

**EFFECT OF EXTENDERS AND GLYCEROLIZATION
PROCEDURES ON SOME CHARACTERISTICS
OF FROZEN BULL SEMEN**

Karem. I. Al-Badry,¹ Towfiq. W. Al-Douri and
Hussin H. Alr,¹ College of Agriculture,
University of Salah Alddin,¹ Animal Breeding,
Station Abu-Ghraib.²

SUMMARY

This study was carried out in Artificial Insemination Department / Abu-Ghraib on Friesian bulls born in Iraq. Twenty four ejaculates were used in two experiments to study the suitability of three procedures of adding glycerol namely "G₁, G₂ and G₃" to extenders "TYG, TYFG, SMYLG and Laci".

The results of this study could be summarized as follows:-

- a. Interaction between extender and type of adding glycerol was significant in some characteristics.
- b. The type two of adding glycerol "G₂" had had results in extenders on Frozen semen characteristics.
- c. No significant difference between the two type of adding glycerol "G₁ and G₂ ", but G₂ had good results more than G₁ in SMYLG extender. So the type on G₁ of adding glycerol was suitability if used type one G₁ of adding glycerol was suitability if used "TYG, TYFG and Laci" extenders. And type three G₃ if used SMYLG extender.

- Kupferschmid, H. (1976) Effect of processing ministrav at room temperature resp. (Sic) at +5C° on non return rate. VIII. Inter. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insemmi 12. "A.B. Abs, 45: 174".
- Miller, W.J. and Van Demark, N.L. (1954) The influence of glycerol level various temperature aspects and certain other factors on the survival of bull spermatozoa at sub zero temperature. J. Dairy. Sci. 36: 45.
- Morris, G.R. Burton, L.J. and Pitt. C.J. (1984) spera losses during deep freezing of bull semen. 10th. Inter congr. Anim. Reprod. Artifi. Insem, 202.
- Page, R.D. Gebauer, M.R. and Pickett, B.W. (1968) Extending bull semen with post frozen diluents, A.I. Digest, 307.
- Parrish, J.J. and Foote, R.H. (1981) Optimal Procedure for "Tes" Bes or "Mops" in extenders for freezing bovine spermatozoa J. Anim. Sci., 53: 356. :Suppl:.
- Polge, C. and Jakobsen, K.F. (1959). Techniques of freezing bull semen. Vet. Rec., 71:44.
- Polge, C. and Rowson, L.E. (1952) Result with Bulls semen stored at -79C°. Vet. Rec., 64: 351.

الراوي، خاشع محمود وحلف الله، محمود عبد العزيز (1980) "تصميم وتحليل التحارب الزرامية" دار الكتب للطباعة والنشر - جامعة الموصل.

REFERENCES

- Ali, H.H. (1983) Freezing of cattle and buffalo bull semen in liquid nitrogen. Ph. D. Thesis Alex. Univ. Egypt.
- Benson, R.W., Sexton, T.Y., Pickett, B.W. Lucas, J. and Gabauer, M.R., (1968). Influence of processing techniques and dilution rates on survival of frozen bovine spermatozoa. Connecticut "storrs". Agr. Exp. Stat. Res. Rept., 28.
- Blackshaw, A.W. (1960). The effect of pH, tonicity and temperature of glycerolation on the revival of ram and bull spermatozoa after freezing to -79°C . Aust. Vet., 36: 376.
- Crabo, G. Heuer, C.M.N., Tahir, Wierzbowsk, S. and Hambl. N. (1980) Effect of extenders, glycerol and equilibration time on the freezing of water buffalo Semen. 9th. Inter. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insemi, 425.
- Duncan, D.B. (1955) Multiple range and Multiple "F" tests. Biometrics, 11: 1-42.
- Foote, R.H. (1970) Influence of extender, extension rate and glycerolation technique on fertility of frozen bull semen. J. Dairy. Sci, 53: 1478.
- Foulkes, J.A. Goodey, R. and Stewart, D.L. (1977) Fertility of bovine semen frozen in four diluents for use in artificial insemination with semen frozen in lipoprotein diluent. J. Rep. Fert, 51: 175.
- Graham, E.F., Voget, D.W. and Fisher, G.P. (1958). Effect method of glycerol addition on the fertiltity of frozen bovine spermatozoa. J. Dairy. Sci. 41:1553.
- Hultnaes, C.A. (1982) Deep freezing preservation of water buffalo semen. World. Amin. review, 42: 45, "Short communication".

جدول (2) المتوسطات + الخطأ التقاسمي لبعض صفات السائل النضوي المجمد بمخفف 100:1 وثلاث مستويات من الأضافة الكليسرول الميه .

الصفات	الحركة الفردية (%)	الحيوية (%)	دليل الحيوية (دقيقة)	النظف الميته (%)	تشوهات الرأس (%)	تشوهات الذيل (%)
G ₁	0.790±57.92 ^a	2.852±77.90 ^a	6.433±63.56 ^{ab}	1.822±28.96 ^a	0.965±6.65 ^a	0.862±3.96 ^a
G ₂	0.300±54.58 ^b	2.335±72.45 ^b	4.814±59.46 ^{ab}	1.795±32.65 ^b	0.927±10.79 ^{ab}	1.238±4.04 ^a
G ₃	1.421±58.34 ^a	2.399±78.46 ^a	5.065±66.71 ^{ab}	1.450±27.85 ^a	1.169±6.81 ^{ab}	0.832±2.44 ^a

الحروف القوية المتشابهة ضمن نفس العمود تدل على عدم وجود اختلاف معنوي بين المتوسطات ولا اختلفت معنيا (P 0.01) والحروف المختلفة المقرونة بحلقة (*) تدل على وجود اختلاف معنوي بين المتوسطات (P 0.05) .

و G₃) كما واختلف عنهما معنويا في معظم الصفات المدروسة ولاغلب المخففات. وقد يرجع سبب تأثير هذه الطريقة على النظف المجمدة بهذه المخففات الى تعرض بعض النظف للكمية العالية من الكليسرول عند اضافة الجزء الثاني من المخفف (B) وقبل البدء بعملية المزج لتوزيع الكليسرول في هذا الجزء على الخليط الناتج. كما وان لعملية المزج نفسها تأثير على تلك النظف حيث اشار (Polge and Jakobsen, 1959) بان احتواء المخفف الاطلي على الكليسرول قد يقلل الخلل المنتسب من اضافة الجزء الثاني الذي يحتوي على الكمية الكاملة منه وذكر (Morris et al., 1984) بان عملية المزج من مصادر الغدد الذي يحصل في النظف عند اضافة الكليسرول.

شالهنما: ان الطريقة الثالثة لاضافة الكليسرول (G₃) اختلفت حسابيا لكنه لم يختلف معنويا عن الطريقة الاولى (G₁) في معظم الصفات المدروسة. كما وان الطريقة الثالثة كان تأثيرها ايجابيا على مخفف ال SMYLG بدرجة اكبر من الطريقة الاولى. ان هذا المخفف لم يختلف معنويا عن الحففتين TYG و TYFG في بعض الصفات المدروسة ضمن هذه الطريقة مقارنة بالطريقة الاولى. واكد (Blackshaw, 1960) بان مخفف الحليب اكثر المخففات تأثيرا بالدرجة الحرارية التي يضاف فيها الكليسرول.

يستنتج من الدراسة بانه يمكن اتباع طريقة اضافة الكليسرول بدفعة واحدة (G) للمخففات (Laci, TYFG, TYG) ومخفف SMYLG طريقة بدفتين (G₃) . لذا فان الاستجابة لاي طريقة لاضافة الكليسرول لغرض تجميد السائل المتنوي

للشيران تعتمد على نوع المخفف.

الجدول رقم (٢) وجود اختلاف معنوي بمستوى ($P < 0.01$) بين الطريقة الثانية وكل من الطريقتين (الاولى والثالثة) في صفتي الحركة الفردية والحيوية، اما في صفة دليل الحيوية فقد اختلف معنويا ($P < 0.05$) الطريقة الثانية عن الثالثة ولكن لم يكن هناك اختلاف معنوي بين الطريقتين (الاولى والثانية) وما بين (الاولى والثالثة).

وفيما يتعلق بنسبة النطف الميتة، يظهر من الجدول نفسه وجود اختلاف معنوي بمستوى ($P < 0.01$) بين الطريقتين (الثانية والثالثة) وبمستوى ($P < 0.05$) بين (الاولى والثانية) ولم يكن هناك اختلافا معنويا بين الطريقتين (الاولى والثالثة). ويتضح من الجدول رقم (٢) بان اعلى حركة فردية ودليل الحيوية للنطف واقل نسبة نطف ميتة كانت في الطريقة الثالثة لاضافة الكليسرول ولبسه الطريقة الاولى واخيرا الثانية.

- نسبة النطف المشوّهة الرأس والذيل:

وبلاحظ من الجدول رقم (٢) الذي يتضمن متوسط تشوهات الرأس في الطريقة الاولى والثانية والثالثة والذي بلغ (1765 ± 960 ، 794 ± 107 ، 227 ± 81 ، 179 ± 17 %) على التوالي، وجود اختلافا معنويا ($P < 0.05$) بين الطريقة الثانية وكل من الطريقتين (الاولى والثالثة)، لكن لم يظهر اختلافا معنويا بين الطريقتين (الاولى والثالثة). اما في صفة تشوهات الذيل وفي الجدول رقم (١) ايضا يلاحظ عدم وجود اختلاف معنوي بين الطرق الثلاثة (الاولى والثانية والثالثة).

يتضح من الجدولين رقم (١ ، ٢) ثلاثة امور:-

أولهما: وجود تداخل معنوي بين المخفف وطرق اضافة الكليسرول لبعض الصفات المدروسة، و اشار كل من (Kupferschmied, 1970; Foot, 1970) بان الاستجابة لاضافة الكليسرول في اي درجة حرارية تعتمد على تركيب المخفف. ثانيهما: ان الطريقة الثانية لاضافة الكليسرول (G_2) الذي فيه قسم المخفف الى جزئين (B+A) حيث ان الجزء (A) لا يحتوي على الكليسرول. اما (B) يحتوي على ضعف نسبة الكليسرول النهائية والذي يضاف بدرجة حرارة 5 م. م. كان له تأثير سلبي على النطف المجمدة بالمخففات، حيث اظهر اقل النتائج في الصفات الايجابية، و اعلى في الصفات السلبية مقارنة بالطريقتين الاولى والثالثة (G

٢١٥٤٠٧٠±٠٥% اختلفا معنويا بمستوى ($P<0.01$) عن الطريقة الثالثة في نسبة تشوهات الرأس وبمستوى ($P<0.05$) عن الطريقة الاولى في تشوهات الرأس بينما لم يكن بينهما اختلفا معنويا في نسبة تشوهات الذيل.

وعند المقارنة في الجدول رقم (١) بين الطرق الثلاثة لاضافة الكليرول ولكل مخفف من المخففات الثلاثة في الصفات:

أ- الحركة الفردية والحيوية ودليل الحيوية ونسبة النطف الميتة:

يتضح بان الطرق الثلاثة لاضافة الكليرول وفي اي مخفف من المخففات الثلاثة لم يكن بينهما اي اختلاف معنوي في الصفات (الحركة الفردية والحيوية ونسبة النطف الميتة)، ولا في صفة دليل الحيوية في الخففين TYFG, TYG, اما في مخفف SMYLG, وفي هذه الصفة اختلفت الطريقة الثانية معنويا ($P<0.05$) عن الثالثة. لكن لم يكن الاختلاف معنويا بين الطريقتين الاولى والثانية ولا بين الاولى والثالثة.

ب- نسبة النطف المشوهة:

بلاط من جدول رقم (١) عدم وجود اختلاف معنويا بين الطرق الثلاثة في تشوهات الرأس ضمن مخفف TYG وفي تشوهات الذيل ضمن نفس المخفف ومخفف TYFG كما وان الطريقة الاولى لم تختلف معنويا عن الطريقتين الثانية والثالثة في تشوهات الرأس وضمن المخففين TYFG و SMYLG, وفي المخفف الاخير لم يكن هناك اختلاف معنوي بين الطريقتين الاولى والثانية في تشوهات الذيل. لكن في هذا المخفف كانت نسبة النطف المشوهة الرأس والذيل في الطريقة الثالثة ($11.44 \pm 3.23\%$, $2.94 \pm 0.95\%$) اقل معنويا ($P<0.01$) عن الطريقة الثانية ($20.56 \pm 7.80\%$, $15.71 \pm 2.27\%$) وبالتعاقب. اما الطريقة الاولى فكانت نسبة النطف المشوهة الذيل فيه ($19.05 \pm 0.98\%$) اعلى معنويا ($P<0.05$) من الطريقة الثالثة. اما بالنسبة للمخفف TYFG فقد اختلفت معنويا ($P<0.05$) الطريقة الثالثة ($17.81 \pm 0.99\%$) عن الطريقة الثانية ($12.73 \pm 0.48\%$) وفي تشوهات الرأس فقط.

ثانيا: تأثير طرق اضافة الكليرول في مخفف Laci على:

الحركة الفردية، الحيوية، دليل الحيوية ونسبة النطف الميتة، بوضع

المخفف الى ثلاثة اضعاف لفرز التبريد والتعادل ثم اجري التجميد في النيتروجين السائل (-196°م).

بعد عملية التجميد اجريت الاسالة بدرجة حرارة 27°م لمدة 30 ثانية ثم اجريت الفحوصات التالية على السائل المنوي المسال وهي ١- الحركة الفردية ٢- الحيوية ٣- دليل الحيوية ٤- نسبة النطف الممتة ٥- نسبة النطف المشوهة الرأس والذيل.

التحليل الاحصائي

اجري التحليل باستخدام تصميم القطاعات العشوائية (Randomized Complete Block Design) وكتجربة عاملية بالنسبة لنتائج التجربة الاولى. وكتجربة بسيطة لنتائج التجربة الثانية وحسب الراوي وخلف الله (1980) . وباستخدام اختبار Duncan, 1955 للمقارنة بين متوسط المعاملات المدروسة.

النتائج والمناقشة

تأشير طرق اضافة الكليسرول في المخففات TYFG, TYG, SMYLG على :-

١- الحركة الفردية , الحيوية , دليل الحيوية ونسبة النطف الممتة :

يتضح من جدول رقم (١) وعند المقارنة بين هذه الطرق وبغض النظر عن المخففات عدم وجود اختلاف معنوي بين الطرق الثلاثة لاضافة الكليسرول. وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه (Page et al., 1968; Benson et al., 1968; Blackshaw, 1960; Parrish and Foote, 1981) لكن لم تتفق مع نتائج (Parrish and Foote, 1981) ،
بد نسبة النطف المشوهة الرأس والذيل:

بين جدول رقم (١) عدم وجود اختلاف معنوي بين الطريقتين الاولى والثالثة في نسبة تشوهات الرأس والذيل. حيث بلغت نسبة النطف المشوهة الرأس في هاتين الطريقتين (٩٤٢±١٠٧٠.٠ ، ٧٤٦±٩٣٠.٠) ونسبة النطف المشوهة الذيل (٢٣٦±٢٣١٠.٠ ، ٢٨٢±٢٠١.٠) وبالعناقب. لكن الطريقة الثانية الذي فيها نسبة النطف المشوهة الرأس ١٤١±١٠٥٤.٠% والذيل

محاولة لامكانية رفع كفاءة تلك المخففات في حماية النطف من تأثير التجميد
لدفع طريقة تجميد السائل المنوي للشيران في القطر الى الامام.

المواد وطرق العمل

اجريت هذه الدراسة في قسم التلقيح الاصطناعي / ابي غريب على شيران
الفريزيان النقية والمولودة في العراق. وقد وضعت تلك الشيران تحت ظروف
رعاية وادارة موحدين.

وكان يتم جمع السائل المنوي مرة واحدة اسبوعيا من كل شور وبواسطة
المهبل الاصطناعي من النوع الدانمركي واختبرت (24) قذفة لانتقل حركتها
الفردية عن 70% وموزعة على تجربتين (12 قذفة لكل تجربة) حيث تناولت
التجربة الاولى دراسة تأثير طرق اضافة الكليسروال الى المخففات (الترس -
صغار البهيض - كليسروال TYG ومخفف الترس - صغار البهيض - فركتوز - كليسروال
TYFG ومخفف حليب الفرز - صغار البهيض - لاكتوز - كليسروال SHYLG) اما
التجربة الثانية فقد تناولت دراسة تأثير طرق اضافة الكليسروال الى المخفف
المستورد الليفسوس (Laci) ويعبر عن الطريقة الاولى (G_1) بطريقة دفعة واحدة
(One step) وهو ان المخفف يحتوي على الكليسروال بنسبته النهائية ويضاف الى
السائل المنوي المجمع - حديثا وبدرجة حرارة 38 °م وحسب (Foulkes et al 1977)
اما الطريقتين الاخيرتين (G_2 و G_3) فيعبر عنهما بطريقة الدفعتين
(Two step) اي يقسم المخفف الى جزئين (A و B) حيث ان الجزء (A) في
الطريقة الثانية (G_2) لا يحتوي على الكليسروال ويضاف الى السائل المنوي
المجمع حديثا. اما الجزء (B) والذي يحتوي على ضعف نسبة الكليسروال
النهائية. يضاف عند درجة حرارة 5 م وبمرحلتين بين واحدة واخرى 15 دقيقة
وحسب (Alio, 1983) اما الطريقة الثالثة (G_3) فان الجزء (A) يحتوي على
مايعادل 3% كليسروال ويضاف الى السائل المنوي المجمع حديثا. اما الجزء (B)
فيحتوي على مايعادل 11% كليسروال ويضاف عند درجة حرارة 5 م وبمرحلتين بين
واحدة واخرى 15 دقيقة وحسب تعليمات الشركة الفرنسية المنتجة لمخفف
الليفسوس المستورد.

بعد اجراء عملية التخفيف في المعاملات المدروسة نقل السائل المنوي

المقدمة

توصلت التجارب في علوم الحياة الى امكانية حفظ الخلايا والانسجة والكائنات الدقيقة بدرجات التجميد باستعمال محاليل تحتوي على الكليسرول لكونه من المواد القابلة للذوبان في الماء وذو وزن جزئي منخفض، كما ان له القدرة على انتاج تراكيز جزيئية عالية في الدرجات الحرارية المنخفضة وبالتالي فان دخوله الى داخل النطف سوف يعادل ارتفاع تراكيز الكهارل عند التجميد و اشار (Polge & Rowson, 1952) بان التقنية الذي يتم اتباعها قبل عملية التجميد يشكل القاعدة الاساسية للتطورات الاخيرة في هذا المجال وقد اختلفت الدراسات حول الدرجة الحرارية التي يضاف بها الكليسرول قبل عملية التجميد. ففي دراسة لـ (Miller and Van Demark, 1954) تم فيها مقارنة اضافة الكليسرول في المخففات بثلاث درجات حرارية هي 0°، 10°، و 15° م°، فكانت حركة النطف بعد التجميد 47.4، 53.4، و 71.4% على التوالي. وذكر (Parrish and Foote, 1981) بان اضافة الكليسرول بدرجة حرارة 0 م° تكون الحركة اعلى معنويًا من اضافته بدرجة حرارة 30 م°. لكن في دراسات اخرى لم يلاحظوا اي اختلاف معنوي في حركة النطف المجمدة عند اضافة الكليسرول بدرجة حرارة الغرفة او بدرجة حرارة 0 م° (Blackshaw, 1960; Benson et al., 1968; Page et al., 1968; Ali, 1983).

وفي الدراسات الحقلية لاحظ (Graham et al., 1958) عدم وجود اختلاف معنوي بين الاخصاب للابقار عند اضافة الكليسرول بدرجة حرارة 5، 10، و 20 م° اضافته مباشرة للسائل المنوي المجمع حديثًا، كما توصل (Foote, 1970) الى عدم وجود اختلاف معنوي بين نسب الاخصاب للابقار عند اضافة الكليسرول بدرجة حرارة 5 م° ودرجة حرارة الغرفة.

من جهة اخرى اشار (Kupferschmied, 1976) بان الاستجابة لاضافة الكليسرول في اي درجة حرارية تعتمد على تركيب المخفف، و اضاف بان نسب الاخصاب للابقار لم تتأثر بالدرجة الحرارية التي يتم فيها اضافة الكليسرول واكد ذلك (Crabo et al., 1980; Hultnaes, 1982) بدراساتهم على الجاموس ولفرض اختيار الطريقة الملائمة لاضافة الكليسرول الى المخففات التي يتم استخدامها في تجميد السائل المنوي للثيران، فقد اقترحت هذه الدراسة في

تأثير طرق اضافة الكليسرول للمخففات على بعض
صفات السائل المنوي المجمد للثيران

كريم عويد البديري ١، توفيق وهيب الدوري ١ وحسام حسين علي ٢، كلية
الزراعة، جامعة صلاح الدين ١، محطة تربية الحيوان، ابي غريب ٢.

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة في قسم التلقيح الاصطناعي / ابي غريب على ثيران
الفريزيان الهولندية والمولودة في العراق، وقد خضعت للدراسة (٢٤) قذفة
وفي تجربتين منفصلتين تناولتا دراسة تأثير طرق اضافة الكليسرول (G_2 , G_3 ،
 G_4) على المخففات TYG، TYFG، SMYLG والمخفف المستورد الليفوس (Laci)
على بعض صفات السائل المنوي المجمد، وذلك لاختيار الطريقة الملائمة لاضافته
للمخففات التي يتم استعمالها في تجميد السائل المنوي لثيران الفريزيان.
ولخصت نتائج الدراسة بمايلي:-

- أ. ظهر وجود تداخل معنوي بين المخففات وطرق اضافة الكليسرول لبعض الصفات
المدروسة.
- ب. ان الطريقة الثانية (G_2) كان لها تأثير سلبي على المخففات في درجة
محافظة على النطف من تأثير التجميد.
- ج. اختلفت الطريقة الثالثة (G_3) حسابيا وليس معنويا عن الطريقة الاولى
(G_1) في معظم المخففات المدروسة، وان الطريقة الثالثة كان لها تأثير
ايجابي على مخفف SMYLG بدرجة اكبر من الطريقة الاولى.
- لذا يمكن اتباع الطريقة الاولى (G_1) عند استخدام المخففات (Laci،
TYG، TYFG) اما عند استخدام مخفف SMYLG فيتمتع الطريقة الثالثة (G_3) في
اضافة الكليسرول اليه.