرية الواحدة وفق فصل السنة

العمر	الربيع		الصيف		الخريف		الشتاء	
	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%
1> (سنة)	7	$^{b}26.92^{A}$	8	$^{c}22.86^{B}$	7	$^{c}20.59^{B}$	2	$^{b}11.11^{C}$
2-1	20	$^{a}34.48^{A}$	28	$^{a}38.89^{A}$	33	$^{a}36.26^{A}$	4	$^{b}14.29^{B}$
2 <	12	$^{c}20^{B}$	22	$^{b}28.21^{A}$	28	$^{b}29.79^{A}$	7	$^{a}21.21^{B}$

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

أشارت النتائج (الجدول 7) إلى تفوق البويضات التي جمعت في فصل الخريف من الفئة العمرية الثانية (1-2 سنة) في قدرتها الكبيرة على الانقسام بمعدل بلغ 45.45%، تلتها البويضات التي جمعت في فصل الخريف من الفئة العمرية الأولى (<1 سنة) بمعدل بلغ (42.9%)، وكان أقل معدل انقسام للبويضات المجموعة في فصل الربيع من الفئة العمرية الثانية (1-2 سنة) بمعدل 15%، بينما لم تنقسم البويضات المخصبة التي جمعت في فصل الشتاء.

الجدول (7) معدل انقسام بويضات المعز مخبرياً في الفئة العمرية الواحدة وفق فصل السنة

العمر(سنة)	الربيع		الصيف		الخريف	
	العدد	%	العدد	%	العدد	%
1>	2	$^{a}28.6^{B}$	2	$^{b}25^{B}$	3	$^{a}42.9^{A}$
2-1	3	$^{b}15^{C}$	9	$^{a}32.14^{B}$	15	$^{a}45.45^{A}$
2 <	4	$^{a}33.33^{A}$	7	$^{a}31.82^{A}$	8	$^{b}28.57^{A}$

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

أوضحت نتائج الدراسة (الجدول 8) عدم تمكن الأجنة التي مصدرها بويضات عائدة لعنزات من الفئة العمرية الأولى (<1 سنة) من البقاء حية بعد التزجيج والإذابة بغض النظر عن العمر وفصل الجمع.

الجدول (8) معدل حيوية أجنة المعز المنتجة مخبرياً في الفئة العمرية الواحدة وفق فصل السنة

العمر (سنة)	الربيع		الصيف		الخريف	
	العدد	%	العدد	%	العدد	%
2 -1	1	$^{b}33.33^{B}$	5	$^{a}55.56^{A}$	6	$^{b}40^{B}$
2 <	3	$^{a}75^{A}$	4	$^{a}57.14^{B}$	6	$^{a}75^{A}$

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

أظهرت الأجنة التي جمعت في فصلي الخريف والربيع من الفئة العمرية الثالثة (>2 سنة) القدرة الأكبر للبقاء (75%) بعد التجميد والإذابة، وكانت أقلها تلك التي جمعت في فصل الربيع من الفئة العمرية الثانية (1-2سنة) بمعدل بقاء 33.33%.

المناقشة

أشارت نتائج الدراسة إلى أن عدد البويضات التي جمعت من العنزات المانحة خلال فترة الدراسة تأثر معنوياً (P<0.01) بفصل السنة وبلغ 18.8% و24.7%، و27%، و29.5 في فصل الشتاء والربيع والصيف والخريف، على التوالي. وهذا قد يكون له علاقة باستجابة المبايض لهرمونات النخامية المنشطة للقند وانعكاس ذلك على معدل نشاطها ونمو البويضات الذي يزداد مع اقتراب إناث المعز من الفصل التناسلي (الخريف).

تأثّر عدد البويضات التي جمعت معنوياً (P<0.01) بعمر الأم المانحة، بحيث ازداد مع تقدم العمر، فبلغت نسبة البويضات التي جمعت من عنزات عمرها أقل من سنة 22.1%، وبعمر 1-2 سنة 35.8%، و42% بعمر أكبر من سنتين، وهذا يتوافق مع ماأشار إليه Romaguera وزملاؤه (2011) في جمعهم لبويضات من مبايض عنزات غير بالغة وبالغة في إسبانيا، كما جاءت نتائجها مخالفة لما توصل إليه Samake وزملاؤه (2000) الذين لم يلاحظوا وجود تأثير للفصل في قابلية بويضات المعز لبلوغ الإنضاج

المخبري، حيث أشارت نتائج الدراسة (الجدول 3) إلى وجود تأثير معنوي (P<0.01) لموعد جمع البويضات خلال فصول السنة في معدلات إنضاج بويضات المعز، فكان أعلاها في فصل الخريف (50.46%) وزاد بنحو 4.1، و10.9% و21.94% عن معدلات الانضاج التي ظهرت في الصيف، والربيع، والشتاء، على التوالي، وهذا قد يعود إلى تأثير التغذية التي كانت سائدة خلال فصول السنة ومدى تأثيرها في الحالة الفيزيولوجية للحيوان.

أشار O'Callaghan وزملاؤه (2000) إلى أن التغير في تغذية الحيوان يسبب تغيرات سريعة وآنية في معدل الفعاليات الاستقلابية ولاسيما ما يتعلق بالإنسولين والغلوكوز، إذ يؤثر التغير في الإنسولين بشكل كبير في تركيز العوامل المشابهة للأنسولين (IGF-I وIGF-II) التي تعد من العوامل الهامة التي تفرزها البويضة وتؤدي دوراً هاماً في إنضاج البويضات.

كما اختلفت نتائج الدراسة مع Izquierdo وزملائه (1999)، ومع Mogas وزملائه (1997) الذين لم يلحظوا وجود تأثير معنوي في معدلات إنضاج البويضات التي مصدرها عنزات بعمر أكبر أوأقل من سنة، وحصلوا على معدلات إنضاج (71.4% مقارنة مع 81.4%) و(72.4% مقارنة مع 64.1%)، على التوالي. حيث أشارت نتائج الدراسة (الجدول4) إلى وجود تأثير معنوي (P<0.01) لعمر العنزات المانحة في معدلات إنضاج البويضات (34.66%، و47.16%، و42.74%) في الفئات العمرية الثلاث (<1سنة، 1-2سنة، >2سنة) على التوالي، وهذا قد يُعزى إلى اختلاف الحالة الفيزيولوجية للحيوانات عند جمع البويضات، وإلى إمكانية احتواء مبايضها على بويضات تختلف في درجة نموها وتطورها (الطائي، 2003).

أشارت نتائج الدراسة أيضاً (الجدول 2) إلى وجود تأثير معنوي (P<0.01) لموعد جمع البويضات خلال فصول السنة في معدل إخصاب بويضات المعز، فكان أفضلها في فصل الصيف (32.97%) والخريف (32.42%) وزاد بنحو 5% و16% عن معدل الإخصاب في الربيع والشتاء، على التوالي. وجاءت نتائج الدراسة مخالفة لما توصل إليه Samake وزملاؤه (2000) وRocha وزملاؤه (1998) الذين لم يلحظوا وجود تأثير للفصل في نجاح إخصاب بويضات المعز والبقر على التوالي.

تبيّن أيضاً وجود تأثير معنوي (P<0.01) لعمر العنزات المانحة في معدلات الإخصاب (23.01%، و34.54%، و27.17%) في الفئات العمرية الثلاث (<1سنة، 1-2سنة، >2سنة) على التوالي، وهي لم تتوافق مع Izquierdo وزملائه (1999) الذين لم يلحظوا وجود تأثير معنوي في معدلات إخصاب البويضات التي مصدرها عنزات بعمر أكبر أو أقل من سنة، وحصلوا على معدلات إخصاب (37.5% مقارنة مع 44.2%).

كان معدل الانقسام في هذه الدراسة أعلى من معدل الانقسام (25.64%) الذي حصل عليه Mondal وزملاؤه (2008)، وقريب (31.4%) من الذي حصل عليه Keskintepe وزملاؤه (1998)، وضمن المجال (11-38%) الذي حصل عليه Younis وزملاؤه (1991).

أشارت نتائج الدراسة (الجدول 2) إلى تفوق معنوي (P<0.01) لمعدل انقسام بويضات المعز التي جمعت في الخريف (36.62%) وزاد بنحو 3 و13% عن معدل انقسام البويضات التي جمعت في الصيف والربيع على التوالي. أشار Al-Katanani وزملاؤه (2002) إلى أن الموسم الحار يخفض من قابلية بويضات أبقار الهولشتاين على التطور الجنيني المبكر ضمن الوسط الزرعي بعد الإخصاب، وعزوا 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.

جاءت نتائج الانقسام المخبري للبويضات المخصبة في الفئات العمرية الثلاث في هذه الدراسة متقاربة من بعضها،على الرغم من وجود فرق معنوي (الجدول 3) وراوحت بين 26.39 % و31.4%، ما يشير إلى أن البويضات المنقسمة عند هذه المجموعات وصلت إلى القدرة التطورية الذاتية التي تمكنها من متابعة الانقسام في المراحل اللاحقة بعد الإخصاب (Samake وزملاؤه، 2000).

أشارت نتائج الدراسة (الجدول 2) إلى وجود تأثير معنوي (P<0.01) لموعد جمع البويضات خلال فصول السنة في معدلات حيوية الأجنة بعد التجميد والإذابة، وكان أفضلها تلك التي جُمعت في الصيف (50%) وزاد بنحو 4% و6% عن التي جمعت في الربيع والخريف، على التوالي.

كما أشارت نتائج الدراسة (الجدول 3) إلى أن الأجنة الناتجة عن بويضات جمعت من عنزات بعمر أكبر من سنتين كان لها القدرة وبصورة معنوية على مقاومة إجهادات التزجيج والإذابة بصورة أكبر من نظيراتها التي بعمر 1-2 سنة (68.% مقارنة مع 44.4%).

الاستنتاجات

ــ يمكن الاعتماد على المسالخ كمصدر منخفض الكلفة في برامج إنتاج أجنة المعز خارج الرحم خلال فصلي الصيف والخريف من عنزات بعمر أكبر من سنة.

ــ يمكن الحصول على عدد كبير من البويضات باتباع طريقة تشطيب المبايض من أجل استخدامها في عمليات الإنضاج، والإخصاب، والزرع، والتزجيج.

References المراجع

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

المجموعة الإحصائية الزراعية السورية. 2010. الحيوانات الزراعية ومنتجاتها، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي.

المزيد، محي. 1986. فيزيولوجيا التناسل والتلقيح الاصطناعي، جامعة حلب.

زكريا، عبد الحميد وسليمان سلهب. 1991. فيزيولوجيا التناسل والتلقيح، جامعة دمشق.

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.

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., M. Ahmed-Ali., A. Martino and Y. Cognie. 1992. *In Vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. Theriogeno., 37:1049-1060.

Duby, R. T. P. Damiani., C. R. Looney., R. A. Fissore and J. M. Robal. 1996. Prepubertal calves as oocytes donors: promises and problem. Theriogeno., 45: 121-130.

Earl, C. R., R. C. Fry., L. J. Maclellan., J. M. Kelly and D. T. Armetrong. 1998. *In Vitro* fertilization and development potential of prepubertal calf oocytes. Rome. Italy :Serono symposia p: 115-137.

Izquierdo, D., P. Vilamediana and M. T. Paramio. 1999. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM- IVF oocytes. Theriogeno., 52: 847-861.

Keskintepe, L., A. A. Simplicio and B. G. Brackett. 1998. Caprine blastocyst development after *In Vitro* fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. Theriogeno., 49:1265-1274.

Lu, K. H., D. S. Shi, H. S. Jiang, D. Goulding, M. P. Boland and J. F. Roche. 1991. Comparison of the developmental capacity of bovine oocytes from superovulated and non stimulated heifers. Theriogeno., 35: 234.

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.

Mogas, T., M. J. Palomo, M. D. Izquierdo and M. T. Paramio. 1997. Morphological events during *In Vitro* fertilization of prepupertal goat oocytes matured *In Vitro*. Theriogeno., 48: 815-829.

Mondal, A., M. A. Khandoker., A. H. M. Rahman., A. S. Apu and S. Pervage 2008. *In Vitro* production of goat embryos. Bang. J. Anim. Sci. 37: 1-9.

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 bovine oocytes cultured *In Vitro*. J. Agri. and Food Res. 36:123-124.

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.

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

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 Rumin. Res., 35:49-54.

Younis, A. I., K. A. Zuelke, K. M. Harper, M. A. Oliveria and B. G. Brackett. 1991.*In Vitro* fertilization of goat oocytes. Biol. Repord., 44: 1177-1182.

Received	**2014/11/26**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2014/12/18**	**قبول البحث للنشر**