

حول إمكانية التحكم بتكاثر بعض الأسماك ذات الأهمية الاقتصادية في البحر الأبيض المتوسط

مثال: القاروس (غبار) *Dicentrarchus labrax* L.

دراسة حيوية النطاف واستعمالها في التلقيح الاصطناعي

د. أديب سعد

مدرس في كلية الزراعة

جامعة تشربن

لقد أظهرت دراستنا لحياة الخلايا التناسلية الذكرية داخل الجهاز التناسلي لسمك القاروس أن خواص الحيوانات الصنوية تتضاعف على مدار دورة التكاثر ، وبشكل خاص حركتها وقدرتها على الحفظ والتجميد .

وقد بيّنت النتائج أنه من الممكن حفظ نطاف القاروس في الثلاجة على درجة ٤٤ م ° لمدة عددة أيام إذا أخذ السائل المنوي والحيوانات المنوية من الذكور خلال الفترة الأولى من موسم التكاثر . أما إذا أخذت في أواخر موسم التكاثر فإن إمكانية حفظها لا تتعدي بضع ساعات .

ومن النتائج الهامة لدراستنا وضع تكنيك للتلقيح الاصطناعي عند سمك القاروس (غبار) حيث أوضحت هذه الدراسة أن ماء البحر الممدد حتى درجة ملوحة ٢٠ في الألد وذى درجة حموضة pH تساوى ٩/٦ يشكل سائلاً أفضل من ماء البحر العادي ذي الملوحة ٣٧/٣ في الألد لاستعماله في عمليات تلقيح البيوض .

وقد تم وضع مخطط عملي يبيّن مراحل استخلاص الخلايا التناسلية الذكرية والأثروية ومن ثم إجراء عمليات التلقيح الاصطناعي بواسطة المحلول المذكور أعلاه .

اصطناعياً ، لنتتمكن من سد الحاجة المتزايدة إليها . ومن المعلوم أن التحكم بتكاثر نوع معين من الأسماك يجب أن يسبق تفهم كامل وعمرنة تامة بكيفية إنتاج خلايا التكاثر والعوامل الفيزيائية الملائمة لتطورها وحفظها ونقلها أثناء إجراء عمليات التلقيح والإخصاب .

وبما أن سمك القاروس (شكل رقم ١) يعتبر من أنواع الأسماك الهامة في البحر الأبيض المتوسط القابلة للتربية اقتصادياً

المقدمة :

دللت إحصائيات الصيد التي أجريت خلال السنوات الأخيرة أن الكميات المصطادة من بعض الأسماك الهامة اقتصادياً ومنها سمك القاروس لارتفاع بل تتناقص أحياناً وهذا يدل على أن المخزون السمكي في خطير ولا يمكننا الاستمرار في الاعتماد على الصيد فقط كمصدر رئيسي للأسماك . بل يجب التوجه نحو تطوير الزراعة المائية لهذه الأنواع عن طريق التحكم بتكاثرها

(BARNABE 1985) والمتميزة

بجودة لحمها فإن الأهمية الاقتصادية لهذا النوع دفعت الباحثين إلى دراسته بشكل واسع ، بحيث سمحت النتائج التي تم التوصل إليها عبر السنوات العشر الماضية بالتحكم بـ تقنية الإكثار والتربية والتغذية إلى حد لا يُأمل ، ولكن يقيس في معظمها ناتجة عن التفريخ الطبيعي ، حيث تجمع الأمهات والأباء في أحواض تسمى أحواض التفريخ ، ثم تُؤخذ البيوض الملقة من على سطح الحوض وتنقل إلى أحواض التحضين . أما إنتاج سمك القاروص عن طريق التلقيح الاصطناعي فما يزال في بدايته ، والهدف من بحثنا التالي هو تحديد الشروط الفيزيائية والكيميائية المثلثة لتمرير خلايا التكاثر الذكرية أثناء استخدامها في عمليات التلقيح الاصطناعي . ثم دراسة تطوير حيوية الخلايا التناسلية الذكرية على مدار موسم التكاثر ، سواء بقيت داخل الجهاز التناسلي (IN VIVO) أو بعدها أثناء محاولة حفظها خارج الجسم في المخبر (IN VITRO) بانتظار إجراء عمليات التلقيح والإخصاب . لما لذلك منفائدة تتمثل في :

- رفع نسبة إخصاب البيوض .

- تقليل الهدر في خلايا التكاثر الذكرية والأنوثوية .

- تسهيل وتبسيط عمليات التلقيح والإخصاب لضرورتها في العمل المخبري وعمليات التهجين لتحسين الأصناف التجارب الوراثية ، وعمليات نقل البيوض والبيطاف من مكان آخر .

من ماء البحر ذي الملوحة الممدة حتى ٢٠ في الألف) داخل أنبوب اختبار . تؤخذ فيما بعد عينة صغيرة من محلول وتحفص تحت المجهر بأقصى سرعة ممكنة بعد تمديدها ثم يليها عينات أخرى على فترات متباينة ومنتظمة حتى التوقف التام للحيوانات المنوية عن الحركة . لقد تم الفحص على درجة حرارة الغرفة أي ٢٠ م° وفق مقياس حيوية الحيوانات المنوية المذكورة في التجربة الأولى .

وقد تم تكرار هذه التجربة ثلاثة مرات متباينة فيما بينها خلال موسم التكاثر (أي في أشهر كانون الأول ، كانون الثاني وشباط) وتم مقارنة النتائج فيما بينها .

تجربة ثالثة :

حفظ النطاف بحالتها الطبيعية (بدون تمديد) على درجة حرارة ٤ م° في المختبر : (IN VITRO) أجريت التجربة على ٨ ذكور أخذ منها النطاف وحفظت بحالتها الطبيعية (أي بدون تمديد) في الثلاجة على درجة ٤ م° .

أثناء فترة الحفظ يتم أخذ عينات من النطاف المخزنة وتمدد داخل أنابيب اختبار بنسبة ١/١٠٠٠ في ماء البحر ذي الملوحة الممدة حتى ٢٠ في الألف ثم تؤخذ عينات من النطاف الممدة وتحفص مباشرة تحت المجهر العادي بتكبير ١٠٠ مرة .

وبذلك نقدر مدة حياة النطاف بناءً على شدة حركة الحيوانات المنوية المقاسة مباشرة بعد التمديد .

وبهدف دراسة تطور قدرة النطاف على مدار موسم التكاثر تم إجراء التجربة خلال ثلاثة فترات مختلفة من الموسم في كانون أول وكانون الثاني وشباط .

ضمن إطار دراسة الشروط الفيزيائية والكميائية الملائمة لحياة الخلايا التناسلية عند استخدامها في عمليات التلقيح الصناعي ، قمنا بدراسة شدة حركة الحيوانات المنوية بوساطة المجهر العادي (بالتكبير ١٠٠ مـرة) لعينات من النطاف بعد تمديدها في محليل صناعي ذات تراكيز متزايدة مع ملح كلور الصوديوم NaCl (٥ إلى ٤٠ غ / لتر) ومن شاردة الهيدروجين أي درجة الحموضة (pH) حيث يتم ضبط تراكيز الأخيرة عن طريق إضافة ملح التريس (Tris) إلى محلول ومعاييره إذا لزم الأمر بحمض كلور الماء (HC1) .

وبعد مراقبة حركة الحيوانات المنوية تحت المجهر داخل محليل المذكور أعلاه تم رسم الخطوط البيانية التي تمثل تطور شدة الحركة مع تطور درجة الملوحة ودرجة الحموضة .

تم إجراء التجربة نفسها داخل ماء البحر العادي والممدد وفي درجات حموضة مختلفة .

أما مقياس حيوية النطاف فيتم وفق سلم تقديري اصطلاحي مدرج من صفر (حيث كل الحيوانات المنوية عديمة الحركة تماماً) إلى خمسة (كل الحيوانات المنوية تتحرك بعنف بشكل أمواج) (جدول رقم ١) .

تجربة ثانية : اختبار حيوية النطاف على مدار موسم التكاثر :

تم أخذ حجوم متساوية من نطاف ٨ ذكور وجرى خلطها مع بعضها قبل أن تؤخذ عينات من الخليط وتمدد بنسبة ١٠٠ (١/١٠٠) ميكروليتر من النطاف إلى أمل

تجربة رابعة :

دراسة العلاقة المثلثى بين عدد البيوض وكمية النطاف وحجم محلول التمديد أثناء عمليات التلقيح الاصطناعي ؟
بعد استخلاص البيوض من الإناث تجزأ بيوض كل أنثى إلى عدة أجزاء ثم يتم تلقيح كميات متزايدة من هذه البيوض (١٠٠ - ٥٠٠ - ٥٠٤ - ٥٠٠ ملليغرام) مع كميات مختلفة أيضاً من النطاف أي بتمددات متزايدة ٣ - ٢ - ١ - ٠. حيث تخلط كل عينة من البيوض بـ ٥ مل من محلول التلقيح ثم يضاف للخليل ٥٠٤، ٥٠٠، ٥٠٠٠ ميكروليتر من النطاف أي بمعدل ٣ - ٢ - ١ - ٠، على التالى .

بعد إجراء هذه العملية يتم تحضير البيوض الملقة في أحواض ذات حسراة شابة للمياه (١٧٢٠) لمدة أربعة أيام . يتم قياس نسبة الإخصاب بحساب نسبة البيوض المخصبة إلى مجمل البيوض الملقة بعد ثلاثة أيام من تلقيحها (أي قبل الفقس بوقت قصير) .

أما بالنسبة للتحليل الإحصائي للنتائج فقد تم تحليل متوسط التغييرات عن مستوى قيمة الشاهد بطريقة (مربع الانحراف المعياري) جدول رقم ١ . سلم يمثل درجات حركة الحيوانات المنوية حسب سرعتها الملحوظة تحت المجهر من مفر إلى ٥ (مأخوذة عن سعد ١٩٨٨) .

القيمة	ملاحظات
٥	الحيوانات المنوية تتحرك بشكل سريع جداً على شكل أمواج .
٤	تحرك الحيوانات المنوية بسرعة أقل ولكن من الصعب ملاحظة حركتها تحت المجهر .
٣	تنتقل الحيوانات المنوية بسرعة ومن الممكن ملاحظة خط حركتها تحت المجهر .
٢	تشعر الحيوانات المنوية ببطء ومن السهل ملاحظة خط سيرها بشكل إفراطي .
١	تحرك الحيوانات في مكانها فقط دون أن تنتقل إلى مكان آخر .
٠	لا يوجد أي حركة للحيوانات المنوية

النتائج والمناقشة :

تتميز فسيولوجيا الحيوانات المنوية لسمك القاروص كما هو الحال عند معظم الأسماك ذات التلقيح الخارجي والتي درست حتى الآن بميزيتين رئيسيتين : الأولى :

عدم الحركة داخل السائل المنوي سواء قبل خروج النطاف من الخصية أو بعدها .

الثانية :

مدة الحياة القصيرة جداً بعد بداية حركتها الناتجة عن التمرير في وسط خارجي .

الخلوية في أواخر موسم التكاثر وتمثل هذه التحولات في اشتفاف حتى تمرّز الغلاف الهيولي . من ناحية أخرى استطعنا أن نلاحظ في نهاية موسم التكاثر حركة بسيطة تلقائية للحيوانات المنوية أثناء فحصنا لعينات من النطاف تحت المجهر العادي بعد استخلاصها من الذكور مباشرةً أو قبل تمريرها في أي وسط خارجي علمًا بأن هذه الظاهرة لا يمكن ملاحظتها أبداً في بداية موسم التكاثر .

السابقة (BARNABE 1980) أن الدراسة النسيجية للخصية السمكية قد بيّنت أن كل الحيوانات المثلوية يتسلّم تشكّلها قبل أن تبدأ مرحلة نضوج النطاف ثم يتم إطلاقها خارج الخصيّتين بالتدريج خلال فترة التكاثر والتي تبلغ قصوتها في شهري كانون الثاني وشباط في البحر الأبيض المتوسط. وهكذا تكون الحيوانات المثلوية المتاحصل عليها في نهاية موسم التكاثر أطول عمرًا من تلك المأخوذة في بداية الموسم (شكل رقم 3) .

لذا فإنه من المحتمل أن الحركة
التلقائية للحيوانات المنوية المفترزة
في نهاية فترة التكاثر ناتجة عن تغير
في فسيولوجيا النطاف وتغير في التركيب
الكيميائي للسائل المنوي كما هو الحال عند

سمك التروبيت (Salmo gairdnerie) والسلمون (Onchorhynchus keta) مؤدية إلى نفاذ الطاقة في وقت مبكر عند الحيوانات المنوية وبالتالي إلقاء خصموول هذه النطاف وتربي صفاتها .

ويجب الإشارة إلى أن تراجع المفات
الحيوية للنطاف مع تقدم موسم التكاثر
تمت ملاحظته سابقاً عند أسماك عائلة
السلمونيات (Salmonidae) والتي

وبهدف البحث عن محلول أمثل لتمرير
النطاف إلى تحقيق أفضل استعمال لها
عند إجراء عمليات التلقيح الاصطناعي
ثم اختبار ماء البحر على درجات مختلفة
من التمرير (أي تخفيف نسبة الملوحة
بإضافة الماء العذب إليها).

وعلى درجات حموضة pH متدرجة بين ۵ و ۱۰ حيث كنا قد لاحظنا سابقاً عند أنواع أخرى من الأسماك كالتروبيت والكارب والرنجور أن نسبة الإخصاب تتأثر كثيرة بدرجة حموضة ماء الماء.

ير، بحسب حموضه محتوى التفريح .
وقد بيّنت النتائج كما ثری فی
الشكل (2) أن ماء البحر ذي الملوحة نحو
٢٠ بالألف ودرجة حموضة بين ٩٨ و ٩٦ يمثل
الوسط الأکثر ملائمة لحركة الحيوانات
المنوية .

لقد توصلنا إلى النتائج نفسها عندما استبدلنا بماء البحر ملح كلور الصوديوم حيث تركيز الملوحة نفسها وكذلك درجة الحموضة (سكار . رقم 2B)

في المرحلة الثانية قمنا بدراسة تطور حيوية النطاف خلال موسم التكاثر عند سمك القاروص وقد بيّنت النتائج التي توصلنا إليها أن نطاف القاروص تتعرض لظاهرة الشيخوخة (فقدان الحيوية) على مدار فترة التكاثر والتي يدل عليها تباين مدة حركة الحيوانات المنوية بعد تمريرها في الوسط الخارجي كما يوضّحه الشكل رقم (3) .

تعدم موسم التكاثر أو قارب على الانهاء وكذلك يجب زيادة عدد الذكور بين الإناث عندما يكون التلقيح طبيعياً، من ناحية أخرى يجب الإشارة إلى أن الحيوانات المنوية لا يمكن حفظها البستة فيما إذا مددت أو وضعت في حالة حركة منذ البداية .

وفي سبيل إطالة أمد حفظ الحيوانات المنوية هذه لعله من المفيد إضافة مضادات حيوية إلى النطاف لمنع نمو البكتيريا أو حفظ النطاف في جو مشبع من الأكسجين حيث لاحظنا سابقاً أن هذه العمليات تزيد من أمد حياة الحيوانات المنوية عند سمك الكارب (SAAD et Biliard 1988) ، وسمك السومون (Sto 55 1988) والتروبيت (Sto 1988) .

بعد هذا قمنا بدراسة العلاقة المثلثة بين عدد البيوض الملقة وكمية النطاف ومحلول التمرير التي يجب استخدامها أثناء عمليات التلقيح الاصطناعي وذلك عن طريق تلقيح كميات متزايدة من البيوض بكميات متزايدة من النطاف داخل عجم شافت من محلول أي درجات تمرير ١٠-٣-٢٠ للنطاف على التوالي .

وقد دلت النتائج أن معدل الإخصاب أو النسبة المئوية للبيوض المخصبة تبقى شبه ثابتة بين مجموعات البيوض من ٦٠٠-١٠٠ مهما تكون نسبة تمرير النطاف . وهذا يؤكد أن زيادة عدد الحيوانات المنوية المخصصة لكل بويضة لا تؤدي إلى زيادة نسبة الإخصاب، وبما أنها نعلم أن كل مل من محلول يحوي ٦٠٠ إلى ١٠٠٠ بويضة في هذه التجربة نرى أنه يجب استعمال ليترتين من محلول التمرير و٢ ملليتر من النطاف لكل لتر من البيوض .

يمكن شرح محتواها باتفاق في كميةAMP Cyclic المنوى ، ويتحول في القدرة الإخصابية له في المرحلة الثالثة :

تم دراسة إمكانية حفظ النطاف بحالتها الطبيعية على درجة ٤٤م و ذلك بأربع عينات نطاف متساوية من ٨ ذكور خلال فترات مختلفة من موسم فرز الحيوانات المنوية وحفظها بحالتها الطبيعية (أي بدون تمرير) في الثلاجة على درجة ٤م داخل قوارير بلاستيك صغيرة سعة ٢٠ مل (سماكة عينة النطاف ١/٢ سم فقط) ومجطة بقطعة قطنية أو بالبارافين لمنع التبخر .

تم تقدير حيوية الحيوانات المنوية بقياس درجة حركتها تحت المجهر العادي (١٠٠٪) مباشرة بعد تمريرها بنسبة ١/١٠٠ في ماء البحر المخففة ملوحته إلى ٢٠ بالألف وفق مقياس مدرج من صفر (لا يوجد آية حركة للحيوانات المنوية) إلى خمسة (كامل الحيوانات المنوية تتحرك) بشكل أمواج متسرعة .

وقد تمت القياسات على فترات متالية بعد التمييد كل دقيقة حتى التوقف التام للحيوانات المنوية عن الحركة شكل (2)

وقد بيّنت النتائج أن قدرة النطاف على الاحتفاظ بحيويتها أثناء التخزين تتضاءل خلال موسم التكاثر فهي تصل إلى نحو ٤ أيام في شهر كانون الأول بينما لا تتعدي ١٢ إلى ٣٠ ساعة في شهر كانون الثاني و ٨ ساعات فقط في شهر شباط .

يستفاد من هذه النتائج بأنه يجب عدم إطالة مدة حفظ النطاف من جهة ومن جهة ثانية زيادة كمية هذه الأخيرة المستعملة في التلقيح الاصطناعي كلما

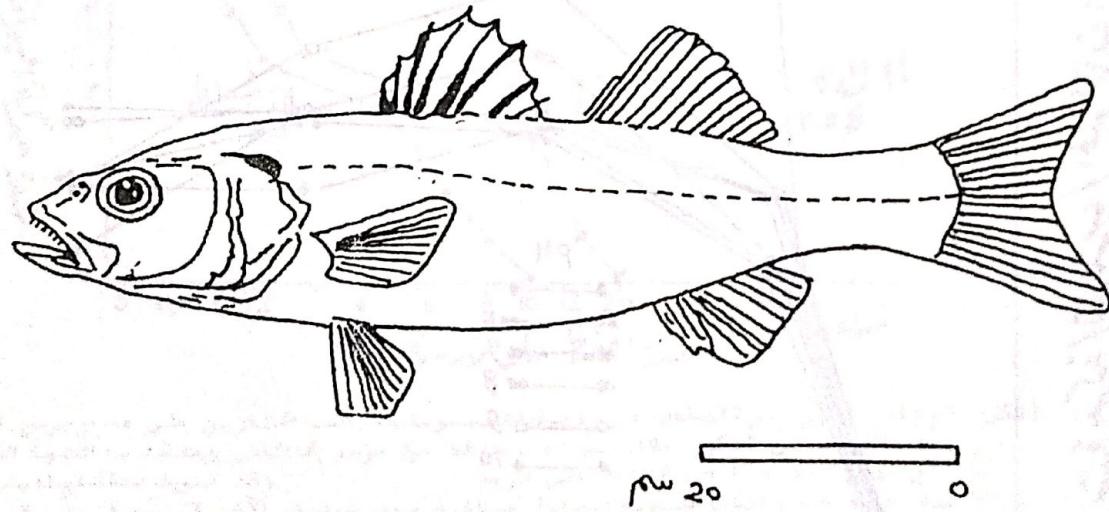
في الخلاصة يمكننا وضع مخطط لعمليات استخلاص خلايا التكاثر الذكرية والأنثوية ثم إجراء عملية التلقيح الاصطناعي كما في الشكل (6)

طريقة التحضير :

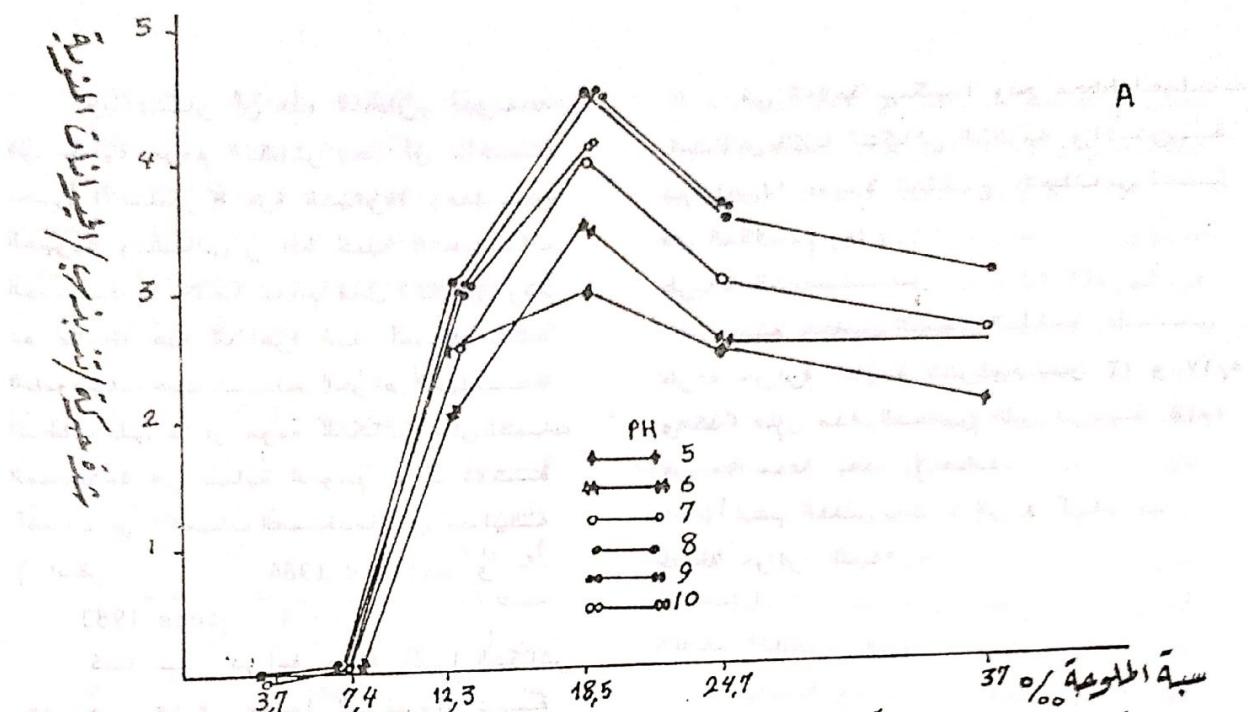
يتم تحضير البيوفن الملقة على درجة حرارة ثابتة تتراوح بين ١٣ و ١٧° . وهكذا فإن مدة التحضير على درجة ١٥° هي ٩٠ ساعة بعد الإخصاب . يتم الفقس بعد ٤ إلى ٥ أيام حسب درجة حرارة الماء .

وباعتبار أن هذه التجارب أجريت في بداية موسم التكاثر يجب أن نأخذ بعين الاعتبار ظاهرة الشيخوخة فقد ان الحيوانية وبالتالي زيادة كمية النطاف المستخدمة كلما تقدم فصل التكاثر وقد تم ملاحظة هذه الظاهرة عند أسماك عائلة السلمونيات حيث تتناقص الخواص الحيوانية للنطاف على مدار موسم التكاثر وأن الكميات المستخدمة في نهاية الموسم تزيد ثلاثة أضعاف عن الكميات المستخدمة في بدايتها (انظر Billard 1984 و Stoss 1983)

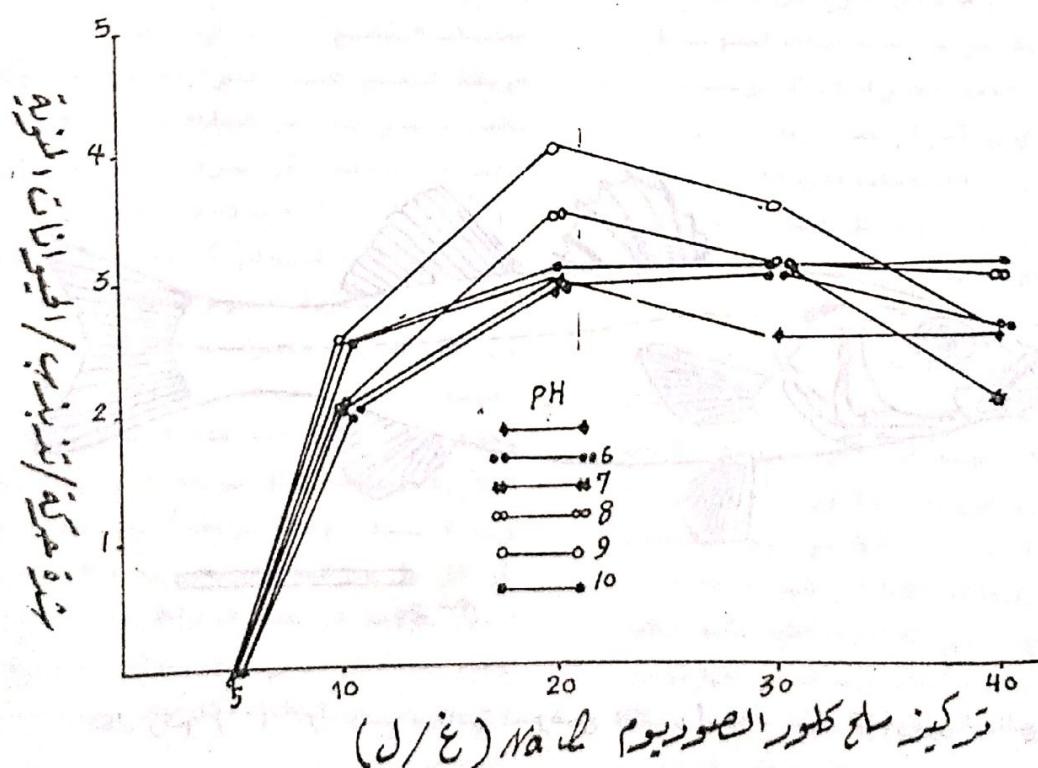
كما بيّنت دراسة حياة خلايا التكاثر بعد تمريرها في محلول التلقيح أن نسبة الإخصاب تتناقص بسرعة كبيرة بعد التمرير وتزداد سرعة التناقص هذه بازدياد نسبة التمرير (شكل رقم ٥)



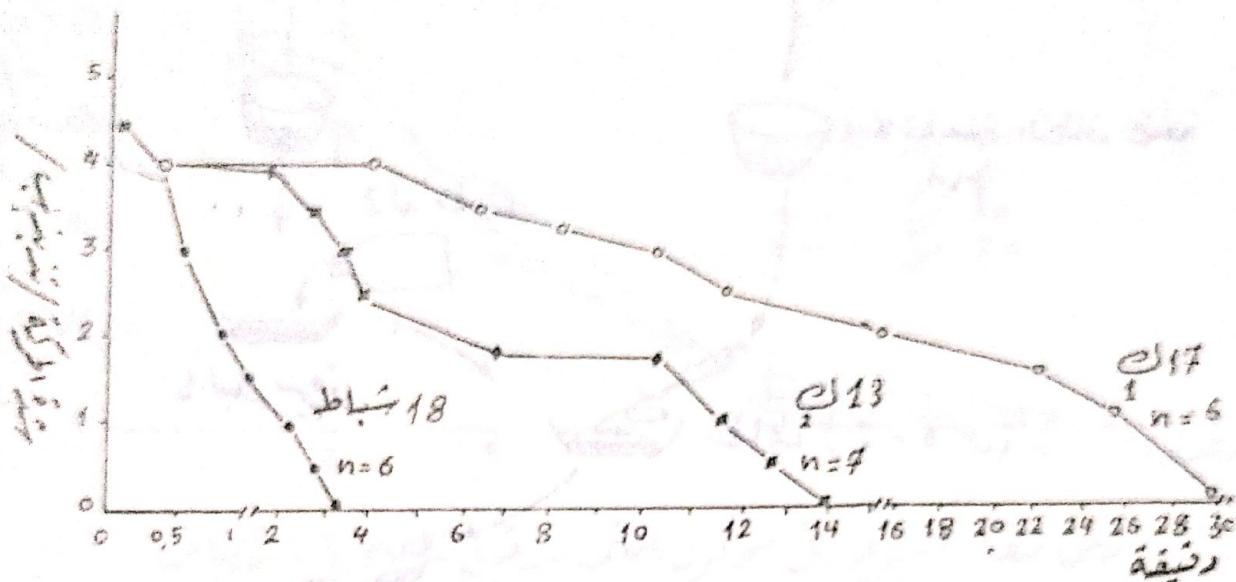
شكل رقم / ١ / : رسم بياني لتوضيح شكل وأبعاد سمك القاروس البالغ .



شركة الميورانات المنورة لسمك القراد بعد تجربتها بنسبة $\frac{1}{100}$ في عينات من ماء البحر المخففة الملوحة حتى 20% درجات درجة حموضة PH مختلفة

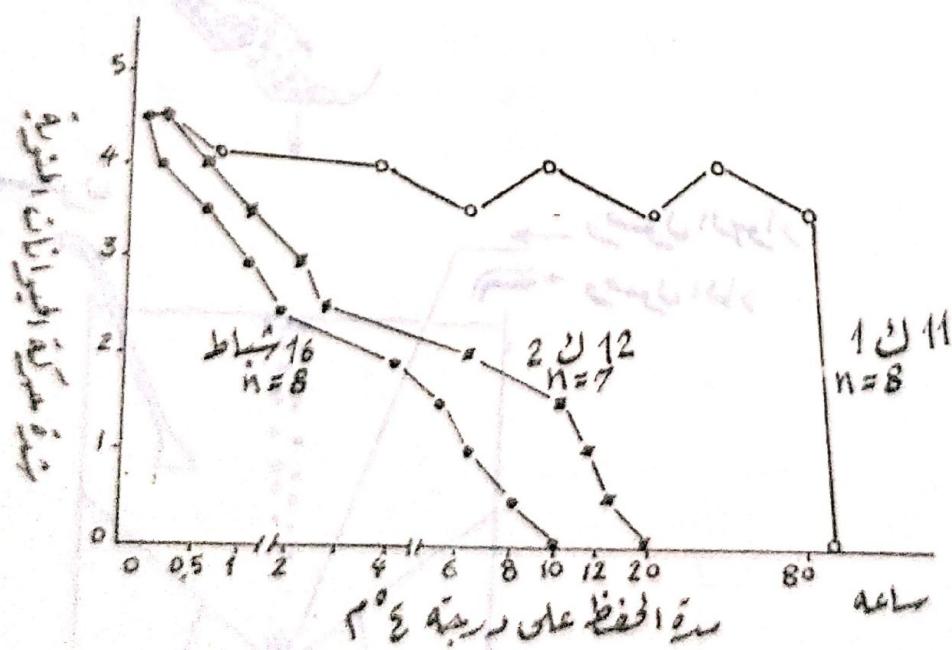


شكل رقم ٢/٢ : تأثير كل من درجة الملوحة ودرجة حموضة محلول تمديد النطاف على مدة حياتها بعد التمديد، سواء في ماء البحر العادي 2.3% أو في محلول ملحي اصطناعي من كلور الصوديوم (NaCl)

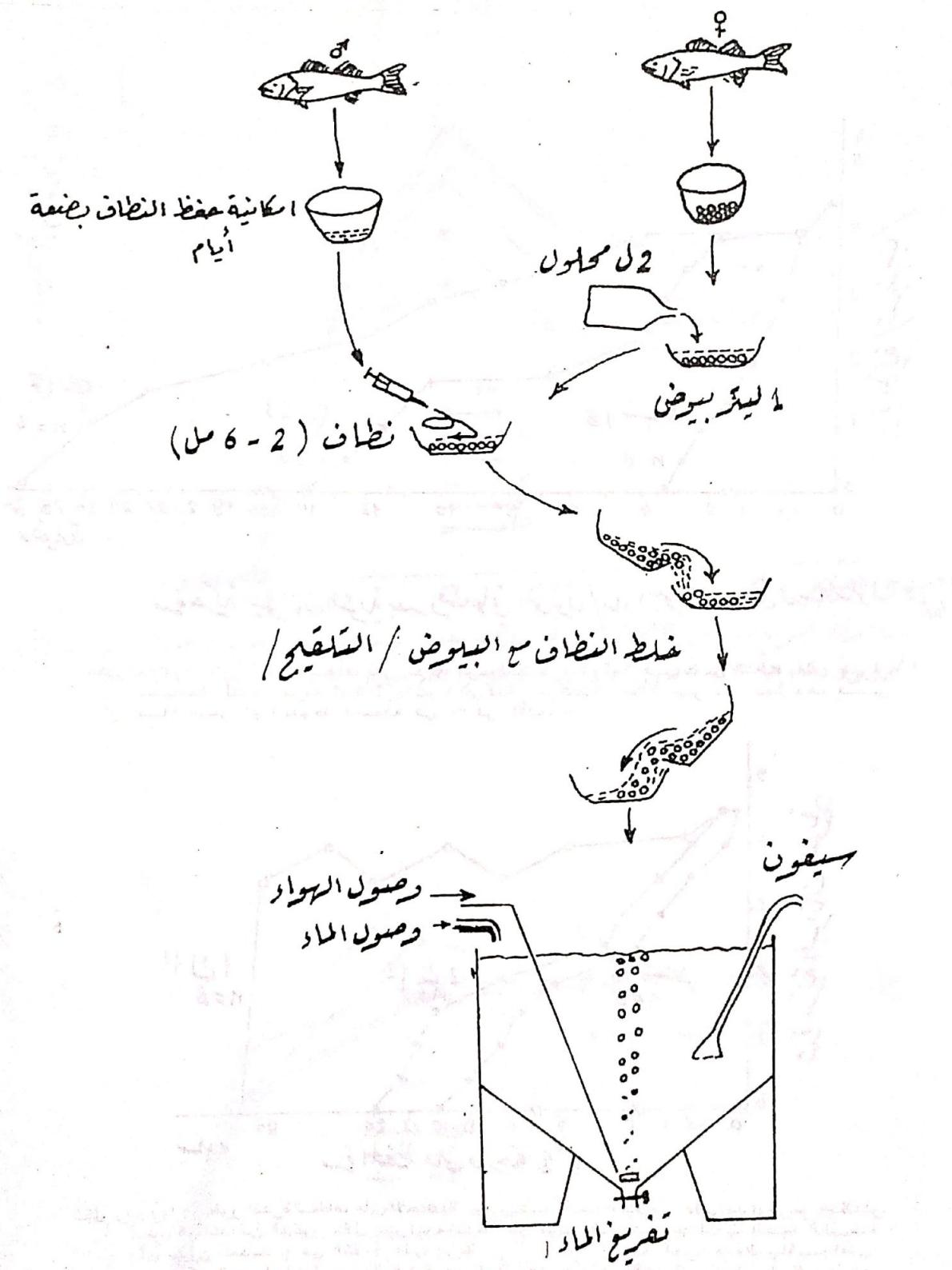


شكل رقم /٢: سرعة حركة الميراث المنوية بعد وضعها في الماء / ساد البحر العجمي درجة صفراء ٢٥٪

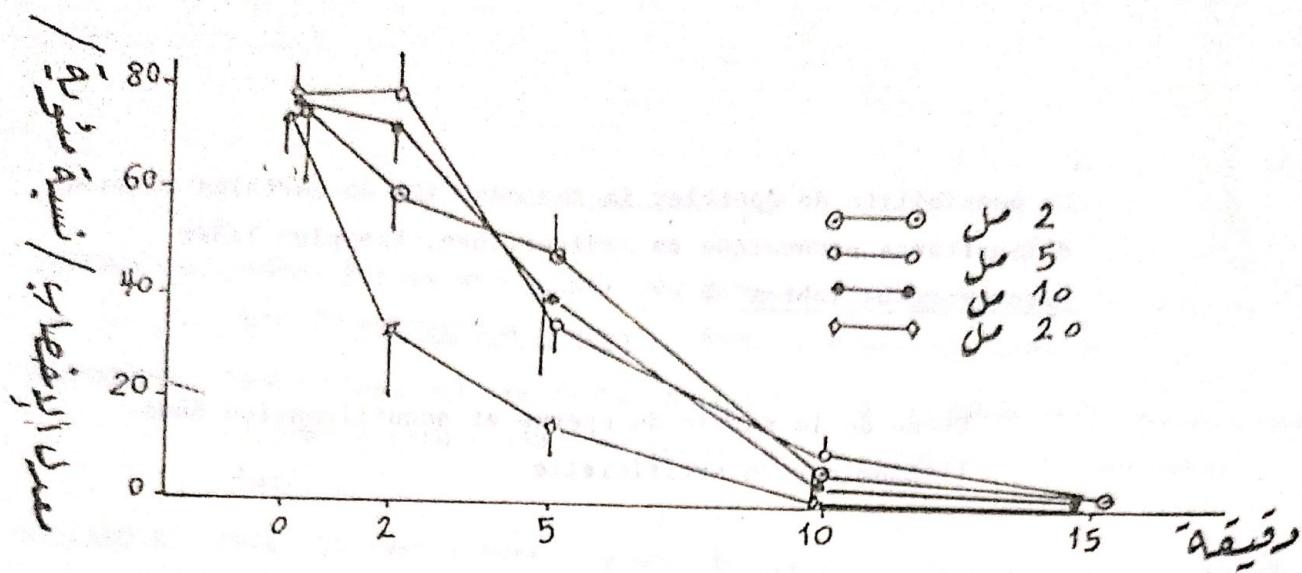
شكل رقم /٣: تطور حركة النطاف على مدار موسم التكاثر، تمأخذ عينات من النطاف على فترات متقدمة أيام موسم التكاثر، تم فحص شدة حركتها تحت المجهر بعد تمديدها في ماء البحر دي الملوحة المختلفة إلى ٢٠ في الألف.



شكل رقم /٤: تطور قدرة النطاف على الاحتفاظ بحركتها أثناء التغير في مدار موسم التكاثر. أخذت النطاف من الذكور خلال فترات مختلفة من موسم التكاثر وحققت بحالاتها الطبيعية (أي بدون تمديد) في الثلاجة على درجة وقد ثدرت هذه الحالة بينما على شدة حركة الجنينات الصناعية المقاييس بساعة بعد تمديد الأخيرة بنسبة ٢٠ في الألف في ماء البحر دي الملوحة ٢٠ في الألف.



حوض الرئتين



زمن بقاء البيوض في محاولة التهديد قبل تأثيرها بالنطاف

شكل رقم /٦: مخطط يبين مراحل عملية التلقيح الاصطناعي وتحضين البيوض الملقة عند سمك القاروس .

La possibilite de contoller la reproduction de certains poissons d'importance economique en mediterranee, Exemple: le Bar Dicentrarchus labrax L.

Etude de la survie du sperme et son utilisation dans l'insemination artificielle .

Resume

L'étude de la survie des gametes dans le tractus genitale du bar male , a montre que la qualite du sperme diminue durant la periode de reproduction , en particulier la motilite et l'aptitude a la conservation . Il est possible de conserver le sperme du bar au refrigerateur apres prelevement (plusieurs jours en debut de periode de spermiation mais seulement quelques heures en fin de spermiation). Une technique d'insemination artificielle a fait l'objet d'un debut de mise au point chez cette espece; l'eau de mer diluee, dont la salinite est ramenee a 20 P.1000 et tamponnee a pH 9, se revele etre un meilleur dilueur d'insemination que l'eau de mer a 37 P.1000 . Un schema pratique montrant les etapes de prelevement des gametes, male et femelle , puis la realisations de l'insemination artificielle a l'aide du dilueur mentionne ci dessu a ete montre .

المراجع

- BARANABE G., 1980. Expose synopctique des donnees biologiques sur le loup ou bar Dicentrarchus labrax. Syop. FAO peches, 126,70p.
- BARNABE G., 1958. L'aquaculture du bar D. Labrax. In BARNABE 1985 ;Aquaculture volume 2 (618 - 650) ed.Technique et Documentation Lavoisier , Paris .
- BILLARD R., 1970. Ultrastructure comparee de spermatozoides de quelques Poissons teleosteens . In : Comparative spermatologie proc. Ist.inst . Symp. Rome, siena, pp.71 - 83 .
- BILLARD R. 1984 . Spermatogenesis and spermatology of som teleost. fish specis. Reprod . Nutr . Devlop ., 26, (4) 877 - 920 .
- CRUEA D.D. 1969 . Some chemical and physical characteristics of fish sperm . Trans Am . Fish . Soc., 980 , 785 -788 .
- SAAD A., 1988. Production spermatogenetique , Evolution de la qualite et de l'aptitude a la conservation des spermatozoides au cours de l'annee chez la carpe Cyprinus carpio L. : Application a l'insemination artificielle . These de Doctorat d'Etat .Universite de Paris VI 157 P.
- SAAD A. BILLARD R. , THERON M.C., HOLLEBECO M.G. , 1988. Short term storage of milt from common carp Cyprinus carpio. Aquaculture 71 133-150.
- STOSS J. , 1983. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. 305- 350 In : Ws. HOAR,D.RENDALL , E.M.DONALADSON Eds. Fish physiology. Acad. Acad. Press, New - york, London .