

جمهورية العراق



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة المثنى / كلية الزراعة

قسم الإنتاج الحيواني

تأثير إضافة السائل الحويصلي البقري إلى الأوساط الزرعية المختلفة لإنضاج وإخصاب بويضات الأبقار مختبريا

رسالة تقدم بها

الطالب

حسين علي حسين القرغولي

إلى مجلس كلية الزراعة / جامعة المثنى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية / إنتاج حيواني

بإشراف

أ.د. علي عبد الله زعيري السعدون

بسم الله الرحمن الرحيم

((وَلَقَدْ خَلَقْنَا الْإِنْسَانَ مِنْ سَلَالَةٍ مِّنْ طِينٍ * ثُمَّ جَعَلْنَاهُ نُطْفَةً فِي قَرَارٍ مَّكِينٍ * ثُمَّ خَلَقْنَا النُّطْفَةَ عَلَقَةً فَخَلَقْنَا الْعَلَقَةَ مُضْغَةً فَخَلَقْنَا الْمُضْغَةَ عِظَامًا فَكَسَوْنَا الْعِظَامَ لَحْمًا * ثُمَّ أَنشَأْنَاهُ خَلْقًا آخَرَ فَتَبَارَكَ اللَّهُ أَحْسَنُ الْخَالِقِينَ))

صدق الله العلي العظيم

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المشرف

أشهد أن إعداد هذه الرسالة جرى تحت إشرافي في جامعة المثنى كلية الزراعة
قسم الانتاج الحيواني ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في العلوم
الزراعية .

المشرف

أ.د. علي عبد الله زعيري السعدون

كلية الزراعة - جامعة المثنى

توصية رئيس القسم

بناء على التوصيات المتوفرة أشرح هذه الرسالة للمناقشة .

أ.م.د. هادي عواد حسوني البركات

رئيس قسم الإنتاج الحيواني

إقرار لجنة المناقشة

شهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة ، اطلعنا على رسالة طالب الماجستير (حسين علي حسين) والموسومة (تأثير إضافة السائل الحويلي البقري إلى الأوساط الزرعية المختلفة إنضاج وإخصاب بويضات الأبقار مختبريا) وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها ، ونقر بأنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في الإنتاج الحيواني بتاريخ 2021 / 3 / 4

أ.د. حليم حمادي عيسى

رئيس اللجنة

جامعة واسط / كلية الزراعة

د. غسان سمیر دھیرب

عضو

جامعة المثني / كلية

أ.م.د. أحمد جواد عبد العالي

عضو

جامعة المثني / كلية الزراعة
الزراعة

أ.د. علي عبد الله زعيري

عضواً ومشرفاً

جامعة المثني / كلية الزراعة

صدقت هذه الرسالة من قبل مجلس كلية الزراعة / جامعة المثنى

أ.م.د. حيدر حميد بلاو

عميد كلية الزراعة / جامعة المثنى

الاهداء

أبي ...

شكر وتقدير

الحمد والشكر لله كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه ، عدد خلقه ورضا نفسه وزنة عرشه ومداد كلماته على أن من علي بإنجاز هذه الدراسة ، والصلاة والسلام على أفضل الخلق ورسول الرحمة محمد وعلى آله وصحبه وسلم تسليما كثيرا .

أتوجه بالشكر الجزيل الى أستاذي الفاضل المشرف الأستاذ المساعد الدكتور علي عبد الله زعيري السعدون الذي كان بعد الله المعين الأول على إتمام الدراسة فله كل التقدير والإمتنان .

كذلك الشكر موصولا الى عمادة كلية الزراعة جامعة المثنى وكل أقسام الكلية وكل الكادر التدريسي وكل من فرد في الكلية على أسلوبهم الراقي وتعاملهم الإنساني والعلمي .

شكر خاص للأستاذ المساعد الدكتور هادي عواد البركات والأستاذ المساعد الدكتور أحمد الياسري والأستاذ الدكتور علي حسين الهلالي والأستاذ الدكتور جاسم قاسم مناتي .

كل الشكر والتقدير والإحترام للدكتور حسين علي دهلي المسؤول عن مجزرة محافظة المثنى لما قدمه من مساعدة من أجل الحصول على العينات .

كذلك أود أن أشكر كل زملائي الطلبة وإخواني وأخواتي وجميع أصدقائي وكل من ساعد ولو بكلمة في إنجاز هذه الدراسة .

أتوجه ايضا بالشكر الجزيل لساعدي الأيمن أحمد عباس سعيد لشجاعته وتحمله مسؤولية العمل أثناء إنشغالي في الدراسة ، كذلك شكر وتقدير للأخ الطيب علي شهيد لتسهيل وتسيير امور عملي وباب رزقي وصبره علي لحين إكمال دراستي .

شكر معطر بالحب والامتنان لوالدتي ووالدة زوجتي وزوجتي لتحملهم بعدي عنهم ودعمهم المعنوي لي.

أما انت يا والدي كيف لي شكرك وانت تحت التراب يا عزيز قلبي انت الحافز والداعم الأول والأقوى في مسيرة حياتي أكملها ، الهي بعزتك اعزه في قبره وإسكنه في جنانك مع نبيك الأكرم وآله الأطهار .

حسين

قائمة المحتويات list of contents

الصفحة	الموضوع	التسلسل
3-1	introduction : المقدمة الفصل الأول	1
30-4	literature review : مراجعة المصادر الفصل الثاني	2
4	in vivo إنتاج الأجنة داخل الجسم الحي	1-2
4	in vitro إنتاج الأجنة داخل المختبر	2-2
5	العوامل التي تؤثر على إنتاج الأجنة في المختبر	3-2
6	Donor age عمر الحيوان الواهب	4-2
8	Oocyte collection تقنيات جمع البويضات techniques	5-2
8	الطريقة الجراحية	1-5-2
8	Slicing of ovary تشريح المبيض	2-5-2
8	Aspiration technique طريقة الشفط	3-5-2
9	تقنية إلتقاط البويضات الموجهة بالموجات فوق الصوتية Transvaginal ultrasound-guide oocytes pick up OPU	4-5-2
10	حفظ المبايض بعد الذبح	6-2
11	Oocyte Recovery and جمع البويضات وتصنيفها Classification	7-2
12	Factors العوامل التي تؤثر على جودة البويضات affecting oocyte quality	8-2
13	In vitro maturation الإنضاج في المختبر	9-2
16	Media الأوساط الزرعية المستخدمة في الإنضاج المختبري used for IVM	1-9-2
18	In vitro fertilization الإخصاب داخل المختبر	10-2
18	media الأوساط الزرعية المستخدمة في الإخصاب المختبري used for IVF	1-10-2
20	إستخدام السائل المنوي الطازج أو المجمد	11-2

20	Thawing procedure إذابة الحيوانات المنوية	12-2
21	فصل الحيوانات المنوية والسباحة نحو الأعلى	1-12-2
21	تهيئة وتكيف النطف للإخصاب	13-2
24	الهيبارين وفوائده في التكيف	1-13-2
24	السائل الحويصلي	14-2
25	استخدام السائل الحويصلي في التكيف	1-14-2
26	تكون الجريبات	15-2
26	Ovarian follicular size حجم الحويصلات المبيضية	1-15-2
28	Cumulus cells خلايا الركام الجرثومي	16-2
29	سمك الركام الجرثومي وقطر البويضات	1-16-2
29	Embryo transfer نقل الأجنة	17-2
38-31	الفصل الثالث : المواد وطرق العمل material and methods	3
33	جمع السائل الحويصلي	1-3
33	عملية تعطيل فعالية الكلوبيينات المناعية	1-1-3
33	جمع البويضات	2-3
34	التصنيف حسب الشكل المورفولوجي	1-2-3
34	فحص الحيوية للبويضات	2-2-3
35	تقنية الإنضاج المختبري	3-2-3
35	تهيئة وتكيف النطف لعملية الإخصاب	4-2-3
36	تقنية الإخصاب المختبري	5-2-3
38	التحليل الإحصائي	3-3
55-39	الفصل الرابع : النتائج والمناقشة the and discussion results	4
43	نتائج فحص الحيوية للبويضات	1-4
44	الشكل المورفولوجي	2-4
47	النسبة المئوية للإنضاج المختبري لمعاملات التجربة	3-4

51	المحصلة النهائية لنسب الإنضاج المختبري للبويضات	4-4
52	النسبة المئوية للإخصاب المختبري لمعاملات التجربة	5-4
55	المحصلة النهائية لنسب الإخصاب المختبري للبويضات	6-4
56	الفصل الخامس : الإستنتاجات والتوصيات	5
56	الإستنتاجات	1-5
56	التوصيات	2-5
80-57	الفصل السادس : المصادر	6

قائمة الجداول List of Tables

الصفحة	الموضوع	رقم الجدول
36	مكونات الوسط الزرعي HTCM المستخدم في جمع البويضات مضاف إليه 10% FBS	1
36	مكونات الوسط الزراعي TCM المستخدم في عملية الانضاج	2
37	مكونات الوسط الزرعي fert-TALP المستخدم في عملية الإخصاب مضاف إليه BSA 6mgr/ ml + 0.5%Heparin	3
37	مكونات الوسط الزرعي SP-TALP المستخدم في تنشيط النطف بتقنية السباحة نحو الأعلى مضاف إليه BSA 6mg/ml	4
39	جميع البيانات المستحصل عليها خلال التجربة	5
44	نتائج فحص الحيوية للبويضات للأسابيع المختلفة	6
46	تصنيف البويضات حسب الشكل بإختلاف أسابيع الدراسة	7
47	عدد البويضات الكلي التراكيز وللأسابيع المختلفة	8
50	النسبة المئوية للإنضاج المختبري لمعاملات التجربة	9
51	المجموع الكلي لنسبة الإنضاج المختبري بإختلاف التراكيز	10

52	عدد البويضات الكلي بإختلاف التراكيز وللأسابيع المختلفة / للإخصاب	11
54	النسبة المئوية للبويضات المخصبة لمعاملات التجربة	12
55	المجموع الكلي لنسبة الإخصاب المختبري بإختلاف التراكيز	13

قائمة الأشكال List of Shapes

الصفحة	الموضوع	رقم الشكل
40	بويضة ذات شكل طبيعي تحتوي طبقات عدة من الركام الجرثومي (قوة التكبير x4)	1
40	بويضة ذات شكل طبيعي عارية (قوة التكبير x4)	2
41	بويضة ذات شكل غير طبيعي (قوة التكبير x4)	3
41	بويضة غير حية تظهر مصطبغة بصبغة trypan blue (قوة التكبير x4)	4
42	بويضة ناضجة (قوة التكبير x4)	5
42	بويضة مخصبة (قوة التكبير x10)	6
43	يبين ظهور الجريبات على المبيض	7

قائمة المخططات List of Schemes

الصفحة	الموضوع	رقم المخطط
32	مراحل التجربة	1

List of Appendices قائمة الملاحق

الموضوع	رقم الملحق
درجات الحرارة في شهر كانون الثاني	1
درجات الحرارة في شهر شباط	2
درجات الحرارة في شهر آذار	3
درجات الحرارة في شهر نيسان	4
درجات الحرارة في شهر أيار	5
درجات الحرارة في شهر حزيران	6
درجات الحرارة في شهر تموز	7

قائمة المصطلحات المختصرة

AR	Acrosome reaction
BFF	Bovine follicular fluid
BSA	Bovine serum albumin
CaM	Calcium Modulated Protein
cAMP	Cyclic adenosine monomphosphate
COCs	Cumulus Oocyte complexes
ET	Embryo transfer
FF	Follicular fluid
FCS	Fetal calf serum
FSH	Follicle stimulating hormone
GAGs	Glycosaminoglycans
hCG	Human chorionic gonadotropin
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection
IVEP	In vitro embryo production
IVD	In vitro development
IVF	In vitro fertilization
IVM	In vitro maturation
LH	Luteinizing hormone
MOET	Multiple ovulation and embryo transfer
mRNA	Messenger ribonucleic acid
OPU	Ovum pick up
PBS	Phosphate buffered saline
PVP	Poly vinyl pyrrolidone
rFSH	Recombinant follicle stimulating hormone
TALP	Tyrods Albumin Lactate Pyruvate
TCM	Tissue Culture Medium
TUGA	Transvaginal ultrasound-guided aspiration
Zp	Zona pellucida

المستخلص

أجريت الدراسة في مختبر الدراسات العليا التابع لكلية الزراعة / جامعة المثنى / قسم الانتاج الحيواني للفترة من 1 كانون الاول 2019 ولغاية 29 تموز 2020 لدراسة تأثير وقت جمع البويضات (أسابيع) وإضافة تراكيز مختلفة من السائل الحويصلي للأبقار الى الاوساط الزرعية المستخدمة في عملية الإنضاج والإخصاب المختبري لبويضات الأبقار .

إشتملت هذه الدراسة على تجربتين . صممت التجربة الأولى لدراسة تأثير إضافة تراكيز مختلفة من السائل الحويصلي البقري (0,5,10,15%) إلى الوسط الزرعى المستخدم في عملية الإنضاج المختبري IVM (TCM-199) على النسبة المئوية لبويضات الأبقار خلال أسابيع جمع البويضات .

أظهرت نتائج الإنضاج المختبري وجود فروقات معنوية ($P \leq 0.05$) إذ تفوقت المعاملة الثالثة بتركيز 15% سائل حويصلي بقري وللأسابيع المختلفة وكانت نسبة الإنضاج 68.8% مقارنة بنسب الإنضاج للمعاملات الأخرى 61.40% لمعاملة السيطرة و 58.62% للمعاملة الأولى 5% سائل حويصلي بقري و 63.33% للمعاملة الثانية 10% سائل حويصلي بقري .

أما التجربة الثانية فقد صممت التجربة الثانية لدراسة تأثير إضافة تراكيز مختلفة من السائل الحويصلي البقري (0,5,10,15%) إلى الوسط الزرعى المستخدم في عملية الإخصاب المختبري IVF (fert-TALP) على النسبة المئوية لبويضات الأبقار خلال أسابيع جمع البويضات .

وقد أظهرت نتائج الإخصاب المختبري تفوق المعاملة الثالثة بتركيز 15% سائل حويصلي بقري وللأسابيع المختلفة وكانت نسبة الإخصاب 35.71% مقارنة بنسب الإخصاب للمعاملات الأخرى 25.71% لمعاملة السيطرة و 29.41% للمعاملة الأولى 5% سائل حويصلي بقري و 31.58% للمعاملة الثانية 10% سائل حويصلي بقري .

كما لوحظ أن معاملة السيطرة تفوقت في نسبة الإنضاج 61.40% على المعاملة الأولى 5% سائل حويصلي بقري التي كانت نسبته 58.62% إلا إن المعاملة الأولى 5% سائل حويصلي بقري تفوقت في نسبة الإخصاب 29.41% على معاملة السيطرة وكانت نسبته 25.71% .

ومن خلال النتائج تبين أن اضافة السائل الحويصلي البقري بتركيز 15% كان أفضل التراكيز المستخدمة وأعطى أفضل النتائج في عمليتي الإنضاج والإخصاب .

الفصل الأول

المقدمة Introduction

الفصل الاول : المقدمة Introduction

إن زيادة أعداد الحيوانات أمر ضروري للمساعدة في إطعام اعداد السكان المتزايد ، إذ تستخدم العديد من تقنيات الإنجاب المساعدة لمحاولة زيادة عدد الأجنة المنتجة ، على سبيل المثال في الإباضة ونقل الأجنة في الوقت الحالي يُمارس إنتاج الأجنة في المختبر (IVEP) بشكل واسع أيضاً للسبب نفسه ويمكن أن يكون أداة فعالة لإنتاج حيوانات تتمتع بصفات وراثية أعلى ومع ذلك هناك العديد من العوامل التي يمكن أن تؤثر على نجاح IVEP كذلك يمكن للعوامل أن تزيد أو تنقص من نسبة الأجنة اللاحقة (MAHOETE ، 2010).

أدت الزيادة في الطلب على أجنة الماشية للأهداف التجارية وكذلك أهداف البحث إلى زيادة استخدام التقنيات الحيوية التناسلية مثل إنتاج الأجنة في المختبر (IVP)، في هذا السياق يعد IVP بديلاً يسرع البحث في تكاثر الماشية وعلم الوراثة (Pivato، 2001). تشمل بعض تطبيقات تقنية IVP التحسين الوراثي الحيواني وإنتاج عدد أكبر من الأجنة للاستخدام التجاري ، على سبيل المثال في الأبقار عالية القيمة التي تعاني من مشاكل العقم وإنتاج الحيوانات المعدلة وراثياً وممارسة الجنس بالأجنة (Braw وآخرون ، 1997). في أمريكا الشمالية ازداد استخدام IVEP بشكل كبير خلال السنوات القليلة الماضية (Perry ، 2015) ربما بسبب التحسينات في علم الوراثة والكفاءة التناسلية ونسبة الجنس للنسل التي يمكن تحقيقها باستخدام هذه التقنية ، في البرازيل يستخدم IVEP في المقام الأول في ماشية *Bos indicus* لحوم الأبقار بسبب زيادة أعداد الجريبات وبالتالي زيادة إنتاج البويضات لكل مجموعة ، مما لوحظ في *Bos taurus* ومع ذلك زاد استخدام IVEP مؤخراً بشكل كبير في ماشية الألبان في البرازيل وبلدان أمريكا اللاتينية الأخرى (Sartori وآخرون، 2016).

يعد IVP وسيلة قيمة لإنتاج الماشية التجاري نظرًا لأنه يزيد من عدد النسل الذي يمكن إنتاجه من كل حيوان سنويًا (Hanson، 2013). تقنيات IVEP المحسنة في النضج المختبري (IVM) ، والإخصاب المختبري (IVF) وفي الزراعة المختبرية (IVC) أدت إلى جيل آخر من التقنيات الإنجابية مثل حقن الحيوانات المنوية داخل الخلايا (ICSI) وإنتاج الحيوانات المحورة وراثيًا حتى الاستئساخ مع الحقن المجهرى ، هناك حاجة إلى نطفة واحدة فقط لتخصيب البويضة وحركة ذلك الحيوان المنوي ليست ذات أهمية كبيرة لقدرة الإخصاب كذلك لم تعد هناك حاجة إلى الحيوانات المنوية عند استخدام تقنيات الإستساخ (Cibelli و اخرون ، 2002). بلغ متوسط معدلات الحمل الناتجة عن نقل الأجنة المنتجة مختبريا - ٥٠٪ عند ٦٠ يومًا من الحمل ، أي أقل بقليل من معدلات الحمل من الأجنة في الجسم الحي ومع ذلك يعاني عدد من البحوث من مشاكل تفصيلية في حالات الحمل الناتجة عن نقل أجنة الأبقار منتجة مختبريا ، تمثلت هذه المشاكل في أوزان المواليد الأثقل وفترات الحمل الطويلة ومعدلات الإجهاض المرتفعة وزيادة معدلات الوفيات المحيطة بالولادة. (Lazzari and Galli، 1996). وُحِدَت تقنية IVM في الأنواع الحيوانية ، وتهدف الجهود حاليًا إلى تقليل كلفة التكنولوجيا باستبدال المدخلات باهظة الثمن لعملية IVM بمدخلات أقل تكلفة ومحددة كيميائيًا (Gupta واخرون، 2005). بشكل عام فإن الاوساط المستخدمة في IVM هي عبارة عن تركيبات معقدة عالميًا صُنعت في الأصل لإستزراع الخلايا والأنسجة الجسدية ، هذا هو الحال بالنسبة لمعظم اوساط البويضات IVM المستخدمة بصورة كبيرة ، مثل الوسط الزراعي (TCM 199) ، صُممت تركيبات الاوساط الزراعية لتلبية الاحتياجات الأيضية للخلايا الجسدية وليس للمتطلبات المعقدة والديناميكية لنضوج COC ، هناك حاجة ملحة لتصنيع أوساط خاصة لبويضات IVM ، أجريت تحسينات كبيرة في الأوساط الزراعية للأجنة على مدار العقدين الماضيين (Gilchrist & Thompson, 2007). احرز (Goto واخرون، 1988)

تقدما كبير في العجول الاولى التي حُصل عليها بواسطة ال IVP. أحرز تقدم كبير في فهم متطلبات الأمشاج / الجنين والتمثيل الغذائي مما يسمح بصياغة اوساط زرعية أفضل لتحقيق إنتاج إجمالي أعلى وجودة جنينية اعلى (Blondin وآخرون ، 2006) . تسعى التطورات الرئيسية في IVP اليوم إلى تحسين الأداء العام في المراحل جميعها(تحفيز المبيض ، استرداد البويضات ، النضج ، الإخصاب ، نمو الجنين ، التجميد ، النقل والحمل).

الهدف من هذا العمل هو مناقشة بدائل إنتاج الأجنة في المختبر ، وكذلك دراسة آليات تكوين البويضات والنضج التي يمكن أن تتعلق بفاعلية النتائج التي حُصل عليها في برامج التكاثر الحيواني المساعد ، كذلك القدرة على إنتاج عدد كبير من الأجنة من المتبرعين ذوي الجينات الوراثية العالية لها قيمة محتملة كبيرة في نشر التحسين الوراثي وتقصير اختبار النسل وفترة التوليد من خلال القطيع الوطني. تضمنت بعض التطبيقات التجارية لتكنولوجيا الإخصاب في المختبر جهودًا من أجل.

(١) تطبيق تقانة الإنضاج المختبري والإخصاب الخارجي في الابقار .

(٢) _ تجربة اوساط زرعية مختلفة في الإنضاج المختبري والاختصاص الخارجي ومقارنتهما مع الوسط الزرعى التقليدي .

(٣) جمع وتصنيف بيوض الابقار المستحصلة من مجزرة السماوة ومعرفة النسبة المئوية للبيوض الحية والطبيعية .

(٤) معرفة تأثير وجود طبقات الركام الجرثومي في عملية الإنضاج المختبري والاختصاص الخارجي لبيوض الابقار

الفصل الثاني

مراجعة المصادر

Literature Review

الفصل الثاني : مراجعة المصادر Literature Review

2-1- إنتاج الأجنة داخل الجسم الحي *in vivo*

يحدث الإخصاب في الجسم الحي في الأبقار في الجهاز التناسلي الإنثوي عندما تلتقي الأمشاج من الذكور والإناث ، عادة تودع الحيوانات المنوية خارج عنق الرحم مباشرة (عملية الجماع الطبيعية) أو داخل عنق الرحم مباشرة (التلقيح الإصطناعي) ، تتحد الحيوانات المنوية مع البويضات في قناة البيض ، الأنبوب الذي يربط المبيض بالرحم ، وفقًا لهذه الرحلة الطويلة نسبيًا عبر الرحم ، يتم إختيار أسرع الحيوانات المنوية للسباحة ، والتي غالبًا ما تكون تلك التي لديها أطول سوط (Katska ، 1984). ومع ذلك ، فهي ليست مجرد مسألة لقاء الحيوانات المنوية مع البويضة بل يجب أن تخضع الحيوانات المنوية للتكيف من أجل الإخصاب بنجاح ، أصبح هذا واضحًا عندما أثبت العلماء في نموذج أرنب أن الحيوانات المنوية تحتاج إلى وقت في القناة التناسلية لاكتساب القدرة على إخصاب البويضات بنجاح (Keefer وآخرون، 1991).

2-2- إنتاج الأجنة داخل المختبر *in vitro*

يتألف برنامج إنتاج الأجنة في المختبر (IVEP) *in vitro embryo production* من خطوات عدة تبدأ من جمع البويضات حتى التطور المختبري للأجنة حيث يكون لكل خطوة تأثير مباشر على النتيجة النهائية ، بإختصار المراحل الرئيسة لـ IVEP هي: الجمع والإختيار ، والإنضاج في المختبر *in vitro maturation* (IVM) من البويضات ذات الركام الجرثومي *cumulus oocyte complexes* (COCs) ، و *in vitro fertilization* من COCs الناضجة ، والزراعة المختبرية *in vitro development* (IVD) من البويضات المخصبة ، ونقل الأجنة (RIOS وآخرون ، 2015) . أصبح إنتاج العجول مختبريًا مستقرًا تجاريًا خلال فترة التسعينيات من القرن الماضي . سجلت الكثير من برامج

نقل الأجنة عن إنتاج حالات الحمل من الأبقار العقيمة وراثيًا (Bousquet وآخرون ، 1999) . توفر عدد كافٍ من البويضات هو شرط أساسي ل IVEP ، لأنه يحدد عدد الأجنة المنتجة ، إلا أن البويضات الأولية ل IVEP حُصل عليها في الغالب من مبايض الحيوانات المذبوحة (Wani ، 2002) . يمكن أيضًا الحصول على البويضات من الحيوانات الواهبة الحية ، على الرغم من وجود عدد كبير من البويضات في مبايض الثدييات إلا أن عددًا محدودًا فقط منها يتم اختيارها لتصبح هذه البويضات مؤهلة للتطور و تخصيبها والمساهمة في التطور الجنيني ، بشكل عام تفشل معظم البويضات غير الناضجة التي تُجمع من المبايض في الثدييات في التطور حتى مرحلة ما قبل الزرع بعد IVF و IVM و IVC ويعزى هذا الفشل إلى عوامل مثل جودة البويضات وظروف زراعة الأجنة (Kane، 2003، merton و آخرون ، 2003) أصبح الإنتاج في المختبر (IVEP) مهمًا لإنتاج أجنة الأبقار بوصفه كبديل أو متكامل مع شرط الإباضة و نقل الأجنة (MOET) multiple ovulation and embryo transfer بسبب مزاياها ومرونتها (Galli ، 2001).

تتميز هذه التقنية أيضًا بإمكانية أكبر لزيادة عدد الأجنة المنتجة لإجراء البحوث الأساسية وتطبيق التقانات الحيوية الحديثة ، مثل تحديد جنس الجنين ، الحقن المجهرى ، النقل والإستساخ والكلونة (Baldassare وآخرون ، 2002 ؛ O'Brien وآخرون ، 2004) .

2-3- العوامل التي تؤثر على إنتاج الاجنة في المختبر

يعتمد التنفيذ الناجح لبرنامج IVEP على العديد من العوامل بما في ذلك العوامل الوراثية للواهب ، وضغط الفراغ أثناء الشفط ، ونوع الإبرة أثناء التقاط البويضة (OPU) ovum pick up ، وعدد الجريبات الموجودة (ward وآخرون، 2000) . قد تؤثر هذه العوامل على جودة البويضات التي جمعت ، كما هو محدد بصريًا ، أو نجاح النضج في المختبر وتخصيب البويضات أو تطور الجنين في المختبر

، على النحو الذي يحدده عدد و نوعية و مرحلة الأجنة الناتجة ، فضلا عن ذلك أشارت بعض الدراسات إلى أن مرحلة الموجة الجريبية (follicle wave) و حجم الجريب قد تؤثران على نجاح عملية IVEP (Hendriksen وآخرون، 2004) . على سبيل المثال في الأبقار في يوم غير محدد من دورة الشبق كان من المرجح تصنيف الحويصلات على أنها صحية إذا كانت أكبر (< 8 ملم 70% من المتوسطة (6-8 ملم 33%) أو أصغر (> 6 ملم 12%) (Carolan وآخرون، 1996) . فضلا عن ذلك ، فإن الأبقار التي عوملت بـ Follicle Stimulating Hormone (FSH) لديها نسبة أكبر من الحويصلات ذات الأقطار المتوسطة (< 6 و > 10 ملم) مقارنة بالأبقار من مجموعة السيطرة (Goodhand وآخرون، 1999). وبالتالي منطقياً أن العلاجات الهرمونية أثناء نمو الموجة الحويصلية يمكن استخدامها لمزامنة الحويصلات إلى مرحلة أكثر مثالية لـ IVEP . الانضاج في المختبر عامل مهم يساهم في نجاح برنامج IVEP ، عندما تنتضج البويضات يتبعها الإخصاب في المختبر، والوسائل المنوي المستخدم في الإخصاب في المختبر هو أيضاً أحد العوامل التي تسهم في نجاح برنامج IVEP كذلك يعد الوسط الزرع culture medium في المختبر عاملاً آخر يؤثر بصورة كبيرة في إنتاج الأجنة مختبرياً ، يوجد العديد الاوساط الزرع المختلفة المستخدمة في برنامج الـ IVEP (MAHOETE ، 2010) .

2-4- عمر الحيوان الواهب Donor age

القدرة على إنتاج أجنة من البويضات المستحصل عليها او العجلات قبل البلوغ توفر إمكانية تقليل فترة التوليد في الأبقار على نحو ملحوظ ، وبالتالي تسريع معدل المكاسب الجينية التي يمكن تحقيقها من خلال نقل الأجنة ، فضلا عن ذلك تحتوي مبايض العجلات على عدد أكبر من الجريبات المرئية على السطح أكثر من تلك الموجودة في الأبقار البالغة (Armstrong وآخرون ، 1997) . ويرجع ذلك إلى

تقدم عمر الحيوانات مما يوفر إمكانية استعادة العديد من البويضات من عدد معين من المبايض ومع ذلك فإن البويضات من مبايض العجلات أقل كفاءة في التطور من تلك الموجودة في مبايض البقرة البالغة (Revel وآخرون ، 1995) . على الرغم من أن معدلات الإخصاب والانقسام لا تختلف اختلافاً كبيراً بين بويضات العجل والبقر ، فإن تطور الكيسة الأريمية تنخفض بشكل كبير مع بويضات العجلات (Khatir وآخرون ، 1996) . من المحتمل أن النقص في قدرة النمو لبويضات العجل ناتج عن نضج سيتوبلازمي غير طبيعي لهذه البويضات ، وبالفعل فقد ثبت أن بويضات العجل تظهر تأخرًا في هجرة العضيات بعد الانصاج المختبري (IVM) وكذلك تكوينات الكروماتين والأنابيب الدقيقة غير الطبيعية (Damiani وآخرون ، 1996) . لا يقتصر عدم وجود الكفاءة التنموية في البويضات من الحيوانات ما قبل البلوغ على الأبقار ، الماعز (Izquierdo وآخرون ، 1995) ، الأغنام (O'Brien وآخرون ، 1996) . وبالتالي تمثل البويضات ما قبل البلوغ نموذجًا سلبيًا جيدًا لدراسة الآليات التي ينطوي عليها اكتساب القدرة على النمو .

عمر الحيوان الواهب له تأثير كبير على قدرة البويضة على إكمال النضج واكتساب (mRNA) messenger ribonucleic acid والبروتينات اللازمة للنمو الجنيني الطبيعي ، من المعروف أن القدرة على النمو تنخفض في البويضات المأخوذة من الحيوانات الصغيرة عند مقارنتها مع تلك المستمدة من البالغة ومع ذلك لا يتم توضيح الآليات الجزيئية المرتبطة بهذه الاختلافات بشكل جيد (Dorji وآخرون ، 2012) . يحدد عمر الحيوانات التي تُسترد البويضات منها الكفاءة التنموية للبويضات ، في حالة الحملان قبل البلوغ يمكن أن تبدأ مجموعة البويضات في عمر مبكر يصل إلى ٤ أسابيع ، وجد أن معظم الاستجابة الجرابية للمبيض تحدث ما بين ٤ إلى ٦ أسابيع من العمر (Armstrong ، وآخرون 1997). في المجترات الصغيرة تظهر البويضات من حيوانات ما قبل البلوغ قدرة على النمو منخفضة بالمقارنة مع البويضات المستمدة من نظيراتها المجتررة البالغة (Morton ، 2008).

2-5- تقنيات جمع البويضات *Oocyte collection techniques*

عادة ما يكون مصدر البويضات رخيص وفير يمكن الحصول عليها من المجازر، تحتوي مبايض الحيوانات غير الناضجة على وفرة من البويضات حيث توجد فرصة لاستحصال البويضات من الإناث من جميع الأعمار (Erikson ، 1966) ومع ذلك فإن البويضات شديدة التباين في كفاءتها بالنسبة للتطور والتركيب الوراثي (Bilodeau وآخرون ، 2002). هنالك عدة طرق تستخدم لجمع البويضات ومنها التالي :

2-5-1- الطريقة الجراحية

من خلال الطريقة الجراحية يتم تخدير الحيوان الواهب وفتح البطن للوصول للمبيض و البويضة و الرحم عبر شق الفحص (Rowson, L. E وآخرون ، 1969) .

2-5-2- تشريح أو تشطيب المبيض *Slicing of ovary*

طريقة التشريح ، يتم فيها وضع المبايض في طبق بتري يحتوي على وسط زرعي ثم تُعمل الشقوق بشفرة جراحية على سطح المبيض بأكمله (wang وآخرون ، 2007) .

2-5-3- طريقة الشفط *Aspiration technique*

تعد الطريقة الأكثر استخدامًا عن طريق شفط الجريبات الحويصلية باستخدام ماصة أو حقنة وإبرة مناسبة ، ميزة الشفط الجريبي من حيث سرعة التشغيل والتي قد تكون ذات أهمية خاصة في إنتاج الأجنة التجارية ، تكمن إحدى الصعوبات المرتبطة بنهج الشفط في الحقيقة أن البويضات يمكن استردادها فقط من 30-60 % (Clemente وآخرون ، 2009) . طريقة شفط البويضات يتم فيها شفط جميع حويصلات المبيض المرئية باستخدام إبرة تحت الجلد ثم ينقل السائل إلى طبق بيتري للبحث عن

للبيوضات (Cognie ، 1999) . عملية الشفط aspiration من مبايض الحيوانات المذبوحة هي الإجراء الأكثر شيوعاً في الوقت الحالي ومع ذلك بسبب طبيعتها النهائية لا يمكن تكرار هذه التقنية على حيوان مفرد (Hashimoto وآخرون ، 1999) . لتكرار جمع البويضات الابقار بشكل طبيعي طورت تقنية الشفط الجراحي الموجهة بالموجات فوق الصوتية *transvaginal ultrasound-guided aspiration (TUGA)* (Pieterse وآخرون ، 1988) .

2-5-4- تقنية التقاط البويضات الموجهة بالموجات فوق الصوتية *Transvaginal*

ultrasound-guide oocytes pick up (OPU)

يمكن استخدام شفط الجريب بواسطة OPU للحصول على البويضات ذات الركام الجرثوني COCs لـ IVEP وفي الوقت نفسه تزامن ظهور موجة الجريب لإنتاج أجنة في الجسم الحي (IVD) في نفس الواهب (Surjus وآخرون، 2014) . يمكن جمع البويضات غير الناضجة باستخدام OPU عبر المهبل أو عن طريق الجمع بالمنظار من الحيوانات الحية ، البويضات التي جمعت من خلال هذه التقنيات تكون ذات جودة مقبولة معروفة نسب الحيوانات المستخدمة وبالتالي يمكن إنتاج مواد وراثية عالية الجودة ، يمكن الجمع من الحيوانات ذات الصفات المميزة بشكل متكرر حتى عند الحمل دون التسبب في أي ضرر للحيوان أو الجنين (Cunningham ، 1999) . يمكن أيضاً إجراء OPU عبر المهبل مع أو بدون الموجات فوق الصوتية وهو الأسلوب الأكثر استخداماً، هذا بسبب انخفاض خطر العدوى والإصابة ويمكن إجراؤه مرتين في الأسبوع تقريباً مع ما يقرب من ٤ إلى ٨ بويضات (Morton و آخرون، 2008 ؛ hafez ، 2000) . الوقت اللازم لجمع البويضات من خلال OPU بالمنظار حوالي ٢٠ دقيقة في المجترات الصغيرة يقلل من الإجهاد و يمكن أن تتكرر هذه التقنية عدة مرات دون تلف المبيض أو انخفاض في خصوبة الحيوانات الواهبة (Stangl و آخرون، 1999) . باستخدام

التقاط البويضات بالموجات فوق الصوتية عبر المهبل يمكن الحصول على العديد من البويضات لكل بقرة أسبوعيا يمكن بعد ذلك انضاج البويضات وتخصيبها في المختبر قبل نقلها إلى الماشية المتلقية لإنتاج العديد من الأجنة الصالحة (Hiroyoshi ، 2002).

بهذه الطريقة يعطى مخدر فوق الجافية عادة لمنع إجهاد البطن وتخفيف الجس ، البقرة تكون مقيدة بحيث لا يمكنها الحركة إلا قليلاً أثناء جمع البويضات ، بعد سحب الرحم يوضع المبيض الأيمن أو الأيسر على رأس محول الطاقة الذي أُدخل في المهبل المجاور لعنق الرحم ، تظهر بصيلات الغدة كنقاط سوداء مستديرة على شاشة الماسح الضوئي و تصور إبرة الثقب بواسطة خط مفرط الصدى يدخل المبيض (Manik and Palta ، 2003) . يوضع محول الطاقة بحيث يقوم خط الثقب الموجود على الشاشة بقطع الجريب المراد ثقبه ، عندما يوضع الجريب بثبات على خط الثقب تدفع الإبرة عبر جدار المهبل حتى يصبح طرفه مرئياً داخل الجريب (Pieterse وآخرون ، 1991). بعد ذلك مباشرة تشطف المحتويات الجرابية ، بعد سحب الإبرة من المبيض ومحول الطاقة من المهبل تُمسح الإبرة بمحلول ملحي مخفف بالفوسفات (phosphate buffed saline (PBS) ، ويُجمع سائل كل جراب في مرشح ويُفحص للتأكد من وجود البويضات (Pieterse وآخرون ، 1991).

2-6- حفظ المبايض بعد الذبح

في عملية جمع البويضات من أجل الانضاج في المختبر الفاصل الزمني بين ذبح الحيوانات واستعادة البويضات من المبايض ودرجة الحرارة التي يجب تخزين المبايض فيها هي اعتبارات مهمة ، تجمع بويضات الماشية في غضون ساعة إلى ساعتين من ذبح الحيوانات ، وتُخزن المبايض عادة عند حوالي ٣٠ درجة مئوية (Eyestone و First ، 1989). اقترح عالم آخر أن تعرض COCs لدرجة حرارة أقل من ٣٥ درجة مئوية أثناء استعادة البويضات قد يقلل بشكل كبير من كمية ونوعية أجنة الأبقار الناتجة

عن الطرق المختبرية (Falloon وآخرون ، 1988). أشارت دراسات أخرى إلى أن الوقت من الذبح إلى استعادة البويضات قد يمتد حتى ٨ ساعات (Fernandez-Gonzalez وآخرون، 2004) .

2-7- جمع البويضات وتصنيفها *Oocyte Recovery and Classification*

يعد اختيار البويضات المناسبة أمرًا بالغ الأهمية لإنتاج الجنين بنجاح ، إن وجود مكمل سليم لطبقات الخلايا التراكمية المحيطة بالبويضة والسيتوبلازم الظاهر المتجانس كان أفضل المؤشرات على قدرة البويضات غير الناضجة على الخضوع للانضاج والتطور الجنيني ، قيمت الدراسات تأثير مورفولوجيا التراكم على التطور اللاحق في الماشية (First و Parrish ، 1987) . عندما تُصنف البويضات غير الناضجة وفقًا لعدد طبقات الركام المتبقي حول البويضات بعد الشفط كلما كان عدد طبقات الخلايا التراكمية أكثر سمكًا كانت فرص التطور أفضل (Chang ، 1951). البويضات التي ليست من هذا النوع لها تخليق بروتين شاذ وانقسام بتردد أقل (Gandolfi وآخرون ، 1997). دور الخلايا التراكمية هو توفير المغذيات إلى البويضات أثناء نموها (Gardner وآخرون ، 1994) . يوجد العديد من الطرق للحصول على البويضات ومنها شفط البويضات aspiration عبر المهبل الموجهة بالأمواج فوق الصوتية (TUGA) transvaginal ultrasound- guided aspiration (Graff وآخرون، 1999 (أو جراحياً بالشق البطني Laparotomy في المجترات الصغيرة أو بطريقة المنظار عبر البطن والشفط بالالتقاط (OPU) laparoscopic ovum pick-up في المجترات الكبيرة الحية (Baldassarre ، 2002). كما قام (Martino وآخرون ، 1995) بعملية السحب والتقطيع والتشطيب للمبايض للحصول على البويضات. يمكن أن تؤثر طريقة الحصول على البويضات على كفاءة IVEP (Katska- Ksiazkiewicz وآخرون ، 2007). يتراوح الحصول على البويضات من الأبقار المفرطة الإباضة من 25 إلى 75% مع الحد الأعلى الذي يمثل الظروف المثلى ، في الأبقار ذات الإباضة

المفردة جُمع ٨٥٪ من البيض (Avery و Graham، 1962) . لم يتم الجمع من الجريبات ذات الأقطار أقل من 2 ملم لأن البويضات المأخوذة منها تكون قدرتها على التطور منخفضة (1992، Pavlok وآخرون) . أختيرت البويضات غير الناضجة بشكل روتيني للإخصاب في المختبر (IVF) in vitro fertilization على أساس التقييم البصري للميزات المورفولوجية مثل سمك ووجود الطبقات الركامية وتجانس الساييتوريلازم (Gordon ، 2003) وبالتالي فإن التقييم المظهري وحده غير كاف للتمييز بين البويضات التي لديها القدرة على الحمل الكامل (De Loos ، 1992) . من ناحية أخرى فإن 30-40 % فقط من البيوض المخصبة التي حُصل عليها بعد الانضاج والإخصاب في المختبر (IVF) ستصل إلى مرحلة الكيسة الأريمية (Katska-Ksiazkiewicz وآخرون ، 2006).

2-8- العوامل التي تؤثر على جودة البويضات *Factors affecting oocyte*

quality

جودة البويضات هي العامل الرئيس في إنتاج الكيسة الأريمية ، وبالتالي يجب اختيار أفضل البويضات (Lonergan and Fair ، 2016). تؤثر جودة البويضات على بقاء الجنين ومعدلات نموه وبالتالي من المهم التأكد من جمع بويضات عالية الجودة من أجل برنامج IVEP (MAHOETE ، 2010) . داخل الجريب تكون البويضات والخلايا الجسدية المحيطة في تفاعل مستمر من خلال تقاطع الفجوة والعوامل التي تنتقل عن طريق السائل الجريبي (FF) follicular fluid ، هذه التفاعلات هي العوامل المحددة لنجاح تمايز البويضات مما يؤدي إلى زيادة في القدرة على النمو ، وصفت العديد من المركبات الموجودة في FF بما في ذلك عوامل النمو التي تنتجها الخلايا الحبيبية أو البويضات نفسها (Rodgers and Irving-Rodgers ، 2010). في الآونة الأخيرة وصفت الحويصلات خارج الخلية بما في ذلك exosomes في FF (Di Pietro ، 2016). تنشأ هذه المركبات الكهربائية من الخلايا الجسدية

والبويضة وتحتوي على شحنة متنوعة بما في ذلك البروتينات mRNA ، microRNA والدهون)
 Santonocito وآخرون، 2014). تشارك هذه exosomes في الحماية من هجوم الأكسدة (Saeed-
 Zidane وآخرون ، 2017) ، وإشارة miRNA وتحفيز تعديل النسخ في الأجنة المبكرة (Gross،
 2017) وتنظيم التوسع التراكمي (Hung وآخرون، 2015). إجمالاً قد تسمح دراسة أخرى عن
 exosomes FF بتحسين نتائج IVEP وتساعد على تحديد علامات جودة البويضات (da Silveira
 وآخرون، 2017) . تظهر البويضات من حيوانات ما قبل البلوغ انخفاضاً في الكفاءة التنموية بالمقارنة
 مع البويضات المستحصل عليها من نظيراتها المجتررة البالغة (Morton ، 2008) . تتحدد جودة
 البويضات من خلال قدرتها على الانضاج والإخصاب وتوليد اجنة طبيعية (Sirard و آخرون، 2006)
 . وترتبط جودة البويضة أيضاً ببيئة الحويصلة (Camargo وآخرون ، 2006) . بالإضافة إلى العديد
 من العوامل مثل عمر الحيوان ، مرحلة نمو الجريب والوسط الزرعي المستخدم لانضاج البويضات
 (Keskinetepe وآخرون ، 1994). يؤثر حجم المسام بشكل كبير على جودة البويضة التي حُصل
 عليها أثناء الإباضة ونوعية الجنين الذي حُصل عليه (Sirard وآخرون ، 2006).
 يعد نمو البويضات داخل الجريب عملية بطيئة بصورة عامة إذ يجب على البويضات أن تكتسب كفاءة
 للنضج من خلال التفاعل مع خلايا القشرة والحبيبية (Carmago وآخرون ، 2006). يحدث هذا
 خلال المراحل التنموية التي تسبق الإباضة من خلال عملية تُعرف عادة باسم (تكاثف البويضات)
 (Hyttel وآخرون ، 1997).

2-9- الإنضاج في المختبر *In vitro maturation*

الإنضاج في المختبر هو مقدمة للإخصاب في المختبر ، عند استخدام البويضات غير الناضجة تنضج
 البويضات عادة داخل المبيضين بينما في عملية الإنضاج في المختبر يتم إزالة البويضات غير الناضجة

ثم تتضج خارج الجسم ، فالإنضاج بالمختبر لا يتطلب أي تحفيز مفرط للمبيضين إذ بمجرد إزالة البويضات غير الناضجة توضع في وسط زرع في طبق بتري يحتوي على الهرمون الوتيني LH Luteinizing Hormone والهرمونات المنشطة للجريب FSH ، عادة ما تترك البويضات في هذا الوسط لمدة 22 إلى 24 ساعة بمجرد أن يصلوا إلى مرحلة النضج يُلقحوا بصورة طبيعية (عن طريق الإخصاب في المختبر) أو عن طريق حقن الحيوانات المنوية داخل البويضة intracytoplasmic sperm injection (ICSI) لتخصيب البويضات الناضجة (Lim وآخرون، 2013). ثم تُنقل الأجنة النامية إلى الرحم في غضون أربعة إلى سبعة أيام في حين أن معدلات النجاح في الانضاج في المختبر أفضل مما كانت عليه في الماضي إلا أنها لا تزال أقل من تلك الخاصة بالاختصاص في المختبر بعد الانضاج في الجسم الحي ، تختلف معدلات الحمل بناءً على عوامل قليلة أهمها عمر بويضات الإناث (Sherbahn، 2016).

المميزات المورفولوجية للبويضات قُيِّمت أثناء اختيار البويضات غير الناضجة التي تُتضج مختبرياً (Katska-Ksiazkiewicz وآخرون، 2007). تُحدد البويضات لعملية الانضاج المختبري IVM بصورة عامة وفق المعايير التالية (حجم الجريب ، والمظهر السيتوبلازمي ، وظهور وعدد الخلايا التراكمية حول البويضات (COC's). كذلك فأما سمك طبقة الخلايا التراكمية حول البويضة يحدد كفاءة البويضة لامكانية حصول الانقسام الاختزالي ، طبقات الخلايا التراكمية الأكثر سمكاً تشير إلى أن خلايا الإكليل الإشعاعي كافية للبويضة لإكمال النضج النووي ، تُستخدم هذه الخلايا بعد ذلك لاختيار جودة البويضات لأنها تفرز العوامل التي تساعد البويضة على التقدم حتى الانقسام الاختزالي

(Schoevers وآخرون، 2007) ، وتعمل بمثابة وسيط بين البويضة والبيئة الجريبية أو الوسط الزرع ، من المؤشرات المهمة لتحقيق النضج النووي والسيتوبلازمي للبويضات هو طبقات الخلايا التراكمية

المحيطة بالبويضات (Kidson، 2005). وبالتالي يمكن على نحو كبير الاعتماد على التمدد التراكمي لتقييم معدل انضاج البويضات في المختبر (Gupta وآخرون، 2005). تدعم الخلايا التراكمية قابلية البويضات للاختراق بواسطة الحيوانات المنوية عن طريق منع المناطق من التصلب الناتج عن الخلع المبكر للحبيبات القشرية (Schoevers وآخرون، 2007). يساعد توسع الركام على تكاثر الحيوانات المنوية وتخصيبها وتطور الأجنة في الجسم الحي (Chen وآخرون ، 1990). تحتاج البويضات فترة 24 ساعة من الإنضاج في المختبر باستخدام وسط زرع معين لذلك من المهم للغاية التأكد من أن البويضات تتضج قبل أن تُخصب في المختبر (Elder & Dale، 2000). تُعد خطوة IVM حاسمة لنجاح IVEP (RIOS وآخرون ، 2015) لأنه فضلا عن كونها المرحلة الأولى من الزراعة نفسها فهي مسؤولة أيضاً عن توفير العوامل اللازمة لخضوع البويضات التي تخضع للتعديلات اللازمة للتطور الجنيني (MACHATY وآخرون ، 2012). البويضات الناضجة في المختبر سواء جُمعت من الحيوانات الحية أو من المجازر تظهر عادة نسبة عالية من الانقسام بعد التلقيح الصناعي لكن يكون هنالك انخفاض في نسبة البويضات التي تتطور إلى مرحلة الكيسة الأريمية ، تقل هذه المشكلة عندما تكون البويضات محاطة بأربع أو أكثر من طبقات الخلايا التراكمية مما يدل ذلك على أن المشكلة تتعلق بالأساس بنضج الجريبات (Kane، 2003). ومع ذلك لا يزال هناك فشل 60% في وصول البويضات الناضجة والمخصبة مختبرياً إلى مرحلة الكيسة الأريمية بعد إنتاج الأجنة في المختبر (Katska-Ksiazkiewicz وآخرون ، 2007). إن نضج البويضات سواء في الجسم الحي أو في المختبر ، هو أهم مرحلة من تطور البويضات حتى في IVEP (MAHOETE ، 2010) نقل عن (Nedambale ، 1999). أثناء IVM يؤدي FSH أثراً رئيسياً في اكتساب الكفاءة في الإخصاب والجنين في تطوير المختبر (SIRARD وآخرون ، 2007 ؛ XIAO وآخرون ، 2014). إضافة هذا الهرمون في وسط IVM يزيد من تعبير mRNA لمستقبلات (rFSH) (FSH) ومستقبلات (rLH) (LH) في الخلايا

التراكمية COCs (XIAO وآخرون ، 2014). يشمل إنضاج البويضات جوانب عدة للنضج النووي والسيئوبلازمي ، يشير النضج النووي إلى استمرار الانقسام الاختزالي والتقدم إلى المرحلة الثانية من الطور ، اما النضج السيئوبلازمي فيشمل أحداثاً أخرى غير مفهومة تتعلق بالسعة السيئوبلازمية للخلايا البيضية (Kidson ، 2005). ومع ذلك لا يزال هناك العديد من أوجه القصور في IVM للبويضات وخاصة في المجترات الصغيرة (Shi وآخرون ، 2009).

وجد (Kane ، 1987) أن فترة الإنضاج وظهور الجسم القطبي الأول تتعلق بسماكة وكثافة COCs ، حققت البويضات البقرية الكفاءة التنموية خلال 14 ساعة من بدء الإدارة المتكاملة للنواقل اقترح (Kastrop وآخرون ، 1990) أن الإخصاب المبكر يمكن أن يؤدي إلى إنتاجية أعلى بكثير من الكيسة الأريمية تحت أنظمة IVM الروتينية ، وقت الانضاج عادة 22-24 ساعة في الماشية (Holt وآخرون ، 2010) . البويضات المستخرجة من حويصلات كبيرة في مرحلة ما قبل التبويض قد تنضج لكن غالبية البويضات المستخرجة من حويصلات المبيض الأصغر تتطلب هذه البويضات فترة 24 ساعة من النضج في المختبر باستخدام أوساط زرعية لذلك يجب التأكد من أن البويضات تنضج قبل أن يتم الإخصاب في المختبر (Elder & Dale ، 2000).

2-9-1- الأوساط الزرعية المستخدمة في الإنضاج المختبري Media used for

IVM

أثناء إجراء IVM تمثل البويضة وخلايا الركام المحيطة وحدة وظيفية لذلك يجب اخذ الاعتبار في متطلبات المغذيات من COC من أجل تحسين الأوساط الزراعية للإنضاج في المختبر (Sutton وآخرون ، 2003). في IVM يُستكمل الوسط الأساسي بالمصل والهرمونات يعد إختيار مكملات البروتين والهرمونات مثل هرمون تحفيز الجريبات (FSH) وهرمون اللوتين (LH) لوسط IVM مهمًا

حتى في عمليات التلقيح الصناعي والتطور الجنيني (Pawshe وآخرون، 1996؛ Wang وآخرون، 1998). يستخدم FSH بصورة عامة في بروتوكولات الإنضاج في المختبر إذ ثبت أنه يحسن الإخصاب وتطور الجنين المبكر والتوسع التراكمي ، يعتقد أن هذه الهرمونات تعمل على تحسين انضاج البويضات السيتوبلازمية عن طريق تغيير مجموعة كبيرة من أنشطة الخلايا التراكمية على نحو ملحوظ

(Izadyar وآخرون، 1998) (Cecconi وآخرون، 2008). عادة ما يعتمد انضاج البويضات على الوسط الزرعى (TCM-199) مكمل بمصل عجول الجنين FCS، (FSH، LH و استراديول) ويحضن لمدة 24-27 ساعة ، أظهر تقرير صادر عن (Rho وآخرون ، 2001) أن فترة الانضاج البالغة 24 ساعة تؤدي إلى نسبة أعلى على نحو ملحوظ من البويضات التي تصل إلى مرحلة الانضاج مما تفعله واحدة من 24 ساعة. حصل على معدل انضاج 70.1% في وسط يحتوي على FSH و LH مقارنة بمعدل انضاج 50.3% في وسط يحتوي على (hCG) ، كذلك يُحسن تكوين الكيسة الأريمية أيضًا في الماعز عن طريق اوساط زرعية تحتوي على FSH ، حصل على 19.4% إلى 22.6% مقارنة ب 12% من تكوين الكيسة الأريمية في الاوساط بدون FSH (Wang وآخرون، 1998؛ Wang وآخرون، 2007). FSH يدعم بصورة عامة الكفاءة التنموية بصورة مختلفة أثناء تكوين الجريبات وإنضاج البويضة في المختبر، كذلك فإنه يحافظ على نمو الحويصلة وهو حيوي لظهور مستقبلات LH خلال المراحل النهائية من تطور الحويصلة (Sirard وآخرون، 2007).

هناك العديد من الأمصال المستخدمة في انضاج البويضات ومنها المصل البقري الجنيني (FBS) مصل متماثل وغير متجانس ، أستخدم FBS في الغالب لانضاج بويضات الأغنام والماعز حيث سجل فرق كبير بين معدل الإنضاج في الوسط المكمل مع FBS ومعدل الإنضاج في الوسط دون FBS ، وصل حوالي 4% من البويضات إلى المرحلة الثانية من طور التنمية في وسط دون (FBS) مقارنة مع

79 إلى 84 % من البويضات في وسط FBS المكمل (Ghasemzadeh-Nava & Tajik, 2000).

2-10- الإخصاب داخل المختبر *In vitro fertilization*

يتطلب (IVF) تحقيق خطوات أساسية وهي جمع البويضات من الحيوانات المذبوحة أو الحية ، الانضاج في المختبر (IVM) ، إعداد السائل المنوي للإخصاب في المختبر (IVF) وضمان النمو في المختبر (IVD) من الزيجوت الذي حصل عليه ، أحد العوامل الأكثر أهمية في تطوير إنتاج الأجنة في المختبر في الثدييات هو توافر البويضات الصالحة والقادرة على النمو ، العامل المقيد في هذا السياق هو الحياة الخصبة القصيرة النسبية لبيضة الثدييات (Ali A.Z ، 2014) . تتم العملية في وسط زرع مصمم خصيصاً لكي يكون مماثلاً للمكونات البيوكيميائية لبيئة الرحم ولتعزيز تكيف الحيوانات المنوية ، يحاكي قناة البيض البيئة اللازمة لانضاج البويضات واكتساب القدرة على النمو للإخصاب (Elder & Dale, 2000). ومع ذلك غالباً ما يكون من الصعب تهيئة الظروف الفسيولوجية التي تحدث في البيئة المنظمة في قناة البيض والرحم (De La Torre-Sanchez وآخرون، 2006).

2-10-1- الأوساط الزرعية المستخدمة في الإخصاب المختبري *media used for*

IVF

يجب أن تكون الأوساط الزرعية المستخدمة في IVF مفيدة في توفير حركة الحيوانات المنوية وتكيفها مما يوفر اندماج اثنين من الأمشاج ثم بدء التطور الجنيني، ليس هذا هو الحال دائماً لأن احتياجات وأنشطة التمثيل الغذائي في المشيجين ليست متطابقة لذلك من الضروري استخدام وسط مناسب لإعداد الحيوانات المنوية ووسط آخر مناسب لتلقيح البويضات (Izquierdo وآخرون، 1998).

وجد (Rho وآخرون، 2001) في دراساتهم حول تحضير السائل المنوي ل IVF أن الطرد المركزي التدرجي بكثافة Percoll يكون أكثر كفاءة بأربع مرات من السباحة وأعلى مرتين من ترشيح الصوف الزجاجي لاستعادة الحيوانات المنوية من السائل المنوي الذي أذيب ، في معظم اوساط الإخصاب يُضاف الهيبارين لأنه مسؤول عن تكييف الحيوانات المنوية ، يرتبط الهيبارين بالحيوان المنوي ويؤدي إلى تغيرات في البيئة داخل الخلية للحيوانات المنوية مما يؤدي إلى امتصاص Ca^{2+} وزيادة في الكالسيوم الخالي من الخلايا ودرجة الحموضة داخل الخلايا ، هنالك تغيير آخر مرتبط بالتكيف الذي يسببه الهيبارين في الحيوانات المنوية هو زيادة في فسفرة البروتين (Lane وآخرون ، 1999). ومع ذلك تميل زيادة تراكيز الهيبارين إلى تقليل معدل الانقسام ويمكن أن تؤثر على نسبة الكيسات الأريمية المتكونة لذا على سبيل المثال ، أنتج وسط غير مكمل بالهيبارين معدل انقسام بنسبة 86.7% مقارنة بالاوساط المكمل بـ 5 IU هيبارين (85.8%) و 10 IU هيبارين (75.5%) وهكذا انخفض معدل الانقسام مع زيادة تركيز الهيبارين (Cox & Alfaro, 2007). كذلك تُضاف عوامل أخرى مثل الكافيين ومزيج من البنسيلامين وهيبثوراين وإبينفرين في وسط الإخصاب لتحفيز وإطالة حركة الحيوانات المنوية ، ألبومين المصل البقري bovine serum albumin(BSA) هو مكمل آخر في اوساط IVF يمكن استخدامه لتحسين تكييف الحيوانات المنوية ، ومع ذلك لم يتم توثيق تأثير الهيبارين مع BSA على معدل الإخصاب في الأغنام ، اما في الماشية فيُعزز تكييف الحيوانات المنوية باستخدام الهيبارين الذي يعمل مع الكافيين سويا (Wani، 2002 ؛ Izquierdo وآخرون، 1998). يستخدم مصل الدم المعقم بالحرارة في الغالب لتكملة اوساط زراعة البويضات ، مثل هذه الاوساط قادرة على تكييف الحيوانات المنوية ، استخدمت تراكيز مختلفة من المصل حسب نوع السائل المنوي المستخدم ، لذا على سبيل المثال ، يستخدم 20% من المصل مع السائل المنوي الطازج ، بينما في السائل المنوي المجمد يستخدم 2% فقط من المصل (Cognie وآخرون، 2003). إضافة المصل إلى اوساط IVF يحسن معدل الانقسام ومع ذلك يؤدي

تركيز المصل أيضاً أثراً مهماً ، في حالة عدم إضافة المصل إلى وسط التخصيب لم يُحصل على أي انقسام ، مقارنة بـ 78% و 72.6% و 73.9% عند إضافة 20% من المصل إلى وسط الاخصاب ، كانت معدلات الانقسام هذه أعلى عند مقارنتها بمعدلات الانقسام التي حصل عليها عند استخدام تراكيز مصل 10% أو 5% (Cognie وآخرون، 2003 ؛ Li وآخرون، 2006). وجد أن المصل يثبط عملية الانقسام الأول في أجنة الأبقار و لكنه في الوقت نفسه يعزز تطور الكيسة الأريمية (Van Langendonck وآخرون، 1997).

2-11- استخدام السائل المنوي الطازج أو المجمد

استخدمت دراسات مختلفة كل من السائل المنوي الطازج والمجمد في دراسات التلقيح الاصطناعي للماشية ، أن السائل المنوي الطازج يتطلب فترة تكثيف أطول من السائل المنوي المجمد (Parrish وآخرون، 1989). وفي الوقت نفسه ، أعطت الحيوانات المنوية الطازجة معدلات اختراق أفضل من الحيوانات المنوية المجمدة المذابة (Pavlok وآخرون، 1993). من المرجح أن يتدهور السائل المنوي المجمد الذائب بشكل أسرع من تلك الطازجة (De Loos وآخرون ، 1989).

2-12- إذابة الحيوانات المنوية *Sperms Thawing procedure*

يمكن إذابة الحيوانات المنوية في محاليل متغيرة أو محلول فسيولوجي إذ يجب مراعاة درجة الحرارة والوقت على هذا النحو عند إذابة السائل المنوي من أجل تقليل الضرر الخلوي ، يمكن إجراء الذوبان بسرعة أو ببطء ، لذلك على سبيل المثال لوحظ أن الذوبان السريع (70 درجة مئوية لمدة 5 ثوانٍ) يؤدي إلى زيادة حركة الحيوانات المنوية بعد الذوبان وسلامة الغشاء (67% و 50% على التوالي) من الذوبان البطيء (35 درجة مئوية لمدة 12 ثانية) 63% و 41% (Soderquist وآخرون، 1997).

2-12-1- فصل الحيوانات المنوية والسباحة نحو الأعلى *Swim Up*

كانت هناك العديد من البحوث التي تميز التدرج Percoll ، السباحة ، sephadex و الصوف الزجاجي وإجراءات فصل الحيوانات المنوية الأخرى للحيوانات المنوية البقري إذ كان معدل استرداد الحيوانات المنوية المتحركة أعلى بالنسبة للحيوانات المنوية المفصولة بواسطة Percoll بدلاً من طريقة السباحة ، ومع ذلك أدى إجراء السباحة إلى اختراق البويضات أكثر مما أجري باستخدام طريقة Percoll ، زيادة عدد تركيزات الحيوانات المنوية خلال التلقيح الصناعي يمكن أن تقضي على هذه المشكلة (Pieterse وآخرون، 1991). هذا التأثير الضار لل Percoll لا يرجع إلى جسيم Percoll في حد ذاته ولكن يمكن أن يعزى إلى تأثير (PVP) poly vinyl pyrrolidone غير المنظم في Percoll ، لهذا السبب أوقف وجود PVP حركة الحيوانات المنوية للثيران (Pincus ، 1951).

2-13- تهيئة وتكيف النطف للإخصاب

التكيف في الحيوانات المنوية تعني أنها مستعدة للخضوع لرد فعل الأكروسوم عندما تقابل (zona pellucida(zp وهي تعمل على تجريد العديد من بروتينات البلازما المنوية من رأس الحيوانات المنوية التي أُرْفِقت أثناء القذف ، أظهرت الدراسات المختبرية أن عملية التكيف تستغرق 4-6 ساعات (Kepkova وآخرون، 2011) . ولكن هذه النقاط الزمنية ليست محددة بصورة جيدة في الجسم الحي بسبب العديد من العوامل الخاصة ببيئة الرحم ، يتضمن تفاعل الأكروسوم اندماج البلازما والأغشية الأكروموسومية لرأس الحيوانات المنوية ، مما يسمح للإنزيمات المحللة للبروتين بمغادرة رأس الحيوانات المنوية للمساعدة في تحطيم منطقة صغيرة من المنطقة الشفافة للمساعدة في دخول الحيوانات المنوية إلى الفضاء المحيطي، يبدأ دخول حيوان منوي واحد سلسلة من الأحداث داخل البويضة مما يؤدي إلى كتلة المنطقة التي يجب أن تمنع أي نطفة أخرى من الاختراق ، هذا مهم لأن البويضة التي تُخصب

بواسطة أكثر من حيوان منوي (ظاهرة تسمى polyspermy) غير قابلة للحياة (Krisher & Bavister ، 1998) . لا يمكن للحيوانات المنوية القدرة الكاملة على الإخصاب إلا بعد نقلها في الجهاز التناسلي الأنثوي إذ يجب أن تخضع لعملية حاسمة مع مزيد من التغييرات الفسيولوجية قبل اختراق Zona Pellucida والاندماج مع البويضات (Katska-Ksiazkiewicz وآخرون ، 2004 ؛ Camargo وآخرون ، 2006). تسمى هذه التغييرات باسم تكيف الحيوانات المنوية ، تكيف الحيوانات المنوية هي المرحلة الأولى من زعزعة استقرار الغشاء التي تنطوي على تعديلات أيونية داخل الخلايا، ثم تُنظم هذه التعديلات من خلال الارتباط العابر للجزيئات على سطح الحيوانات المنوية ، مثل تدفق الكوليسترول وإعادة توزيع بروتينات الغشاء الداخلي والدهون (Dominguez وآخرون ، 2008). التكيف على هذا النحو تسمح لخلايا الحيوانات المنوية الخضوع لتفاعل أكرسوم عادي قبل الإخصاب ، بعض التجارب المبكرة مع IVF كانت فاشلة حيث لم تُكيف خلايا الحيوانات المنوية (Camargo وآخرون ، 2006 ؛ Graham & Moce ، 2005). ومع ذلك فالحفظ بالتبريد يؤدي الى حدوث التكيف في وقت مبكر حيث تتجاوز الحيوانات المنوية بعض العمليات الطبيعية (Morrier وآخرون ، 2002).

التكيف هي عملية تمر فيها الحيوانات المنوية في سلسلة معقدة من التفاعلات البيوكيميائية والفسيولوجية ، يعتقد أن الخطوة الأولى من التكيف هي إزالة وتغيير المكونات المشتقة من الأنابيب المنوية ، البربخ ، الأسهر والبلازما المنوية وهذا سيسمح بالتعرض لمواقع المستقبلات مما يسمح للحيوانات المنوية بالتفاعل بصورة خاصة مع مستقبلات البويضات ، يمكن تحقيق تكيف الحيوانات المنوية بطرق مختلفة منها استخدام الاوسائط الزرعية ، في هذا الصدد لاحظت مجموعة من العلماء إن نسبة أعلى بكثير من البويضات البقرية التي طُورت إلى مرحلة الكيسة الأريمية بعد التلقيح باستخدام الحيوانات المنوية التي عُدت عن طريق السباحة في Fert-TALP المكمل بالهيبارين أكثر من الطرد المركزي مكمل بـ 10 ملي بنزوات من الكافيين والصوديوم (Parrish وآخرون ، 1995) .

يشتمل إخصاب البويضة البقرية على سلسلة من الأحداث التي يمر فيها الحيوان المنوي

(1) متحركًا للوصول إلى البويضة والتحرك من خلال Zona Pellucida (ZP)

(2) لديه القدرة على الخضوع للتكيف والتعبير عن تفاعل الأكرسوم (AR) acrosome reaction

(3) لديه القدرة على الارتباط بغشاء البيلوسيدا والغشاء المحي عن طريق الحصول على بروتينات الربط

الصحيحة أثناء النضج وتعرض مواقع الارتباط هذه إلى البويضة في الوقت المناسب

(4) القدرة على الاندماج مع البويضة

أظهرت المزيد من الاستقصاءات حول تكوين سائل المبيض (الذي يحفز التكيف في الجسم الحي) مستويات عالية جدًا من جليكوسامينوجليكان *Glycosaminoglycans* (GAGs) وركز على توضيح تحريض التكيف فقد حسنت كبريتات الهيبارين GAGs بصورة كبيرة الإخصاب ، وكذلك قُل هذا التحسن من خلال وجود الجلوكوز في الوسائط (Leclerc وآخرون، 1992). ويرتبط الهيبارين ببروتينات البلازما المنوية الموجودة على رأس الحيوانات المنوية مما يؤدي في النهاية إلى انخفاض عدد هذه البروتينات ومع ذلك فإن التغييرات التي يسببها التكيف لا تتوقف عند السطح وقد ساعد اكتشاف الهيبارين بوصفه عاملاً مكثف في فهم التغييرات داخل الخلايا في الحيوانات المنوية بسبب التكيف ، في البيئة الخلوية للحيوانات المنوية ويحث الهيبارين على القلوية ويزيد من كمية cAMP الموجودة ويزيد من تركيز الكالسيوم في كل من الأكرسوم والبيئة الخلوية لرأس الحيوانات المنوية ، تحلل الجلوكوز الناجم عن وجود الجلوكوز يحمي البيئة داخل الخلايا (وبالتالي يعادي القلوية التي يسببها الهيبارين) ، وبالتالي انخفاض في التكيف في الوسط بما في ذلك الجلوكوز، منذ إكتشافه أصبح الهيبارين عامل التكيف الفعلي في IVF في الإبقار (Kepkova وآخرون ، 2011).

2-13-1- الهيبارين وفوائده في التكيف

تدعم الدراسات الرأي القائل بأن تكيف الحيوانات المنوية للثيران بواسطة الهيبارين ربما يعكس آلية الجسم الحي (Parrish وآخرون ، 1999). تعد جرعة الهيبارين وفترة الحضانة لتكيف الحيوانات المنوية من العوامل المهمة التي تؤثر على IVF البقري وتطور الجنين اللاحق (Parrish وآخرون، 1985). إذ يحث الهيبارين على حدوث تغيرات في خصائص ربط بروتينات الحيوانات المنوية بالكالدولين (CaM) ويحث على تقليل تركيزات Ca^{2+} أثناء التكيف (Parrish وآخرون، 1989). ويتطلب تكيف الحيوانات المنوية مع الهيبارين الكالسيوم خارج الخلية وتحدث الحركة القصوى للتكيف التي يسببها الهيبارين عندما يتجاوز الكالسيوم خارج الخلية 10 ميكرومتر (Leibfried-Rutledge وآخرون، 1987). من المعروف أن التغيرات في الكالسيوم تثير زيادة لاحقة في cAMP ، ودرجة الحموضة والتيروزين ضرورية للتكيف (Noda وآخرون، 1991). أيضا في دراسة أخرى ذكرت تأثير كل من 20 ميكروغرام / 1 مل للهيبارين و 10 نانومتر كافيين في تكيف الحيوانات المنوية المجمدة (Pavlok وآخرون، 1993). أشارت تقارير أخرى إلى أنه يمكن تحسين معدل الإخصاب بسرعة عن طريق إضافة الهيبارين إلى الوسط الزرع عند قيم تتراوح بين 0.5-5.0 ميكروغرام / 1 مل (Pincus ، 1951).

2-14- السائل الحويصلي

السائل الجريبي (FF) هو مصل في الدم عُدل عن طريق الأنشطة الأيضية الجريبية ويحتوي على مكونات محددة مثل الستيرويدات والبروتينات السكرية التي تُصنع بواسطة خلايا جدار الجريب ، إن تكميل وسط IVM بالسائل الجريبي البقري (BFF) عند مستوى 10-20 % حسن التطور الجنيني اللاحق في الماشية (Chang، 1951). أيضا سجل دليل على التأثير الإيجابي من إضافة bFF في وسط IVM عند مستوى 20-30% (Izadyar وآخرون، 1996). التأثير في هذه التقارير المختلفة

هو أن بعض العوامل في bFF قد تؤثر بشكل إيجابي على جودة البويضات ومع ذلك يمكن أن يمنع bFF من الجريبات الصغيرة الانقسام الاختزالي في بويضات الماشية (Izadyar وآخرون ، 1997). كان السائل الجريبي من الجريبات الصغيرة والمتوسطة الحجم عند شبق حتى منتصف الفترة أكثر نشاطاً في تنشيط GVBD منه في وقت مبكر من proestrus (Jaakma وآخرون، 1997). الأهم من ذلك أن التركيز العالي لـ bFF 10-20 % في وسط الانضاج أدى إلى منع استئناف الانقسام الاختزالي ومعدلات الإخصاب وتطور الأجنة (Jiang ، 1991). يختلف تركيب السائل الجريبي عن أوساط IVM المستخدمة بصورة واسعة خاصة في تركيز الجلوكوز وهو ركيزة طاقة رئيسية لـ COC (Gilchrist & Thompson ، 2007). تستخدم جراب الأبقار المستخرجة من المبايض لخطوط البحث المختلفة بما في ذلك تنظيم تكاثر الخلايا الحبيبية وتكون السيترويد وتقييم العوامل المؤثرة في النضج في المختبر وإخصاب البويضات وإنتاج العجول من الأبقار ذات القيمة الجينية الرئيسية (Shamsuddin وآخرون ، 1996) .

2-14-1- استخدام السائل الحويصلي في تكيف الحيوانات المنوية

أفاد (Pontbriand وآخرون، 1989) أن استخدام الحيوانات المنوية المجمدة التي أذيت والتي حُضنت مسبقاً في وسائط تحتوي على bFF عن معدل اختراق للحيوانات المنوية penetration بنسبة 56% ، من الواضح أن bFF يحتوي على العديد من المركبات (الجلوكوز الأميني GAGs) (Glycains) القادرة على تعزيز الحيوانات المنوية النور، لهذا السبب استخدم في وسط التكيف للحيوانات المنوية (Restall وآخرون، 1966).

2-15- تكون الجريبات

دراسة تكوين الجريب وعوامل النمو الجريبي مهمة من أجل تطوير بدائل لزيادة فعالية التقنيات الحيوية مثل التزامن الشائع ونقل الأجنة و IVEP ، تظهر بعض الدراسات تأثير عوامل النمو الجرابي موجهة الغدد التناسلية والستيرويدات على التطور الجريبي وطبقات البويضات التراكمية COCs Sartori وآخرون، 2004). يمثل نمو الجريب في الأبقار و في الأنواع الأخرى مرحلتين ، مرحلة نمو بطيئة تستمر لمدة 30 يومًا تقريبًا من تكوين الغشاء بقطر 300 ميكرومتر حتى قطر يتراوح من (3-5) مم (Lussier وآخرون، 1987). هذه المرحلة حاسمة لتنمية قدرة البويضات ، إذ تصل إلى الحجم والكفاءة النهائية (Fair وآخرون، 1997). تحدث مرحلة النمو السريع لمدة (5 - 7) أيام وتمتد من الكشف عن غشاء الجريبات مع 3 مم حتى الإباضة المحتملة لهذا الجريب (Sunderland وآخرون، 1994).

2-15-1- حجم الحويصلات المبيضية Ovarian follicular size

حجم الجريب هو معيار مهم يستخدم في اختيار البويضات (Crozet وآخرون ، 2000) . حجم الجريب الذي حصل منه على البويضات يميز مرحلة تطور الجريب ومراحل الانضاج من البويضة داخل ذلك الجريب (Lequarre وآخرون ، 2005) . وصف (Crozet وآخرون ، 2000) علاقة إيجابية بين القطر الجريبي وقطر البويضات وكفاءة الانقسام والتطور الجنيني في الماعز ، وبعبارة أخرى هناك علاقة بين حجم الجريب وكفاءة البويضات ، تزداد الكفاءة مع تضخم الجريب (Longergan وآخرون ، 1994) . لقد وجد أن حويصلات الأبقار التي يزيد قطرها عن (6) ملم تعطي كمية أكبر من البويضات الموجودة في جريبات (2-6) ملم ، تميل هذه البويضات إلى الحصول على نسبة أعلى من الكيسة الأريمية المنتجة في المختبر مما يشير إلى أن حويصلات أكبر قد تحتوي على عوامل نمو

تعزز الحالة المورفولوجية والوظيفية لعائدات البويضات وعائدات الأجنة (Lonergan وآخرون ، 1994 ؛ Shirazi & Sadeghi ، 2007 ؛ Abdullah وآخرون ، 2008). فضلا عن ذلك فإن الجريبات الأصغر من (2) ملم تنتج بويضات قادرة على الإخصاب ولكنها تفتقر إلى القدرة على الالتصاق بعد مرحلة (8) خلايا (Pavlok وآخرون ، 1992) . وجد أن الحجم الجريبي يؤثر بصورة كبيرة على جودة البويضات التي حصل عليها أثناء الإباضة وكذلك نوعية الجنين الذي حصل عليه (Sirard وآخرون ، 2006). في الماشية تنتج معدلات نمو جنيني أكبر عندما استخدمت حويصلات أكبر من (2-3) ملم (Carmago وآخرون ، 2006). في الأغنام والماعز ترتبط كفاءة البويضة التنموية بوضوح بقطر البويضة حيث تحقق زيادة في الكفاءة التنموية عندما استخدمت حويصلات يزيد قطرها عن (8) ملم (Crozet وآخرون ، 1995 ؛ Hyttel وآخرون ، 1997 ؛ Hendriksen وآخرون ، 2000) . في الماشية اكتسبت البويضات أولاً القدرة على التطور لتصبح كيسة أريمية في النظام المختبري بحجم جريبي من (2-3) ملم ، عندما جمعت الجريبات حسب الحجم تبين أن الجريبات الكبيرة (قطر 10 ملم) تحتوي على بويضات ذات قدرة أكبر على أن تصبح أجنة (Caixeta وآخرون ، 2013). وصفت بعض الدراسات مصير البويضات الفردية وفقاً للحجم الجريبي الدقيق وأكدت زيادة الكفاءة مع حجم الجريب أي (COCs) المعزولة من المبيض الذي يحمل جريبات بقطر (2-5) ملم ، وأظهرت معدلات أقل من الانضاج و تشكيل الكيسة الأريمية من تلك الموجودة في المبايض التي تحمل جريبات يزيد قطرها عن (10) ملم (Carolan وآخرون ، 1994). هذا يشير إلى أن الحويصلات الكبيرة (قطر ≤ 6 ملم) توفر للبيضة بيئة دقيقة تحسن من جودتها (Chang ، 1951). ومع ذلك تشير تقارير أخرى إلى أن الحجم الجريبي قد لا يكون المعيار الوحيد المهم لأن بعض البويضات البقرية التي تنشأ من الجريبات الكبيرة فشلت في إنتاج الأجنة ، في حين أن بعض البويضات من جريبات متوسطة الحجم لديها بالفعل هذه القدرة (Choi وآخرون ، 1998) . أشارت التجارب السابقة إلى أنه يمكن

تحسين انضاج الجريب ومعدل الإباضة لدى بعض الحيوانات الواهبة على الأقل إذا أُعطيت علاجات FSH على مدى (6 أو 7) أيام (Bo وآخرون، 2008 ؛ Garcia وآخرون ، 2012). كذلك ثبت أن LH ضروري للنمو النهائي للجريبات الفائقة و لاتمام انضاج البويضات (Oliveira وآخرون ، 2014).

2-16- خلايا الركam الجرثومي *Cumulus cells*

يحيط بكل من البويضات غير الناضجة والناضجة طبقات من الخلايا المتراكمة تتطور هذه الخلايا من خلايا حبيبية متخصصة تتمايز إلى خلايا حبيبية جدارية وخلايا تراكمية أثناء تكوين الجراب ، تختلف الخلايا المتراكمة بيولوجيًا عن الخلايا الجرابية الأخرى وتؤدي أدوارًا محددة بما في ذلك نقل الإشارات داخل المبيض ودعم نمو البويضات وانضاجها خلال المراحل المتأخرة من التطور الجريبي (Senger ، 2005). كذلك فإنها تحيط وتغذي البويضة ، الاتصال بين الخلايا التراكمية والبويضات ثنائي الاتجاه وضروري لتنظيم كل من نمو البويضات والخلايا التراكمية ، البويضات لديها مصادر طاقة أقل مما هو ضروري لنمو البويضات بصورة صحيحة لذا فإن الخلايا التراكمية ضرورية لنقل الطاقة إلى البويضات من خلال تقاطعات الفجوة (Franciosi وآخرون ، 2014). بعد افراز الهرمون اللوتيني من منطقة السرج تنتج الخلايا الحبيبية عوامل نمو البشرة التي تعمل على خلايا الركam لتحفيز توسع الركam وانضاج البويضات (Hung وآخرون، 2015). تنظم الخلايا المتراكمة نمو وانضاج البويضات وعملية الإخصاب (Da Costa وآخرون ، 2015). تمثل نسبة عالية من البويضات المخصبة عن معدل إخصاب غير طبيعي بعد الانضاج عندما يكون هناك عدم وجود خلايا تراكمية حول البويضة ، كانت البويضات الناضجة التي تحتوي على خلايا تراكمية سليمة قبل الإخصاب قادرة على التطور إلى أجنة قابلة للحياة بمعدلات مماثلة للبويضات المبيضة بعد الإخصاب في المختبر (Vanderhyden and Armstrong ، 1989). يوضح هذا الأثر الأساس للخلايا المتراكمة في مساعدة الانضاج الطبيعي

السيترولازمي للبويضات اللازمة لتشكيل النواة والقدرة التنموية الكاملة (Vanderhyden and Armstrong، 1989).

2-16-1- سمك الركam الجرثومي وقطر البويضات

يختلف سمك الركam وفقاً لحجم الجريبات ، وقد ربطت سلامة الركam بالحالة الصحية للجريبات (Leibfried ، 1979) . البويضات التي تحتوي على تراكم أكثر سمكاً لها أيضاً معدلات نمو أعلى (Lonergan واخرون ، 1994) . ومع ذلك فشلت بعض البويضات من الجريبات الكبيرة في إنتاج الأجنة في حين نجحت بعض البويضات من جريبات متوسطة الحجم (Sirard ، 1996) . في هذا الصدد فإن البويضات ذات الركam المتراكم متعدد الطبقات والسايتوبلازم المتجانس لها قدرة تنموية أعلى من COCs المظلمة مع الركam الموسع والسايتوبلازم غير المنتظم (De Loos واخرون ، 1991) . بالإضافة إلى ذلك يبدو أن هناك علاقة بين قطر البويضات والكفاءة التنموية ، تعد البويضات البقية في مرحلة نمو يصل قطرها إلى 110 مايكرومتر ، لاكتساب الكفاءة الانشطارية الكاملة عند 115 مايكرومتر ، والحصول على الكفاءة التنموية الكاملة عند 120 مايكرومتر (Otoi واخرون ، 1997).

2-17- نقل الأجنة (ET) Embryo transfer

عادة ما يُستخدم نقل الأجنة (ET) في الأبقار الحلوب كأداة لتحسين الوراثة فضلاً عن ذلك يمكن استخدام ET لتعزيز الكفاءة التناسلية لقطعان خاصة في الأبقار في ظروف فسيولوجية معينة مثل الإجهاد الحراري (Demetrio واخرون، 2006 ؛ Stewart واخرون، 2011). بدأ نقل الأجنة تجارياً في أمريكا الشمالية في أوائل السبعينيات ، وسرعان ما انتشرت التكنولوجيا إلى أمريكا الجنوبية إذ تصدرت البرازيل والأرجنتين باستمرار في البلدان الخمسة الأولى خارج أمريكا الشمالية وأوروبا في أجنة إنتاج IVD (Bo and Mapletoft ، 2014). أفادت (Viana ، 2018) مؤخراً تم إنتاج أكثر من

992.289 IVEP و 495.054 من أجنة الأبقار IVD في جميع أنحاء العالم في عام 2017. التكنولوجيا الحيوية التناسلية البديلة لإنتاج الأجنة هي إنتاج الأجنة المختبرية (IVEP) ، تسمح هذه التكنولوجيا الحيوية من واهبين محتملين وراثيا بإنتاج عدد كبير من الأجنة خلال فترة زمنية قصيرة (Pontes وآخرون، 2009) وتسمح باستخدام الحيوانات المنوية المصنفة حسب الجنس دون المساس بشكل كبير بإنتاج الأجنة (Zhang وآخرون، 2003 ؛ Carvalho وآخرون ، 2010). تطبيق برنامج ناجح باستخدام أجنة IVD أو IVP لا يعتمد فقط على نظام IVP قوي ولكن أيضًا على تنفيذ برنامج ناجح لنقل الأجنة ، تعد التغذية والإدارة والكفاءة في مزامنة الشبق والإباضة من بين العوامل التي تؤثر على استخدام هذه التقنيات (Mapletoft and Bo، 2016). ومن أجل توفير البيئة المثلى للتواصل بين الأم والجنين لا بد من مزامنة دورة الشبق للمستلم ، الآليات العصبية التي تؤدي إلى دخول الجنين في الوقت المناسب إلى قرون الرحم ، قد لا يتعارض الدخول المبكر إلى الرحم مع التطور الجنيني اللاحق الطبيعي (Greve and Callesen، 2001). ازداد عدد الأجنة المنتجة على مر السنين في العديد من مناطق العالم (Viana، 2018). تعتمد برامج نقل الأجنة التجارية على إنتاج أجنة منتجة مختبريا من المبايض بعد الذبح (Lu وآخرون، 1992).

الفصل الثالث

مواد وطرق العمل

Materials And Methods

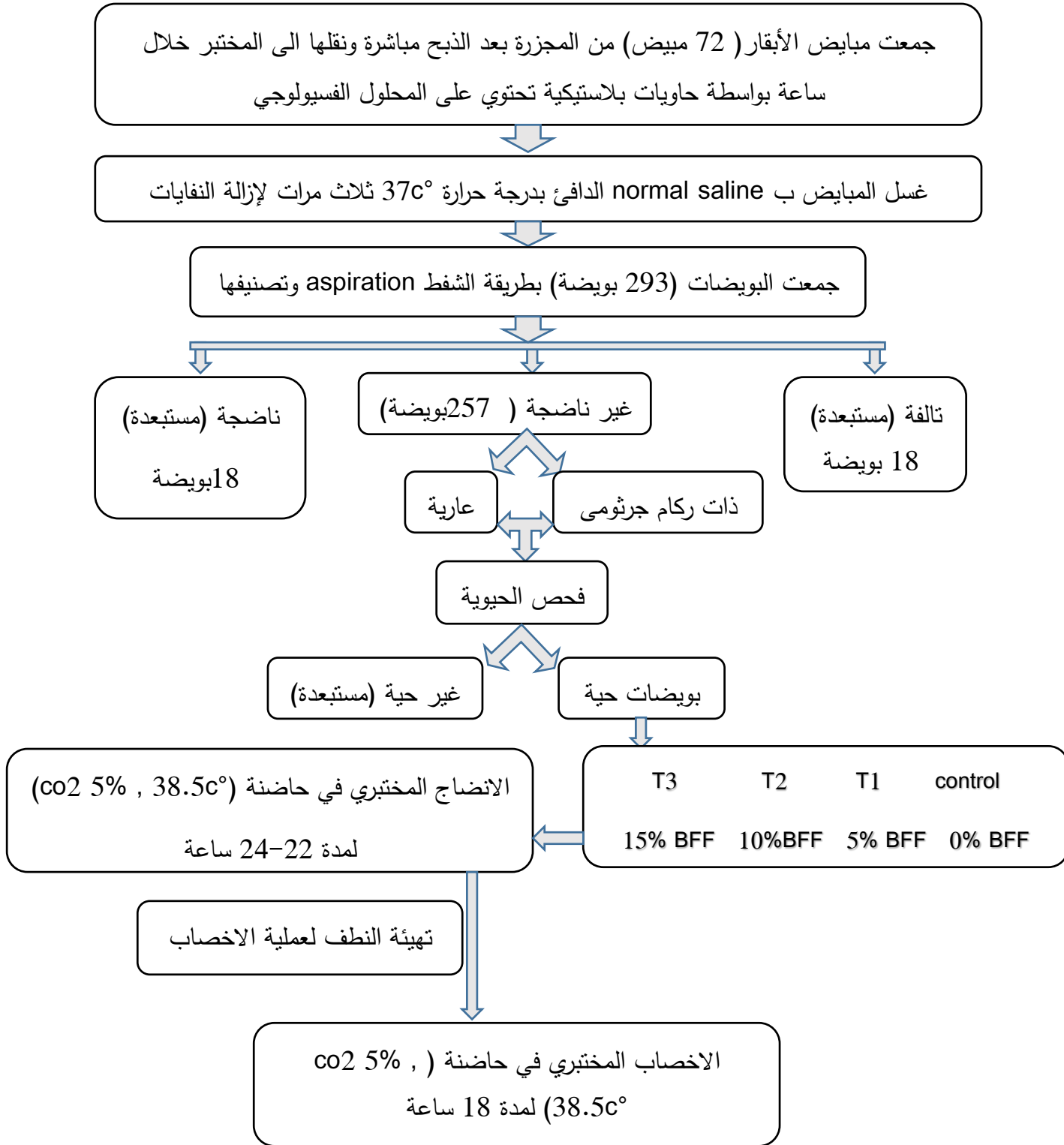
الفصل الثالث : مواد وطرق العمل Materials And Methods

أُجريت الدراسة في مختبر الدراسات العليا في كلية الزراعة جامعة المثنى قسم الانتاج الحيواني للفترة من 2019 \ 12 \ 1 ولغاية 2020 \ 7 \ 29 ، لدراسة تأثير وقت جمع البويضات وإضافة تراكيز مختلفة من السائل الحويصلي البقري الى الاوساط الزرعية المستخدمة في عملية الإنضاج والإخصاب المختبري لبويضات الأبقار، بواقع تجربتين تضمنت الاولى عملية الانضاج وعلى اربعة معاملات قسمت الى معاملة السيطرة باستخدام الوسط الزرعى TCM-199 بتركيز 0% من السائل الحويصلي ، المعاملة الاولى أضيف تركيز 5% سائل حويصلي ، المعاملة الثانية إضافة تركيز 10% سائل حويصلي ، المعاملة الثالثة اضافة تركيز 15% سائل حويصلي .

أما التجربة الثانية تضمنت عملية الإخصاب وعلى اربعة معاملات قسمت الى معاملة السيطرة باستخدام الوسط الزرعى fert-TALP بتركيز 0% من السائل الحويصلي ، المعاملة الاولى أضيف تركيز 5% سائل حويصلي ، المعاملة الثانية إضافة تركيز 10% سائل حويصلي ، المعاملة الثالثة اضافة تركيز 15% سائل حويصلي .

قُسمت التجربة إلى ثمان أسابيع وعلى ثلاثة مواسم مختلفة وفي درجات حرارة مختلفة ، حيث كانت الأسابيع الاول والثاني والثالث في شهري كانون الثاني وشباط ، في حين كانت الأسابيع الرابع والخامس والسادس في شهري نيسان وآيار ، اما الأسبوعان السابع والثامن فقد كانا في شهري حزيران وتموز .

مخطط (١) يوضح مراحل التجربة



3-1- جمع السائل الحويصلي

جُمعت المبايض من الأبقار المذبوحة مباشرة بعد الذبح في المجزرة ، ثم نقلها في علبة حافظة للحرارة إلى المختبر عند ٢٨-٣٥ درجة مئوية في محلول فسيولوجي (٩,٠ ٪) كلوريد الصوديوم و (١ ٪) من المضادات الحيوية (١٠٠ UI / مل بنسلين ، ١٠٠ UI / مل الستربتومايسين خلال ساعة ، ثم غُسلت ثلاث مرات بالمحلول الملحي الدافئ لتخليصها من الشوائب والدم (rezk ، 2009) . بعد ذلك جُمع السائل الجريبي من الجريبات بطريقة الشفط باستخدام حقنة ١٠ مل بإبرة قياس ٢٠ جي ، ثم اجراء عملة الطرد المركزي بسرعة ٣٠٠٠ دورة ١ دقيقة لمدة ٣٠ دقيقة وفي درجة حرارة ٤٠ مئوية ، جمعت المادة الطافية وتصفيتها من خلال مرشح ٢٢ ميكرون وثم نقلها إلى دورق زجاجي معقم لإجراء عملية التعطيل (inactivation) لتعطيل فعالية الكلوبولينات المناعية التي تعيق عملية الانضاج .

3-1-1- عملية تعطيل فعالية الكلوبينات المناعية

بعد جمع السائل الحويصلي البقري وترشيحه تُجرى عملية تعطيل فعالية الكلوبينات المناعية التي تعيق عملية الإنضاج وذلك من خلال وضع السائل الحويصلي البقري في دورق زجاجي معقم في درجة حرارة ٥٦ درجة مئوية لمدة ساعة واحدة في حمام مائي وخزنت في تجميد عميق عند -٢٠ درجة مئوية لحين استخدامه (Kruip and Dieleman ، 1982) .

3-2- جمع البويضات

استند البحث على الحيوانات المذبوحة في المجزرة كمصدر للحصول على مبايض للأبقار لغرض إجراء التجربة حيث تم وضعها في حاوية تحتوي على محلول ملحي بدرجة حرارة ٣٢-٣٥ مئوية

مع اضافة المضادات الحيوية (البنسلين والستريتين مايسين) خلال ساعة، ثم غُسلت ثلاث مرات بالمحلول الملحي الدافئ لتخليصها من الشوائب والدم (rezk ، 2009) . ثم جمعت البويضات بطريقة الشفط aspiration من الجريبات التي لا يقل قطرها عن ٢ ملم بإبرة قاييس ٢٠ جي وحقنة ١٠ مل تحتوي على ١ مل من HEPES و ١٠٠ mL / UI هيبارين لمنع التصاق البويضات مع بعض (Robledo-Verduzco وآخرون ، 2009) . بعد ذلك وضعت في طبق بتري لغسلها ثلاث مرات بالوسط الزرعي لغرض ازالة الشوائب باستخدام pasteur pipette مصممة يدويا ، بعد ذلك جمعت البويض ونقلت الى الوسط الزرعي لغرض تصنيفها حسب الشكل ثم فحص الحيوية.

3-2-1- التصنيف حسب الشكل

بعد عزل وغسل البويضات نقلت الى طبق بتري يحتوي على الوسط الزرعي المضاف له ١ مل من HEPES و ١٠٠ mL / UI هيبارين ، وتم تصنيفها على اساس الشكل الخارجي من حيث احتوائها على طبقات ركامية اوعدم وجودها وكذلك حسب تجانس الساييتوبلام من عدمه ، كذلك حسب كونها متفسخة ام طبيعية ، ايضا حسب كونها ناضجة ام غي ناضجة ، حيث استبعدت التالفة وذات الشكل غير الطبيعي والناضجة ثم بعد ذلك تنقل الى اطباق فحص الحيوية .

3-2-2- فحص الحيوية للبويضات

بعد فحص الشكل المورفولوجي للبويضات نقلت البويضات ذات الشكل الطبيعي العارية ذات الركام الى اطباق بتري وذلك لغرض فحص الحيوية باستخدام مادة الـ 0.4% trypan blue ، إذ ان البويضات التي تصطبغ بصبغة التريبان تدل على انها ميتة اما التي لا تصطبغ فهي حية (Abd-Allah ، 2010) .

3-2-3- تقنية الإنضاج المختبري

بعد اجراء فحص الحيوية غسلت البويضات ثلاث مرات بالوسط الزراعي TCM-199 المدعم بالهرمونات ، ثم نقلت البيوض في طبق بتري مقسم الى أربعة اقسام يدعى four well إذ وضع ٥٠٠ مايكرو مل من كل من الاوساط الزرعية للمعاملات الاربعة بالتراكيز المختلفة من السائل الحويصلي 0% ، 5% ، 10% ، 15% . ووضعت فيها البويضات بالتساوي ٤-٩ بويضات في كل معاملة ثم غُطيت بزيت البارافين paraffin oil ووضعها في حاضنة تحتوي على 5% CO₂ ، ودرجة حرارة 38.5 درجة مئوية و رطوبة 95% ولمدة 22-24 ساعة (Alsaadoon ، 2014) .

3-2-4 - تهيئة النطف لعملية الإخصاب

استخدم في هذه التجربة النطف من القصبات المجمدة المحفوظة في نيتروجين سائل بدرجة حرارة -١٩٦ درجة مئوية ، حيث تم إذابة قصبتين للسائل المنوي في أنبوب ١٥ مل يحتوي ٢ مل من سائل تكييف النطف SP-TALP ثم يتم الطرد المركزي عند ٧٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ٧ دقائق عند درجة حرارة الغرفة (٢٥ درجة مئوية) لمرتين.تم شطف المادة الطافية وإضافة ١ مل من السائل المنوي الى الوسط الزرع SP-TALP ويوضع في الحاضنة بزاوية ٤٥ درجة بصورة مائلة ، بعد ثلاثين دقيقة عند ٣٧ درجة مئوية ، تسبح الحيوانات المنوية النشطة إلى الطبقة العليا ونأخذ ٠,٥ مل العلوي المحتوي على الحيوانات المنوية التي تطفو بعملية السباحة نحو الأعلى ، ليتم تقييم الحركة تحت المجهر ، بعد ذلك تأخذ الطبقة العلوية من النطف التي سبحت نحو الأعلى ليتم استخدامها في عملية الإخصاب (desmedt واخرون ، 1992) .

3-2-5 - تقنية الاخصاب المختبري

بعد اكتمال عملية الانضاج وتهيئة النطف بتقنية السباحة نحو الأعلى بُهيئ الوسط الزراعي للإخصاب ، إذ توضع البيوض الناضجة في الوسط الزراعي Fert-TALP المضاف له السائل الحويصلي في طبق بتري four well وحسب المعاملات بتركيز 0% للسيطرة و 5% ، 10% ، 15% للمعاملات الثانية والثالثة والرابعة على التوالي ، ثم تغطى بزيت البارافين وتوضع في حاضنة تحتوي على 5% CO₂ ، ودرجة حرارة 38.5 درجة مئوية و رطوبة 95% ولمدة 18 ساعة (Alsaadoon ، 2014) . بعد 18 ساعة يتم فحص الاخصاب تحت المجهر .

جدول (1) مكونات الوسط الزراعي HTCM المستخدم في جمع البويضات مضاف اليه 10% FBS

Ingredient	Cat. number	Amount
Medium 199+ Hepes	M2520	1.47gr
Sodium bicarbonate	S5761	0.22gr
Sodium pyruvate	P4562	0.0022gr
Pen/strep		1000µl
Millipore H ₂ O		100 ml

جدول (2) مكونات الوسط الزراعي TCM المستخدم في عملية الانضاج

Ingredient	Cat. number	Amount
Medium 199	M5017	0.475gr
Sodium bicarbonate	S5761	0.11gr
Sodium pyruvate	P4562	0.0011gr
Pen/strep		500µl
Millipore H ₂ O		50 ml

جدول (3) مكونات الوسط الزراعي fert-TALP المستخدم في عملية الاخصاب

مضاف اليه 0.5%Heparin + BSA 6mgr/ ml

Ingredient	Cat.number	Amount
CaCl ₂ .2H ₂ O	C2661	29.4mg
KCl	P5405	23.9mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	M2393	10.1mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	S5011	5.5mg
NaCl	S5886	666mg
NaHCO ₃	S5761	210mg
Lactic Acid (Sodium salt)	L7900	186μl
Pen/Sterp		1000μl
Millipore H ₂ O		100ml

جدول (4) مكونات الوسط الزراعي SP-TALP المستخدم في تنشيط النطف بتقنية

السباحة نحو الاعلى مضاف اليه BSA 6mg/ml

Ingredient	Cat.number	Amount
CaCl ₂ .2H ₂ O	C2661	29.4mg
KCl	P5405	23.1mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	M2393	8.1mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	S5011	4.1mg
NaCl	S5886	584mg
NaHCO ₃	S5761	210mg
Lactic Acid (Sodium salt)	L7900	368μl
Hepes		238mg
Pen/Sterp		1000μl
Millipore H ₂ O		100ml

- هذه التراكيز في الجداول (1,2,3,4) صادرة عن (مركز أبحاث الخلايا الجذعية – جامعة طهران)

3-3 - التحليل الإحصائي

استعمل البرنامج الإحصائي SAS- Statistical Analysis System (2012) في تحليل البيانات لدراسة تأثير العوامل المختلفة في الصفات المدروسة ، وقورنت الفروق المعنوية بين النسب المئوية باختبار مربع كاي (χ^2 : Chi-Square) ، وعلى مستوى معنوية 0.05 و 0.01 .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

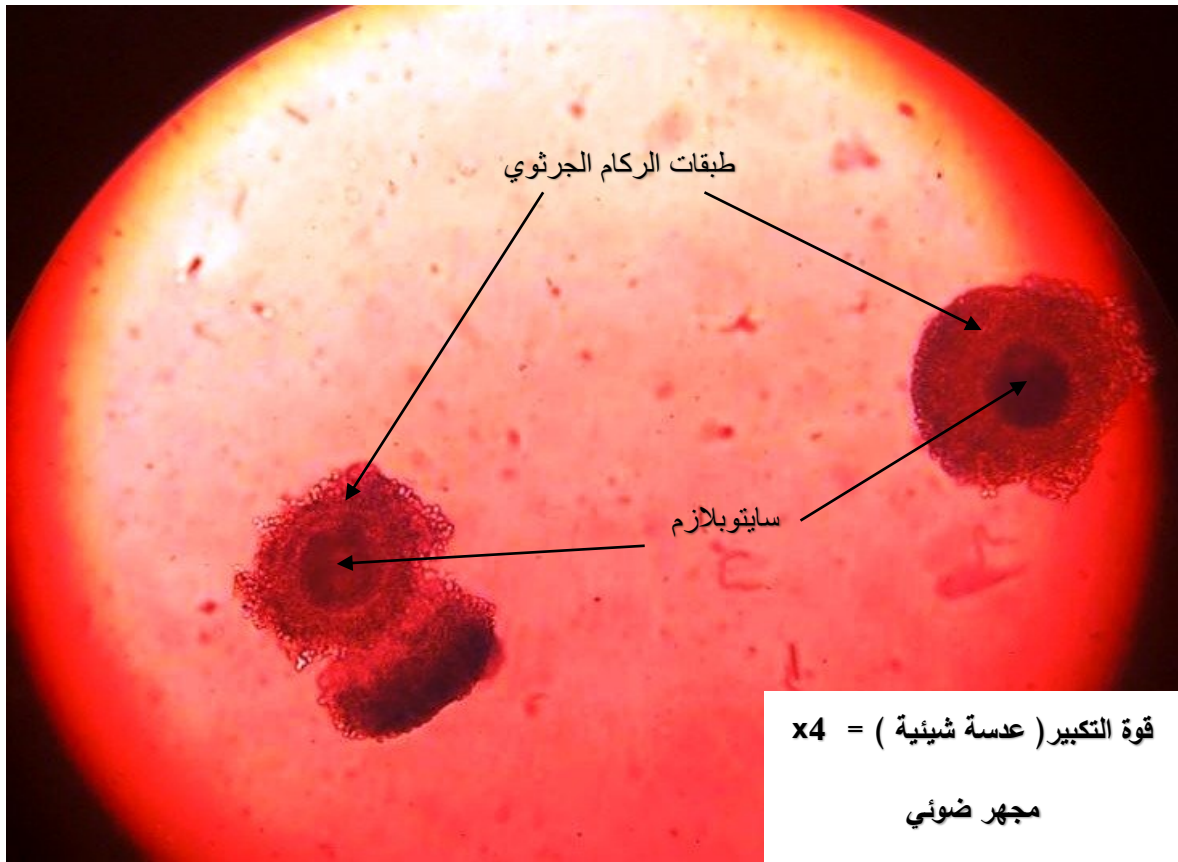
Result And Discussion

Result And Discussion : النتائج والمناقشة

جدول (5) جميع البيانات المستحصل عليها خلال التجربة

ت	التاريخ	عدد المبايض	عدد البويضات الكلي	عدد البويضات النافذة	عدد البويضات غير النافذة ذات الشكل الطبيعي الكلي	عدد البويضات غير النافذة الميته (تحتوي ركام جرثومي)	عدد البويضات غير النافذة الميته (عارية)	عدد البويضات غير النافذة الحية	عدد البويضات الحية ذات ركام جرثومي	عدد البويضات الحية العارية
1	الاسبوع الاول	10	42	3	37	3	0	34	32	2
2	الاسبوع الثاني	12	46	2	40	2	1	37	35	2
3	الاسبوع الثالث	8	38	2	34	3	0	31	28	3
4	الاسبوع الرابع	6	21	1	19	1	1	17	17	0
5	الاسبوع الخامس	10	57	4	48	2	2	44	42	2
6	الاسبوع السادس	8	35	2	31	2	0	29	26	3
7	الاسبوع السابع	6	20	1	19	2	0	17	15	2
8	الاسبوع الثامن	12	34	3	29	1	1	27	25	2
9	المجموع	72	293	18	257	16	5	236	220	16

شكل (1) بويضة بقرة ذات شكل طبيعي تحتوي على طبقات عدة من الركام الجرثومي



شكل (2) بويضة بقرة ذات شكل طبيعي عارية



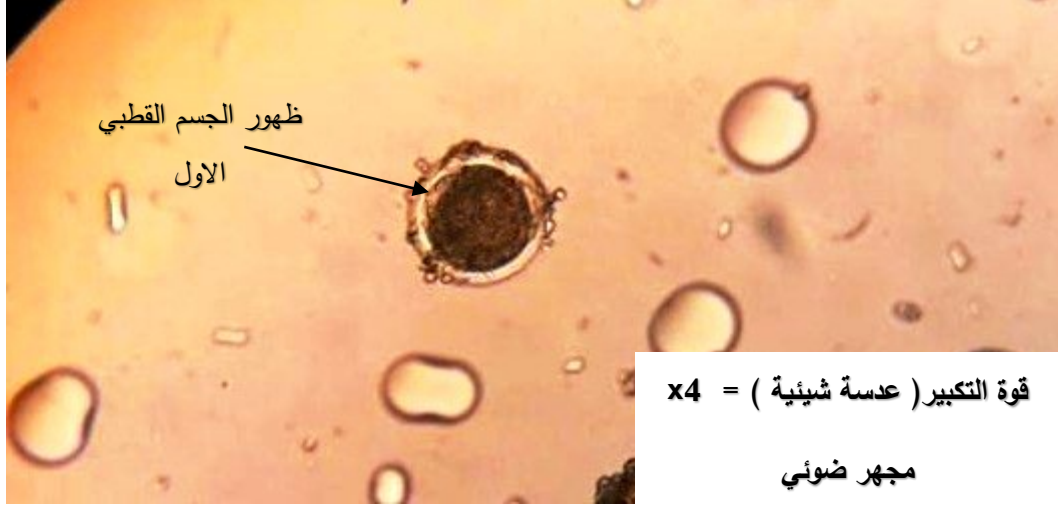
شكل (3) بويضة ذات شكل غير طبيعي



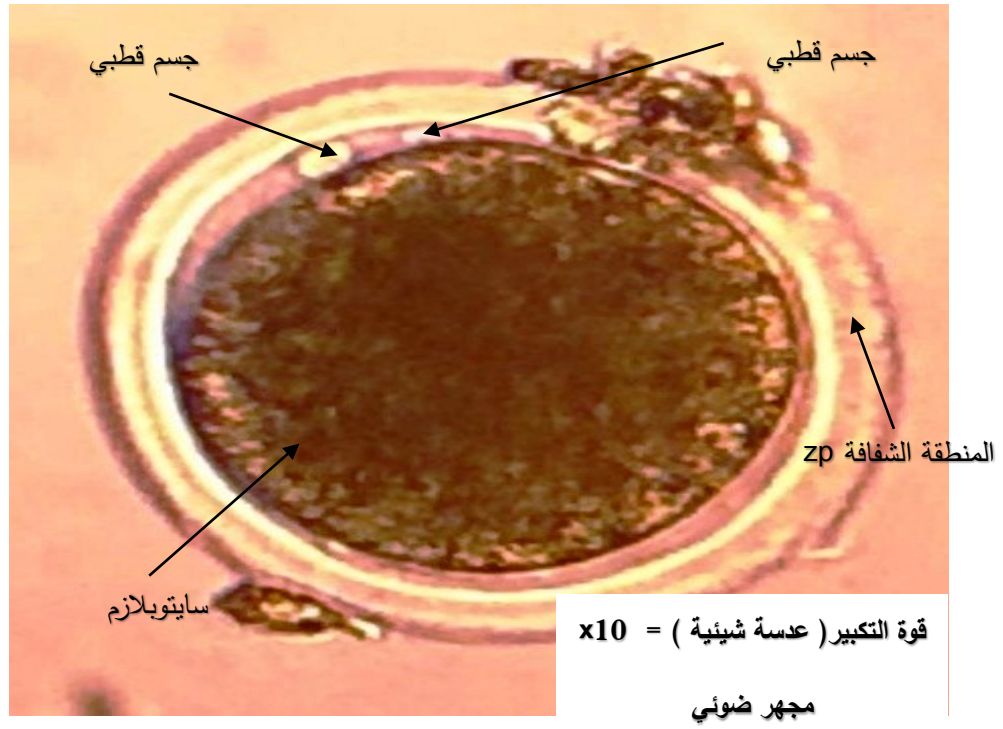
شكل (4) بويضة غير حية تظهر مصطبغة بصبغة trypan blue



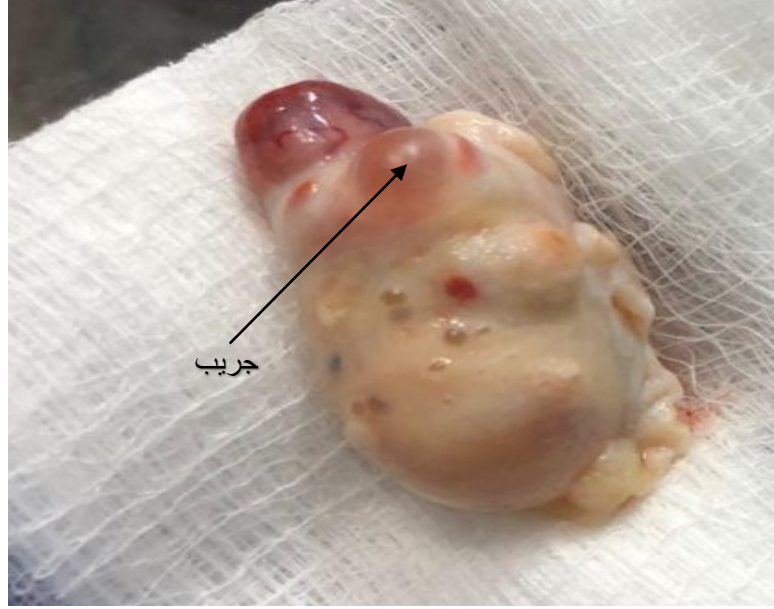
شكل (5) بويضة بقرة ناضجة



شكل (6) بويضة مخصبة



شكل (7) يبين ظهور الجريبات على مبيض البقرة



4-1- نتائج فحص الحيوية للبيوضات

أظهرت نتائج الدراسة عدم وجود فروق معنوية بين الأسابيع في النسبة المئوية للبيوضات الحية والميتة . جدول رقم (6) ، إن عدم وجود فروق معنوية بين أشهر الدراسة المختلفة يبين عدم تأثير صفة النسبة المئوية لحيوية بويضات الأبقار بأسابيع الدراسة علما أن الأسابيع الثلاثة الأولى كانت في فصل الشتاء والأسابيع الثلاثة بعدها في فصل الربيع أما الأسبوعان الأخيران فكانا في فصل الصيف وهذا قد يرجع الى التغذية الجيدة للحيوانات حيث يتلشى تأثير الموسم عند توفر ظروف الإدارة الجيدة وفي مقدمتها التغذية (Martin وآخرون ، 1994) .

جدول رقم 6: نتائج فحص الحيوية للبويضات للأسابيع المختلفة

أسابيع التجربة	عدد البويضات الكلي	عدد البويضات الميئة	النسبة المئوية	عدد البويضات الحية	النسبة المئوية
الاسبوع الاول	37	3	8.11%	34	91.89%
الاسبوع الثاني	40	3	7.50%	37	92.50%
الاسبوع الثالث	34	3	8.82%	31	91.18%
الاسبوع الرابع	19	2	10.53%	17	89.47%
الاسبوع الخامس	48	4	8.33%	44	91.67%
الاسبوع السادس	31	2	6.45%	29	93.55%
الاسبوع السابع	19	2	10.53%	17	89.47%
الاسبوع الثامن	29	2	6.90%	27	93.10%
المجموع	257	21	8.17%	236	91.83%
قيمة مربع كاي (χ^2)	---	---	2.373 NS	---	2.373 NS
NS: غير معنوي.					

4-2- الشكل المورفولوجي

بينت نتائج دراسة الشكل المورفولوجي للبويضات عدم وجود فروق معنوية بين أسابيع الدراسة المختلفة في النسبة المئوية للبويضات التالفة ، فيما أظهرت وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) بين أسابيع الدراسة في النسبة المئوية للبويضات ذات الشكل الطبيعي الناضجة وكانت أعلى نسبة مئوية في الأسبوع الخامس (8.77%) وأقل نسبة مئوية في الأسبوعين السابع (0.00%) جدول

(7) ، كذلك حصلت فروق معنوية ($P \leq 0.05$) بين أسابيع الدراسة في النسبة المئوية للبويضات ذات الشكل الطبيعي والركام الجرثومي وكانت اعلى نسبة مئوية في الأسبوع الرابع (85.71%) وأقل نسبة مئوية في الأسبوع الثامن (76.47%) جدول (7) ، وحصل إختلاف معنوي ($P \leq 0.05$) بين أسابيع الدراسة في النسبة المئوية للبويضات العارية ذات الشكل الطبيعي وكانت أعلى نسبة مئوية في الأسبوع السابع (10.00%) وأقل نسبة مئوية في الأسبوع الرابع (4.76%) . جدول (7) . إن سبب هذا التفاوت في النسب يرجع إلى إختلاف الظروف البيئية ، حيث تؤثر درجة الحرارة والرطوبة البيئية المرتفعة على الأحداث التناسلية من خلال تقليل التعبير عن سلوك الشبق و تغيير نمو الحويصلات و كفاءة البويضات وتنشيط تطور الجنين (Rensis وآخرون ، 2003 ، Roth ، 2008) . ثبت أن الإجهاد الحراري يقلل بشكل ملحوظ على القدرة على النمو وجودة البويضات المستحصل عليها من عملية الجمع (Rocha A وآخرون ، 1998). الفرق المعنوي الحاصل في فترة الربيع يرجع إلى الظروف الجوية في تلك الفترة ، كذلك أشار (di palo وآخرون ، 2001) إلى إنه عندما تقل ساعات الضوء اليومية بمنتصف الشتاء والربيع والصيف لم تؤثر على عدد الجريبات الصغيرة في الجاموس الواهب ولم يختلف متوسط عدد الجريبات الإجمالي ، وكذلك تكون الجريبات ذات الأحجام المختلفة (أي الكبيرة ، والمتوسطة والصغيرة) بين الفترات الموسمية إذ لوحظ أن كل من عدد الجريبات وعدد البويضات كان أعلى في الخريف والشتاء من الربيع والصيف. بالنسبة للفرق المعنوي في البويضات ذات الركام الجرثومي ، قد يرجع السبب الى الأثر الفسيولوجي الكبير الذي تؤديه طبقات الركام الجرثومي فهي عبارة عن طبقات ضعيفة التماسك من الخلايا الحبيبية ، بينما تكون الخلايا الحبيبية القريبة من ال (ZP محكمة التماسك وعلى شكل طبقات متعددة و تسمى بالإكليل الشعاعي Corona radiate) وتتماسك الخلايا الحبيبية للركام الجرثومي سوية بواسطة النسيج بين الخلوي اللزج و

يعتقد أنه غني بحامض هايلورونك Hyloronic acid وتبقى خلايا الركام الجرثومي ممسكة

بالبويضة لساعات عدة بعد الإباضة وتؤدي دورا مهما في عملية الإنضاج والإخصاب (Albertini)

واخرون ، 2001 ، Gilchrist واخرون ، 2008) .

جدول 7: تصنيف البويضات حسب الشكل باختلاف أسابيع الدراسة

أسابيع التجربة	عدد البويضات الكلي	التالفة (شكل غير طبيعي)	النسبة المئوية	شكل طبيعي (ناضجة)	النسبة المئوية	شكل طبيعي (تحتوي ركام جرثومي)	النسبة المئوية	شكل طبيعي (عارية)	النسبة المئوية
		العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%
الأول	42	3	7.14	2	4.76	35	83.33	2	5.71
الثاني	46	2	4.35	4	8.70	37	80.43	3	6.52
الثالث	38	2	5.26	2	5.26	31	81.58	3	7.89
الرابع	21	1	4.76	1	4.76	18	85.71	1	4.76
الخامس	57	4	7.02	5	8.77	44	77.19	4	7.02
السادس	35	2	5.71	2	5.71	28	80.00	3	8.57
السابع	20	1	5.00	0	0.00	17	85.00	2	10.00
الثامن	34	3	8.82	2	5.88	26	76.47	3	8.82
المجموع	293	18	6.14	18	6.14	236	80.55	21	7.17
قيمة مربع كاي (χ^2)	---	---	1.672 NS	---	4.502 *	---	5.169 *	---	3.922 *
* (P<0.05) ، ** (P<0.01) ، NS: غير معنوي.									

جدول 8: عدد البويضات الكلي للمعاملات وللأسابيع المختلفة

المعاملات				الأسبوع
T3 15% BFF	T2 10% BFF	T1 5% BFF	control 0% BFF	
8	8	9	9	الأول
10	10	8	9	الثاني
8	8	8	7	الثالث
5	4	4	4	الرابع
11	11	11	11	الخامس
7	8	7	7	السادس
5	4	4	4	السابع
7	7	7	6	الثامن
61	60	58	57	المجموع

4-3- النسبة المئوية للإنضاج المختبري لمعاملات التجربة

أظهرت نتائج عملية الإنضاج المختبري وجود فرق عالي المعنوية ($P \leq 0.01$) في النسبة المئوية لإنضاج البويضات لمعاملة السيطرة (0%) سائل حويصلي بقري بين أسابيع التجربة إذ كانت أعلى نسبة مئوية في الأسبوع الثاني (77.78%) وأقل نسبة مئوية في الأسبوع السابع (25.00%) (جدول 9)، أيضا أظهرت النتائج وجود فرق عالي المعنوية ($P \leq 0.01$) في النسبة المئوية لأنضاج البويضات للمعاملة الأولى (5%) سائل حويصلي بقري وللأسابيع المختلفة وكانت

أعلى نسبة في الأسبوعين الثاني والرابع (75.00%) وأقل نسبة في الأسبوعين الثالث والسابع (50.00%) ، كذلك المعاملة الثانية (10%) سائل حويصلي بقري بينت وجود فرق عالي المعنوية ($P \leq 0.01$) في النسبة المئوية للإنضاج البويضات وللأسابيع المختلفة وكانت أعلى نسبة في الأسبوع السادس (75.00%) وأقل نسبة في الأسابيع الثالث والرابع والسابع (50.00%) ، كذلك المعاملة الثالثة (15%) سائل حويصلي بقري أظهرت فرق عالي المعنوية ($P \leq 0.01$) في نسبة الإنضاج المختبري للبيوضات للأسابيع المختلفة وكانت أعلى نسبة في الأسبوع السادس (85.71%) وأقل نسبة في الأسبوع السابع (40.00%) .

أما بالنسبة للإختلافات بين المعاملات ضمن الأسبوع الواحد فقد تبين من خلال نتائج الدراسة عدم وجود فروق معنوية في النسبة المئوية للإنضاج المختبري بين المعاملات ضمن الأسبوع الأول ، فيما حصل فرق معنوي ($P \leq 0.05$) بين معاملات التجربة في النسبة المئوية للإنضاج المختبري ضمن الأسبوع الثاني وكانت قيمة مربع كاي للمعاملات المختلفة (4.38) ، وفي الأسبوع الثالث كانت الفروق المعنوية عالية ($P \leq 0.01$) بين المعاملات في النسبة المئوية للإنضاج المختبري حيث كانت قيمة مربع كاي (8.41) لمعاملات التجربة ، كذلك الأسبوع الرابع أظهر فروقا معنوية عالية ($P \leq 0.01$) بين معاملات التجربة في النسبة المئوية للإنضاج المختبري وكانت قيمة مربع كاي (8.03) لمعاملات التجربة ، وفي الأسبوع الخامس كانت الفروق عالية المعنوية ($P \leq 0.01$) بين المعاملات في النسبة المئوية للإنضاج المختبري حيث كانت قيمة مربع كاي (7.52) لمعاملات التجربة ، وفي الأسبوع السادس أظهر فروقا معنوية عالية ($P \leq 0.01$) بين معاملات التجربة في النسبة المئوية للإنضاج المختبري وكانت قيمة مربع كاي (9.02) لمعاملات التجربة ، فيما أظهر الأسبوع السابع فروقا معنوية عالية ($P \leq 0.01$) بين المعاملات في النسبة المئوية للإنضاج المختبري حيث كانت قيمة مربع كاي (8.61) لمعاملات التجربة ، أما فيما

يخص الأسبوع الثامن كانت الفروق معنوية ($P \leq 0.05$) بين معاملات التجربة في النسبة المئوية للإنضاج المختبري وكانت قيمة مربع كاي (5.28) لمعاملات التجربة ، أما المحصلة النهائية للبويضات الناضجة لمجموع الأسابيع وللمعاملات المختلفة أظهرت فرقا معنويا ($P \leq 0.05$) حيث تفوقت المعاملة الثالثة (15%) سائل حويصلي بقري في نسبة الإنضاج المختبري وكانت (68.85%) على المعاملات جميعها ، أما المعاملة الأولى بتركيز (5%) سائل حويصلي بقري فأعطت أقل نسبة إنضاج مختبري وكانت النسبة (58.62%) . جدول رقم (9) ، لوحظ وجود تفاوت في نسب الإنضاج خلال أسابيع الدراسة وللمعاملات المختلفة وقد يرجع السبب إلى اختلاف درجات الحرارة ، إذ ثبت أن التعرض للإجهاد الحراري له تأثير ضار أقل على الوظيفة الإنجابية لسلالات الماشية المتكيفة مع المناخ الحار مقارنة بالسلالات من المناخات المعتدلة (Rocha والآخرين ، 1998). فضلا عن ذلك هناك إختلافات وراثية في القابلية لإرتفاع درجة الحرارة عند مستويات البويضات والجنين (Rocha وآخرون ، 1998 ؛ Hernandez وآخرون ، 2004) . وبالتالي قد يعود سبب هذه التناقضات الى التأثيرات الموسمية على جودة البويضات (Kendrick وآخرون ، 1999) . تفوقت المعاملة الثالثة التي تحتوي على (15%) سائل حويصلي بقري في النسبة المئوية للإنضاج المختري ويرجع السبب إلى مكونات السائل الحويصلي الذي هو خليط معقد التركيب من المصل والإفرازات المصنعة من الخلايا الجريبية (Wise ، 1987) مشتق من بلازما الدم (Gosden وآخرون ، 1988). يتشكل السائل الحويصلي في مرحلة مبكرة وتشير تقارير عدة إلى أن البروتينات الموجودة في السائل الحويصلي مستمدة من الدم وطبقات الخلايا الجسدية المحيطة ، وأظهرت دراسات سابقة أن معظم البروتينات والمكونات الأخرى تتجاوز بسهولة الحاجز الدموي إلى داخل الحويصلة ، كذلك فإن خلايا المبيض تفرز عددا من المواد القابلة للذوبان كالمنشطات وعوامل نمو أخرى الى السائل الحويصلي (Floerfida وآخرون

،(2014). ويعمل السائل الحويصلي كوسط لتغذية البويضات وتحفيزها على الإنضاج بسبب إحتوائه على عوامل نمو بيتيدية في الجسم الحي (Knight وآخرون ،1996). كذلك فإن السائل الحويصلي يحتوي على البروتينات والأحماض الأمينية و السكريات والهرمونات مثل (LH, FSH، البرولاكتين ، الإستروجين ، الإندروجين و Progestagen والأملح) (Hafez ، 1987 ، Smitz ، 1999) .

جدول 9: النسبة المئوية للانضاج المختبري لمعاملات التجربة

قيمة مربع كاي (χ^2)	المعاملات				أسابيع التجربة
	T3 15% BFF	T2 10% BFF	T1 5% BFF	control 0% BFF	
2.59 NS	(62.50)	(62.50)	(55.56)	(55.56)	الأول
4.38 *	(80.00)	(70.00)	(75.00)	(77.78)	الثاني
8.41 **	(75.00)	(50.00)	(50.00)	(71.43)	الثالث
8.03 **	(60.00)	(50.00)	(75.00)	(75.00)	الرابع
7.52 **	(63.64)	(72.73)	(54.55)	(54.55)	الخامس
9.02 **	(85.71)	(75.00)	(57.14)	(57.14)	السادس
8.61 **	(40.00)	(50.00)	(50.00)	(25.00)	السابع
5.28 *	(71.43)	(57.14)	(57.14)	(66.67)	الثامن
4.41 *	(68.85)	(63.33)	(58.62)	(61.40)	المجموع
---	11.58 **	8.37 **	7.96 **	10.62 **	قيمة مربع كاي (χ^2)
* (P<0.05) ، ** (P<0.01) ، NS: غير معنوي.					

4-4- المحصلة النهائية لنسب الإنضاج المختبري للبويضات

أظهرت النتائج تفوق المعاملة الثالثة معنويًا بتركيز (15%) من السائل الحويصلي البقري المضاف للوسط الزراعي ($P \leq 0.05$) على المعاملات الأخرى وكانت النسب كالتالي (68.85%) للمعاملة الثالثة و (63.33%) للمعاملة الثانية و (61.40%) لمعاملة السيطرة ، أما المعاملة الأولى فكانت (58.62%) . تدل نتائج هذه الدراسة على تفوق المعاملة الثالثة على المعاملات جميعها في نسبة عدد البويضات الناضجة . جدول 10 .

جدول 10: المجموع الكلي لنسبة الإنضاج المختبري باختلاف التراكيز

قيمة مربع كاي (χ^2)	T3 15% BFF	T2 10% BFF	T1 5% BFF	control 0% BFF	اعداد البويضات
--	61	60	58	57	عدد البويضات الكلي
--	42	38	34	35	عدد البويضات الناضجة
4.41 *	68.85%	63.33%	58.62%	61.40%	النسبة المئوية
--	27	26	24	26	عدد البويضات غير الناضجة
4.41 *	31.15%	36.67%	41.38%	38.60%	النسبة المئوية
* (P≤0.05).					

جدول 11: عدد البويضات الكلي لكل معاملة وللأسابيع المختلفة / للإخصاب

يوضح عدد البويضات الكلي التي ستجري عليها عملية الإخصاب و للتراكيز المختلفة

المعاملات				اسابيع التجربة
15%	10%	5%	0%	
5	5	5	5	الأول
8	7	6	7	الثاني
6	4	4	5	الثالث
3	2	3	3	الرابع
7	8	6	6	الخامس
6	6	4	4	السادس
2	2	2	1	السابع
5	4	4	4	الثامن
42	38	34	35	المجموع

4-5- النسبة المئوية للإخصاب المختبري لمعاملات التجربة

أظهرت نتائج عملية الإخصاب المختبري ، جدول رقم (12) وجود فرق عالي المعنوية ($P \leq 0.01$) في النسبة المئوية لأخصاب البويضات لمعاملة السيطرة (0%) سائل حويصلي بقري وللأسابيع المختلفة إذ كانت أعلى نسبة مئوية بالأسبوع الثامن (50.00%) وأقل نسبة مئوية في الأسبوعين السابع والرابع (00.00%) ، أيضا أظهرت النتائج وجود فرق معنوي عالٍ ($P \leq 0.01$) في النسبة المئوية لإخصاب البويضات للمعاملة الأولى (5%) سائل حويصلي بقري وللأسابيع المختلفة وكانت أعلى نسبة في الأسبوع السادس (50.00%) وأقل نسبة في الأسبوع السابع (00.00%) ، كذلك المعاملة الثانية (10%) سائل حويصلي بقري بينت وجود فرق معنوي عالٍ ($P \leq 0.01$) في النسبة المئوية لإخصاب البويضات وللأسابيع المختلفة وكانت أعلى نسبة في

الأسبوع الرابع (50.00%) وأقل نسبة في الأسبوع السابع (00.00%) ، كذلك المعاملة الثالثة (15%) سائل حويصلي بقري أظهرت فرقا معنويا عاليا ($P \leq 0.01$) في نسبة الإخصاب المختبري للبيوضات للأسابيع المختلفة وكانت أعلى نسبة في الأسبوع الثامن (60.00%) وأقل نسبة في الأسبوع الأول (00.00%) .

أما بالنسبة للاختلافات بين المعاملات ضمن الأسبوع الواحد فقد تبين من خلال نتائج الدراسة وجود فروق معنوية عالية ($P \leq 0.01$) في النسبة المئوية للإخصاب المختبري بين المعاملات ضمن الأسبوع الأول وكانت قيمة مربع كاي (10.25) لمعاملات التجربة ، فيما حصل فرق معنوي ($P \leq 0.05$) بين معاملات التجربة في النسبة المئوية للإخصاب المختبري ضمن الأسبوع الثاني وكانت قيمة مربع كاي للمعاملات المختلفة (4.62) ، وفي الأسبوع الثالث كانت الفروق المعنوية عالية ($P \leq 0.01$) بين المعاملات في النسبة المئوية للإخصاب المختبري حيث كانت قيمة مربع كاي (9.04) لمعاملات التجربة ، كذلك الأسبوع الرابع أظهر فروقا معنوية عالية ($P \leq 0.01$) بين معاملات التجربة في النسبة المئوية للإخصاب المختبري وكانت قيمة مربع كاي (11.37) لمعاملات التجربة ، وفي الأسبوع الخامس كانت الفروق معنوية ($P \leq 0.05$) بين المعاملات في النسبة المئوية للإخصاب المختبري حيث كانت قيمة مربع كاي (4.61) لمعاملات التجربة ، وفي الأسبوع السادس أظهر فروقا معنوية عالية ($P \leq 0.01$) بين معاملات التجربة في النسبة المئوية للإخصاب المختبري وكانت قيمة مربع كاي (10.29) لمعاملات التجربة ، فيما أظهر الأسبوع السابع فروقا معنوية عالية ($P \leq 0.01$) بين المعاملات في النسبة المئوية للإخصاب المختبري حيث كانت قيمة مربع كاي (10.00) لمعاملات التجربة ، أما فيما يخص الأسبوع الثامن كانت الفروق المعنوية عالية ($P \leq 0.01$) بين معاملات التجربة في النسبة المئوية للإخصاب المختبري وكانت قيمة مربع كاي (11.73) لمعاملات التجربة ، أما المحصلة النهائية للبيوضات المخصبة لمجموع الأسابيع وللمعاملات المختلفة أظهرت فرقا معنويا ($P \leq 0.05$) إذ تفوقت المعاملة الثالثة (15%) سائل حويصلي بقري في نسبة الإخصاب وكانت (35.71%) على جميع المعاملات ، أما معاملة السيطرة بتركيز (0%) سائل حويصلي بقري فقد أعطت أقل نسبة إخصاب وكانت النسبة (25.61%) . إنخفضت نسب الإخصاب في الأسابيع الأخيرة وقد يرجع السبب الى إرتفاع درجة الحرارة ، إذ ثبت أن البويضات المأخوذة من جريبات أبقار هولشتاين المذبوحة خلال الصيف لها قدرة منخفضة على التطور إلى أكياس أريمية بعد IVM و IVF (Al-Katanani وآخرون ، 2002) . كذلك أشار (Manjunatha وآخرون ، 2009) إلى أن الكفاءة التنموية للبيوضات تتأثر بالموسم . أما في ما يخص تفوق المعاملة الثالثة (15%) سائل حويصلي بقري معنويا في نسبة الإخصاب فإن السبب يرجع إلى مكونات السائل الحويصلي

حيث أشار (Brevini وآخرون ، 2007) إلى أن السائل الحويصلي يعزز الإنضاج المختبري والإخصاب الخارجي .

جدول 12: النسبة المئوية للبويضات المخصبة لمعاملات التجربة

قيمة مربع كاي (χ^2)	التركيز				الأسبوع
	T3 15% BFF	T2 10% BFF	T1 5% BFF	control 0% BFF	
10.25 **	(0.00)	(40.00)	(20.00)	(20.00)	الأول
4.62 *	(37.50)	(28.57)	(33.33)	(28.57)	الثاني
9.04 **	(50.00)	(25.00)	(25.00)	(20.00)	الثالث
11.37 **	(33.33)	(50.00)	(33.33)	(0.00)	الرابع
4.61 *	(42.86)	(37.50)	(33.33)	(33.33)	الخامس
10.29 **	(16.67)	(33.33)	(50.00)	(25.00)	السادس
10.00 **	(50.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	السابع
11.73 **	(60.00)	(25.00)	(25.00)	(50.00)	الثامن
4.52 *	(35.71)	(31.58)	(29.41)	(25.61)	المجموع
---	12.39 **	9.86 **	10.33 **	10.54 **	قيمة مربع كاي (χ^2)
* (P≤0.05) ، ** (P≤0.01) .					

4-6- المحصلة النهائية لنسب الإخصاب للبويضات

أظهرت النتائج تفوق المعاملة الثالثة معنوياً بتركيز (15%) من السائل الحويصلي البقري المضاف للوسط الزراعي ($P \leq 0.05$) على المعاملات الأخرى وكانت النسب كالتالي (35.71%) للمعاملة الثالثة و (31.58%) للمعاملة الثانية و (29.41%) للمعاملة الأولى ، أما معاملة السيطرة فكانت (25.61%) . تدل نتائج هذه الدراسة على تفوق المعاملة الثالثة على المعاملات جميعها في نسبة عدد البويضات المخصبة . جدول 13 .

جدول 13: المجموع الكلي لنسبة الإخصاب المختبري باختلاف التراكيز

قيمة مربع كاي (χ^2)	T3 15% BFF	T2 10% BFF	T1 5% BFF	control 0% BFF	اعداد البويضات
--	42	38	34	35	عدد البويضات الكلي
--	15	12	10	9	عدد البويضات المخصبة
4.52 *	35.71%	31.58%	29.41%	25.71%	النسبة المئوية
--	27	26	24	26	عدد البويضات غير المخصبة
4.52 *	64.29%	68.42%	70.59%	74.29%	النسبة المئوية
* (P≤0.05).					

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions And Recommendations

الفصل الخامس : الاستنتاجات والتوصيات Conclusions And Recommendations

5-1 - الإستنتاجات

يُستنتج من الدراسة الحالية الآتي :

- 1 - أظهرت نتائج الدراسة عدم وجود فروق معنوية بين أسابيع الدراسة المختلفة في النسبة المئوية للبويضات الحية والميتة.
- 2 - أثرت أوقات جمع المبايض (اسبوع) في كل الشكل المورفولوجي والنسبة المئوية للبويضات ذات الركام الجرثومي ، إذ كانت أفضل النسب في الأسبوع الرابع .
- 3 - أعطت المعاملة الثالثة 15% سائل حويصلي أعلى نسبة سجلت للإنبضاج المختبري ، فيما أعطت المعاملة الأولى 5% سائل حويصلي أقل نسبة .
- 4 - أعطت المعاملة الثالثة 15% سائل حويصلي أعلى نسبة مئوية للإخصاب المختبري .

5-2 - التوصيات

مع ضوء النتائج المتحققة توصي الدراسة بالآتي :

- 1 - إضافة السائل الحويصلي البقري (BFF) بنسبة 15% إلى الأوساط الزرعية المخصصة للإنبضاج المختبري والإخصاب المختبري لبويضات الأبقار .
- 2 - إجراء التعطيل (inactivation) على السائل الحويصلي قبل إضافته إلى الأوساط الزرعية الخاصة بالإنبضاج والإخصاب المختبري .
- 3 - استخدام الأوساط الزرعية نفسها في مواسم السنة المختلفة .
- 4 - استخدام طريقة الشفط aspiration في عملية جمع البويضات من المبايض .

الفصل السادس

المصادر References

References الفصل السادس : المصادر

- Abd-Allah, S. M. (2010).** Effects of storage conditions of dromedary camel ovaries on the morphology, viability and development of natural follicular oocytes. *Anim. Reprod.*, 7(2):65-69.
- Abdullah, R. B., Liow, S. L., Rahman, A. N. M. A., Chan, W. K., Wan-Khadajah, W. E. & Ng, S. C., (2008).** Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality and developmental competence in goats. *Theriogenology* 70, 765- 771.
- Albertini F, Combelles M, Benecchi E, CarabatsosMJ. (2001).** Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*; 121: 647-653
- Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ.(2002).** Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairij Sd*; 85: 390—396.
- Alsaadoon.A.A.Z.;(2014).** Effect of cryopreservation technique on oocyte and early stage embryos in sheep. A Dissertation submitted,college of agriculture – university of Baghdad
- Armstrong, D. T.,Kotaras, P. J. & Earl, C. R., (1997).** Advances in production of embryos in vitro in juvenile and prepubertal oocytes from calf and lamb. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 333-339.
- Avery, T. L., and E. F. Graham. (1962).** Investigations associated with the transplantation of bovine ova. III. Recovery and fertilization. 5. *Repro& Fert.*, 3: 218.
- Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Keefer, C., Lazaris, A. & Karatzas, C. N.,(2002).** Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology* 57, 275-284.

Bilodeau-Goeseels, S. & Panich, P., (2002). Effect of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. Anim. Reprod. Sci. 71, 143-155.

Blondin P, Sirard MA. (2006). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Mol Reprod Dev ; 41:54-62.

Bo GA, Carballo Guerrero D, Adams GP. (2008). Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. Theriogenology, 69:81-7.

Bo GA, Mapletoft RJ. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. Theriogenology, 81:38-48.

Bousquet, D., Twagiramungu, H., Morin, N. et al. (1999). In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. Theriogenology, 51, 59-70.

Braw-Tal R, Yyossefi S. (1997). Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. J Reprod Fertil ; 109:165-171.

Brevini, T.; Cillo, F.; Antonini, S. and Gandolfi, F. (2007). Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. Animal Reproduction Science 98:23-28.

Caixeta, E.S., M.F. Machado, P. Ripamonte, C. Price and J. Buratini, (2013). Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. Reprod. Fertil. Dev., 25: 890-899.

Camargo, L. S. A., Viana, J. H. M., Sa, W. F., Ferreira, A. M., Ramos, A. A. & Vale Filho, V. R., (2006). Factors influencing in vitro embryo production. Anim. Reprod. 3, 19-28.

- Carolan, C., P. Lonergan, P. Monget, D. Monniaux, and P. Mermillod. (1996).** Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 43:477–483.
- Carolan, C., P. Monaghan, M. Gallagher and I. Gordon, (1994).** Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology*, 41: 1061-1068.
- Carvalho, J. O., R. Sartori, G. M. Machado, G. B. Mourao, and M. A. N. Dode. (2010).** Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology* 74:1521–1530.
- Cecconi, S., Mauro, A., Capacchietti, G., Berardinelli, P., Bernabo, N., Di Vincenzo, A. R., Mattioli, M. Barboni, B., (2008).** Meiotic maturation of incompetent prepubertal sheep oocytes is induced by paracrine factor(s) released by gonadotropin-stimulated oocyte-cumulus cell complexes and involves MAPK activation. *Endocrinol.* 149, 100-107.
- Chang, M.C., (1951).** Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168: 697-698.
- Chen, L., Wert, S. E., Hendrix, E. M., Russell, P. T., Canon, M. & Larsen, W. J., (1990).** Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 236-247.
- Choi, Y.H., M. Takagi, H. Kamishita, M.P.B. Wijayagunawardane, T.J. Acosta, K. Miyazawa and K. Sato, (1998).** Effects of follicular fluid on fertilization and embryonic development of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*, 49: 1103-1112.

- Cibelli, J. B., Campbell, K. H., Seidel, G. E., West, M. D. & Lanza, R. P., (2002).** The health profile of cloned animals. *Nat. Biotechnol.* 20, 13-14.
- Clemente, M., J. de la Fuente, T. Fair, A. Al Naib and A. Gutierrez-Adan et al., (2009).** Progesterone and conceptus elongation in cattle: A direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction*, 138: 507-517.
- Cognie, Y., Baril, G., Poulin, N. & Mermillod, P., (2003).** Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59, 171-188.
- Cognie, Y., (1999).** State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51, 109–116.
- Cox, J. F. & Alfaro, V., (2007).** In vitro fertilization and development of OPU developed goat and sheep oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 83-87.
- Crozet, N., Ahmed-Ali, M. & Dubos, M. P., (1995).** Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 103, 293-298.
- Crozet N, Dahirel M, Gall L. (2000).** Meiotic competence of in vitro grown goat oocytes. *J Reprod Fertil* 118: 367-373.
- Cunningham, E. P., (1999).** The application of biotechnologies to enhance animal production in different farming systems. *Livest. Prod. Sci.* 58, 1-24.
- Da Costa, NN, Brito, KN, Santana, PD, Cordeiro, MD, Silva, TV, Santos, AX, Ramos, PD, Santos, SD, King, WA, Miranda, MD, Ohashi, OM. (2015).** Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Theriogenology* 85.2:323-329.

- Damiani , Fissore RA, Cibelli JB, Long CR, Balise JJ, Robl JM and Duby RT (1996)** Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes Molecular Reproduction and Development 45 521—534.
- da Silveira JC, Andrade GM, Del Collado M, Sampaio RV, Sangalli JR, Silva LA, Pinaffi FVL, Jardim IB, Cesar MC, Nogueira MFG, Cesar ASM, Coutinho LL, Pereira RW, Perecin F and Meirelles FV (2017).** Supplementation with small extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. PLOS ONE 12, 1–25.
- De La Torre-Sanchez, J. F., Preis, K. & Seidel, G. E., Jr., (2006).** Metabolic regulation of in vitro produced bovine embryos. I. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen from different bulls. Reprod. Fertil. Dev. 18, 585-596.
- De Loos, F., C. van Vliet, P.V. van Maurik and T.A.M.Kruip.(1989).** Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Res., 24: 197-204.
- De Loos F, Kastrop P, Van Maurik P, Van Beneden TH, Kruip TAM. (1991).** Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. Mol Reprod Dev 28:255–259.
- De Loos Van Maurik F, Van Beneden P, Kruip T. (1992).** Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. Mol Reprod Dev 31: 208-214.
- Demetrio, D. G. B., R. M. Santos, C. G. B. Demetrio, C. A. Rodrigues, and J. L. M. Vasconcelos. (2006).** Factors affecting conception of AI or ET in lactating cows. J. Anim. Sci. 84:207–208.

- DeSmedt, V., N. Crozed, M. Ahmed-Ali, A. Martino and Y. Cogine (1992).** In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology*, 37 : 1049-1060.
- Di Palo R, Neglia G, Campanile G, Presicce GA, Spadetta M, Caracciolo di Brienza V, Gasparrini B, Zicarelli L. (2001).** Seasonal effect on follicle production and oocyte recovery by ovum pick-up in the Mediterranean Italian Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 55, 404.
- Di Pietro C. (2016).** Exosome-mediated communication in the ovarian follicle. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 33, 303–311.
- Dominguez, M. P., Falcinelli, A., Hozbor, F., Sanchez, E., Cesari, A. & Alberio, R.H., (2008).** Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology* 69, 564-573.
- Dorji D, MIYOSHI K, YOSHIDA M. (2012).** Gene Expression profile in preimplantation in vitro embryos derived from Prepubertal heifers and Adult Cattle Kagoshima University Armstrong DT, Holm P, Irvine B, Petersen BA, Stubbings RB, McLean D, Stevens GF and Seamark RF. Laparoscopic aspiration and in vitro maturation of oocytes from calves *Theriogenology* 35 182.
- Elder, K. & Dale, B., (2000).** In vitro fertilization. Cambridge University Press.
- Erikson, B. H. (1966).** Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Animal Sci.*, 25: 800.
- Eyestone, W.H. and N.L. First, (1989).** Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Ferti.*, 85: 715-720.

- Fair T, Hulshof SCJ, Hyttel P, Boland M, Greve T. (1997).** Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. *Anat Embryol* 195:327-336.
- Falloon, M.N., C.G. Rammell and J.J.L. Hoogenboom, (1988).** Amino acids in bovine sera. *N. Z. Vet. J.*, 36: 96-98.
- Fernandez-Gonzalez, R., P. Moreira, A. Bilbao, A. Jimenez and M. Perez-Crespo et al., (2004).** Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101: 5880-5885.
- First, N.L. and J.J. Parrish, (1987).** In-vitro fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fertil.*, 34: 151-165.
- Flocerfida, P.; Aquion Marlon, B.; Ocampo. (2014).** In vitro maturation of bubaline oocytes using bubaline (Swamp Buffalo) follicular fluid. *European Journal of Biotechnology and Bioscience* 2(1):35-38.
- Franciosi, F, Coticchio, G, Lodde, V, Tessaro, I, Modina, SC, Fadini, R, Dal Canto, M, Renzini, MM, Albertini, DF, Luciano, AM. (2014).** Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus enclosed oocytes. *Biology of reproduction* 91:61.
- Galli C., Crotti G., Notari C., Turini P., Duchi R., Lazzari G. (2001).** Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 55, 1341–1357.
- Gandolfi, F., A.M. Luciano, S. Modina, A. Ponzini, P. Pocar, D.T. Armstrong and A. Lauria, (1997).** The in vitro developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. *Theriogenology*, 48: 1153-1160.

- Gandolfi, F., Brevini, T.A.L., Cillo, F. & Antonini, S. (2005).** Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 24, 413-423.
- Gardner, D.K., M. Lane, A. Spitzer and A. Batt, (1994).** Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: Amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.*, 50: 390-400.
- Garcia Guerra A, Tribulo A, Yapura J, Singh J, Mapletoft RJ. (2012).** Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology*, 78:353-60.
- Ghasemzadeh-Nava, H. & Tajik, P. (2000).** In vitro maturation of ovine follicular oocytes in different concentrations of fetal calf serum and estrous sheep serum. *Theriogenology* 53, 453 (Abstr.).
- Gilchrist, R. B. & Thompson, J. G. (2007).** Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 67, 6-15.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. (2008).** Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 14: 159–177.
- Goodhand, K. L., R. G. Watt, M. E. Staines, J. S. M. Hutchinson, and P. J. Broadbent. (1999).** In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology* 51:951–961.

- Gordon I. (2003).** Recovering the bovine oocyte. In: Laboratory Production of Cattle Embryos (Biotechnology in Agriculture no. 27). 2nd Ed. Cambridge UK. CAB International/Cambridge University Press, 79-111.
- Gosden, R.G., Hunter, R.H., Telfer, E., Torrance, C. and Brrown, N. (1988).** physiological factor underlying the formation of ovarian follicular fluid. *Journal of Reproduction and fertility.* (82) 813-825.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y and Ogawa K. (1988).** Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 83, 753–758.
- Graff, K. J., M. Meintjes and V. W. Dyer. (1999).** Transvaginal ultrasoundguided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. *Theriogeno.*, 51:1099-1119.
- Graham, J. K., & Moce, E. (2005).** Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 64, 492-504.
- Greve T., Callesen H. (2001).** Rendez-vous in the oviduct: implications for superovulation and embryo transfer. *Reproduction Nutrition Development*, 41, 451–459.
- Gross N, Kropp J and Khatib H (2017).** MicroRNA signaling in embryo development. *Biology (Basel)* 6, 1–22.
- Gupta, P. S. P., Ravindra, J. P., Girish Kumar, V., Raghu, H. M. & Nandi, S. (2005).** Stimulation of in vitro oocyte maturation with a novel peptide isolated from follicular fluid of the buffalo (*Bubalus bubalis*). *Small Rumin. Res.* 59, 33-40.
- Hafez, B. & Hafez, E. S. E. (2000).** Reproduction in farm animals. Lippincott Williams & Wilkins.

- Hafez, E. S. E. (1987).** Folliculogenesis, egg maturation and ovulation.
In: Reproduction in Farm Animals (Ed. E. S. E.Hafez). 5th edition.
Lea & Febiger, Philadelphia. pp.130-167.
- Hanson, PJ. (2013).** In Vitro Production of Bovine Embryos.
Department of Animal Sciences, University of Florida. Version
10.16.
- Hashimoto, RT, M, Kishi, T, Sudo, N, Minami, M, Yamada. (1999).**
Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine
cumuls-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows.
Theriogenology 51:757-765.
- Hendriksen, P. J., Vos, P. L., Steenweg, W. N., Bevers, M. M. &
Dieleman, S. J. (2000).** Bovine follicular development and its
effect on the in vitro competence of oocytes. Theriogenology 53,
11-20.
- Hendriksen, P. J. M., W. N. M. Steenweg, J. C. Harkema, J. S.
Merton, M. M. Bevers, P. Vos, and S. J. Dieleman. (2004).**
Effect of different stages of the follicular wave on in vitro
developmental competence of bovine oocytes. Theriogenology
61:909–920.
- Hernandez-Ceron J, Chase CC, Jr, Hansen Pj. (2004).** Differences in
heat tolerance between preimplantation embryos from Brahrnan,
Romosinuano, and Angus breeds. ‘Dairy Sci; 87: 53—58.
- Hiroyoshi. (2002).** In vitro production of bovine embryos and their
application for embryo transfer. Theriogenology 59.2:675-685.
- Holt, W.V., M. Hernandez, L. Warrell and N. Satake. (2010).** The
long and the short of sperm selection in vitro and in vivo: Swim-up
techniques select for the longer and faster swimming mammalian
sperm. J. Evol. Biol., 23: 598-608.

- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H. & Greve, T. (1997).** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47, 23-32.
- Hung, WT, Hong, X, Christenson, LK, McGinnis, LK. (2015).** Extracellular Vesicles from Bovine Follicular Fluid Support Cumulus Expansion. *Biology of Reproduction* 93.5:117.
- Izadyar, F., B. Colenbrander and M.M. Bevers. (1997).** Growth hormone enhances fertilizability of in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 47: 191-191.
- Izadyar, F., Zeinstra, E. & Bevers, M. M. (1998).** Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 51, 339-345.
- Izadyar, F., B. Colenbrander and M.M. Bevers. (1996).** In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.*, 45: 372-377.
- Izquierdo D, Mogas , Paiamo MJ and Paramio MT. (1995).** Effect of sperm treatment on the in vitro fertilization and early cleavage of prepubertal goat oocytes *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series* 15 Abstract 203.
- Izquierdo, D., Villamediana, P., Palomo, M. J., Mogas, T. & Paramio, M. T. (1998).** Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 49, 1501-1513.
- Jaakma, U., B.R. Zhang, B. Larsson, K. Niwa and H. Rodriguez-Martinez. (1997).** Effects of sperm treatments on the in vitro development of bovine oocytes in semidefined and defined media. *Theriogenology*, 48: 711-720.

- Jiang, H.S. (1991).** Studies in the culture of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro. Ph.D. Thesis, National University of Ireland, Dublin.
- Kane, M.T. (1987).** Culture media and culture of early embryos. *Theriogenology*, 27: 49-57.
- Kane, M. T. (2003).** A review of in vitro gamete maturation and embryo culture on potential impact on future animal biotechnology. *Anim. Reprod. Sci.* 79, 171- 190.
- Kastrop, P.M.M., M.M. Bevers, O.H.J. Destree and T.A.M. Kruip. (1990).** Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 90: 305-310.
- Katska-Ksiazkiewicz, L., Rynska, B., Gajda, B. & Smorag, Z., (2004).** Effect of donor stimulation, frozen semen and heparin treatment on the efficiency of in vitro embryo production in goats. *Theriogenology* 62, 576-586.
- Katska-Ksiazkiewicz L. Opiela, J. & Rynska, B. (2007).** Effects of oocytes quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastosyst production in goats. *Theriogenology* 68, 736-744.
- Katska-Ksiazkiewicz L, Rynska B, Bochenek M, Opiela J, Jurkiewicz J. (2006).** In vitro production of bovine embryos using flow-cytometrically sexed sperm. *Arch Tierz Dummerstorf* 49: 133-140. (In Germany).
- Katska, L. (1984).** Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 7: 461-464.

- Keefer, C.L., S.L. Stice and M. Maki-Laurila. (1991).** Bovine embryo development in vitro: Effect of in vitro maturation conditions on fertilization and blastocyst development. *Theriogenology*, 35: 223-223.
- Kendrick KW, Bailey U, Garst AS, Piyor AW, Ahmadzadeh A, Akers RM, Eye-stone WE, Pearson RE, Gwazdauskas FC. (1999).** Effects of energy balance of hormones, ova- dan activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. *J Dairy Sci*; 82: 1731—1741.
- Kepkova, K.V., P. Vodicka, T. Toralova, M. Lopatarova and S. Cech . (2011).** Transcriptomic analysis of in vivo and in vitro produced bovine embryos revealed a developmental change in cullin 1 expression during maternal-to-embryonic transition. *Theriogenology*, 75: 1582-1595.
- Keskintepe, L., Darwish, G. M., Kenimer, A. T. & Brackett, B. G. (1994).** Term development of caprine embryos derived from immature oocytes in vitro. *Theriogenology* 42, 527-535.
- Khatir H, Lonergan P, Carolan C and Mermillod. (1996).** Prepubertal bovine oocyte: a negative model for studying oocyte developmental competence *Molecular Reproduction and Development* 45 231—239.
- Kidson, A. (2005).** In vitro development in pig. ISSN 1569-0830.
- Knight P.G., Muttukrishna S. and Groome N.P. (1996).** Development and application of a two-site enzyme immunoassay for the determination of ‘total’ activin-A concentrations in serum and follicular fluid. *J. Endocrinol.* 148, 267-279.
- Krisher, R.L. and B.D. Bavister. (1998).** Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, 49: 103-114.

- Kruip T.A.M. and Dieleman S.J.(1982).** Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod. Nutr. Dev.* 22,465-473
- Lane, M.-E., Therien, I., Moreau, R. & Manjunath, P. (1999).** Heparin and highdensity lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms.*Biol. Reprod.* 60, 169-175.
- Lazzari, G. and Galli, C. (1996).** In vitro embryo production and its application to cattle breeding. *Proc. 12th Scientific Meeting of the AETA, Lyon*, pp. 73-82.
- Leclerc, P., M.A. Sirard, J.G. Chafouleas and R.D. Lambert. (1992).** Decrease in calmodulin concentrations during heparin-induced capacitation in bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 94: 23-32.
- Leibfried L, First NL. (1979).** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 48:76–86.
- Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser, W.H. Eyestone, D.L. Northey and N.L. First. (1987).** Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.*, 36: 376-383.
- Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbies-Tran R. (2005).** Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63: 841-859.
- Li, F., Pi, W. H., Zhu, H. Z., Zhang, S. S., Liu, S. R. & Xue, J. L. (2006).** The effect of estrous ewe serum and heparin on in vitro fertilization and subsequent embryonic development in sheep. *Small Rumin. Res.* 63, 226-232.
- Lim, KS, Chae, SJ, Choo, CW, Ku, YH, Lee, HJ, Hur, CY, Lim, JH, Lee, WD. (2013).** In vitro maturation: Clinical applications. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 40:143-147.

- Lonergan P, Fair T. (2016).** Maturation of oocyte *in vitro*. Annu Rev Anim Biosci. 4:255-268.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. P. & Gordon, L. (1994).** Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. Mol. Reprod. Dev. 37, 48-53.
- Lu, K.H. and Polge, C. (1992).** A summary of two years' results in large scale in vitro bovine embryo production. Proc. 12th Int. Cong, on Animal Reproduction, The Hague, The Netherlands, 3, 1315-1317.
- Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. (1987).** Growth rates of follicles in the ovary of the cow. J Reprod Fertil 81:301-307.
- MACHATY, Z.; PEIPPO, J.; PETER, A. (2012).** Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. Theriogenology, New York, v. 78, n. 5, p. 937-950.
- Mahoete. (2010).** In vitro embryo production and semen cryopreservation in sheep .MSC thesis. Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Department of Animal, Wildlife and Grassland Sciences, University of the Free State Bloemfontein.South Africa.
- Manik, SS, P, Palta. (2003).** Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. Animal reproduction science 76:155-161.
- Manjunatha, B.M., Ravindra, J.P., Gupta, P.S. Devaraj, M., Nandi, S. (2009).** Effect of breeding season on in vivo oocyte recovery and embryo production in non-descriptive Indian river buffaloes (*Bubalus bubalis*). Anim Reprod Sci. 111(2-4), 376-83.

- Mapletoft RJ, Bó GA. (2016).** Bovine embryo transfer. In: International Veterinary Information Service (Ed.). IVIS Reviews in Veterinary Medicine. Ithaca: International Veterinary Information Service. (www.ivis.org; Document No. R0104.1106S).
- Martino A., Mogas T., Palomo M.J. and Paramino M.T. (1995).** In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. 43, 473-485.
- Martin, G.B.; Brown , S.W.W.; Hotzel, M.; Resatall, B.J. and Adams, N.R. (1994).** Non-photoperiodic inputs into seasonal breeding in male ruminants. In: *Perspective in comparative endocrinology*. National Research of Canada, pp. 574-585.
- Merton, J. S., de Roos, A. P. W., Mulaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L. A. M. & Dieleman, S. J. (2003).** Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59, 651-674.
- Morrier, A., Castonguay, F. & Bailey, J. L. (2002).** Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 82, 347-356.
- Morton, K. M. (2008).** Developmental capabilities of embryos produced in vitro from prepubertal lamb oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 43 (Suppl. 2), 137– 143.
- Morton, K. M., Maxwell, W. M. C. & Evans, G., (2008).** Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and in vitro development of ovine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 43, 106-110.

- Nedambale, T. L. (1999).** Evaluation of cryopreservation methods for in vitro produced bovine embryos. MSc. Thesis. University of the Free State, Bloemfontein.
- Noda, Y., H. Matsumoto, Y. Umaoka, K.J. Tatsumi, J. Kishi and T. Mori. (1991).** Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol. Reprod. Dev.*, 28: 356-360.
- O'Brien J. K. Dwarte D, Ryan JP, Maxwell WMC and Evans G. (1996).** Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep *Reproduction Fertility and Development* 8 1029-1037.
- O'Brien, J. K. Hollinshead, F. K. & Maxwell, W. M. C. (2004).** In vivo development capacity of in vitro-produced embryos derived from sex-sorted and recryopreserved frozen-thawed ram sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 286 (Abstr.).
- Oliveira ACS, Mattos MCC, Bastos MR, Trinca LA, Razza EM, Satrapa RA, Sartori R, Barros CM. (2014).** Efficiency of superstimulatory protocol P-36 associated with the administration of eCH and LH in Nelore cows. *Theriogenology*, 82:715-719.
- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tchikawa S, Suzuki T. (1997).** Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology*; 48:769–774.
- Parrish, J.J., A. Krogenaes and J.L. Susko-Parrish. (1995).** Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44: 859-869.
- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish and J.K. Graham. (1999).** In vitro capacitation of bovine spermatozoa: Role of intracellular calcium. *Theriogenology*, 51: 461-472.

- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish and N.L. First. (1985).** Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology*, 24: 537-549.
- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish and N.L. First. (1989).** Capacitation of bovine sperm by heparin: Inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol. Reprod.*, 41: 683-699.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. (1992).** Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* 31: 63-67.
- Pavlok, A., V. Kopečný, A. Lucas-Hahn and H. Niemann.(1993).** Transcriptional activity and nuclear ultrastructure of 8-cell bovine embryos developed by in vitro maturation and fertilization of oocytes from different growth categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, 35: 233-243.
- Pawshe, C. H., Palanisamy, A., Taneja, M., Jain, S. K. & Totey, S. M. (1996).** Comparison of various maturation treatments on in vitro maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers. *Theriogenology* 46, 971-982.
- Perry, G. 2015. 2014** Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsl.* 33:9–18.
- Pieterse, Kappen, Kruip, Taverne. (1988).** Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogeneology* 30.4:751-762.
- Pieterse, M.C., P.L.A.M. Vos, T.A.M. Kruip, Y.A. Wurth, T.H. van Beneden, A.H. Willemse and M.A.M. Taverne. (1991).** Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35: 857-862.

- Pincus, G. (1951).** Observations on the development of cow ova in vivo and in vitro. Proceedings of 1st National Egg Transfer Breeding Conference, (NETBC'51), San Antonio, Texas, pp: 18-18.
- Pivato I. (2001).** Effect of different hormonal treatments and nutrition in donors of oocytes on in vitro bovine embryo production. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas: Brazil.
- Pontbriand, D., A.K. Goff, K.P. Xu and W.A. King. (1989).** Effect of steroids on protein synthesis in mature and immature bovine oocytes. Theriogenology, 31: 240-240.
- Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. (2009).** Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. Theriogenology, 71:690-697.
- Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP and Heyman Y. (1995).** Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows Journal of Reproduction and Fertility 103 115-120.
- Rensis FD, Scarainuzzi RJ. (2003).** Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. Theriogenology; 60: 1139—1151.
- Restall, B.J. and R.G. Wales. (1966).** The fallopian tube of the sheep III. The chemical composition of the fluid from the fallopian tube. Aust. J. Biol. Sci., 19: 687-698.
- Rezk, W. A. K. (2009).** Studies on In vitro fertilization in Camels (*Camelus dromedaries*) Faculty of Agriculture Animal Production Department Mansoura University (PhD thesis).

- Rho, G.J; Hahnel, A.C. and Betteridge, K.J. (2001).** Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparations for their effects on the production of goat embryos in vitro. *Theriogenology*, 56:503-516.
- RIOS, G. L.; BUSCHIAZZO, J.; MUCCI, N. C.; KAISER, G. G.; CESARI, A.; ALBERIO, R. H. (2015).** Combined epidermal growth factor and hyaluronic acid supplementation of in vitro maturation medium and its impact on bovine oocyte proteome and competence. *Theriogenology*, Stoneham, v. 83, n. 5, p. 874-880.
- Robledo-Verduzco JM, Herrera-Camacho J, Cajero-Juárez M, Navarro-Maldonado MC, García-Valladares A. Evaluación de dos medios de maduración. (2009).** in vitro para la producción de embriones ovinos. *Trop Subtrop Agroecosyst*;10:95–9.
- Rodgers RJ and Irving-Rodgers HF. (2010).** Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction* 82, 1021–1029.
- Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lini jM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel W. (1998).** High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Pos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenologi*; 49: 657—665.
- Roth Z. (2008).** Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. *Reprod Domes f Anim*; 43 (Suppl 2): 238—244.
- Rowson, L. E. A., R. M. Moor, and R. A. S. Lawson. (1969).** Fertility following egg transfer in the cow; effect of method, medium and synchronization of oestrus. *J. Repro& Fert.*, 18: 517.

Saeed-Zidane M, Linden L, Salilew-Wondim D, Held E, Neuhoﬀ C, Tholen E, Hoelker M, Schellander K and Tesfaye D. (2017). Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. PLOS ONE 12, 1–24.

Santonocito M, Vento M, Guglielmino MR, Battaglia R, Wahlgren J, Ragusa M, Barbagallo D, Borzi P, Rizzari S, Maugeri M, Scollo P, Tatone C, Valadi H, Purrello M and Di Pietro C. (2014). Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. Fertility and Sterility 102, 1751–1761.

Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC. (2004). Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. J. Dairy Sci. 87:905-920.

Sartori, R., L. U. Gimenes, P. L. J. Monteiro Jr., L. F. Melo, P. S. Baruselli, and M. R. Bastos. (2016). Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. Theriogenology 86:32–40.

SAS. (2012). Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.

Schoevers, E. J., Colenbrander, B. & Roelen, B. A. J. (2007). Developmental stage of the oocyte during antral follicle growth and cumulus investment determines in vitro embryo development of sow oocytes. Theriogenology 67, 1108-1122.

Senger, PL. (2005). Pathways to Pregnancy and Parturition. 2:164-175.

- Shamsuddin M, Niwa K, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. (1996).**
Review: in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes.
Reprod Domest Anim 31:613–622.
- Sherbahn, R. (2016).** Embryo freezing after IVF: Human blastocyst and embryo cryopreservation and vitrification, Advanced Fertility Center of Chicago.
- Shi, L., Yue, W., Zhang, J., Lv, L., Ren, Y. & Yan, P. (2009).** Effect of ovarian cortex cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. Anim. Reprod. Sci.113, 299-304.
- Shirazi, A. & Sadeghi, N. (2007).** The effect of ovine oocyte diameter on nuclear maturation. Small Rumin. Res. 69, 103-107.
- Sirard MA, Blondin P. (1996).** Oocyte maturation and IVF in cattle. Anim Reprod Sci 42:417–426.
- Sirard, M. A., Defroster, S. & Aside, M. (2007).** In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. Theriogenology 68, 71-76.
- Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P. & Robert, C. (2006).** Contribution of oocyte to embryo quality. Theriogenology 65,126-136.
- Soderquist, L., Madrid-Bury, N. & Rodriguez-Martinez, H. (1997).** Assessment of sperm ram membrane integrity following different thawing procedures. Theriogenology 48, 1115-1125.
- Smitz, J. and Cortvrindt, R. (1999).** Oocyte invitro maturation and follicle culture: current clinical achievements and future directions. Human Reproduction. (14) 145-161.
- Stangl, M., Kuhholzer, B., Besenfelder, U. & Brem, G., (1999).** Epeated endoscopic ovum pick-up in sheep. Theriogenology 52, 709-716.

Stem Cell Research Center. (2019). (University of Tehran).

Stewart, B. M., J. Block, P. Morelli, A. E. Navarette, M. Amstalden, L. Bonilla, P. J. Hansen, and T. R. Bilby. (2011). Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *J. Dairy Sci.* 94:3437–3445.

Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. (1994). Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. . *J Reprod Fertil* 101:547-555.

Surjus RS, Prata AB, Borsato M, Mattos FC, Martins da Silveira MC, Mourão GB, Pires AV, Wiltbank MC, Sartori R. (2014). In vivo embryo production in cows superovulated 1 or 2 days after ovum pick-up. *Reprod Fertil Dev*, 26:527-532.

Sutton, M. L., Gilchrist, R. B. & Thompson J. G. (2003). Effects of in-vivo and invitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum. Reprod. Update* 9, 35- 48.

Vanderhyden, BC, Armstrong, DT. (1989). Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biology of reproduction* 40:720-728.

Van Langendonckt, A., Donnay, I., Schuurbiers, N., Auquier, P., Carolan, C., Massip, A. & Dessy, F. (1997). Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviductal fluid medium. *J. Reprod. Fertil.* 109, 87-93.

Viana J. (2018). 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 36:8-25.

- Wang, S., Liu, Y., Holyoak, G. R., Evans, R. C. & Bunch, T. D. (1998).** A protocol for in vitro maturation and fertilization of sheep oocytes. *Small Rumin. Res.* 29, 83-88.
- Wang, Z. G., Xu, Z. R. & Yu S. D. (2007).** Effects of oocyte collection techniques and maturation media on in vitro maturation and subsequent embryo development in Boer goat. *Czech. J. Anim. Sci.* 52, 21-25.
- Wani, N. A. (2002).** In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Rumin. Res.* 44, 89-95.
- Ward, F. A., P. Lonergan, B. P. Enright, and M. P. Boland. (2000).** Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 54:433–446.
- Wise, T. (1987).** Biochemical analysis of bovin follicular fluid: albomin, total protein lysosomol enzymes, ions, steroid and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank atresia classification and ay of oestrans cycle. *J. Anim. Sci.* (46) 1153-1169.
- XIAO, X.; ZI, X. D.; NIU, H. R.; XIONG, X. R.; ZHONG, J. C.; LI, J.; WANG, L.; WANG, Y. (2014).** Effect of addition of FSH, LH and proteasome inhibitor MG132 to in vitro maturation medium on the developmental competence of yak (*Bos grunniens*) oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, London, v. 12, n. 12, p. 1-7.
- Zhang, M., K. H. Lu, and G. E. Seidel. (2003).** Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology* 60:1657–1663.

الملاحق

الأحد	الاثنين	الثلاثاء	الأربعاء	الخميس	الجمعة	السبت
2912/ 21°/8° المدرج التكراري المتوسط 17°/6°	3012/ 23°/10° المدرج التكراري المتوسط 17°/6°	3112/ 21°/10° المدرج التكراري المتوسط 17°/6°	1 20°/7° المدرج التكراري المتوسط 17°/6°	2 18°/7° المدرج التكراري المتوسط 17°/6°	3 20°/8° المدرج التكراري المتوسط 17°/5°	4 19°/8° المدرج التكراري المتوسط 17°/5°
5 18°/8° المدرج التكراري المتوسط 17°/5°	6 21°/8° المدرج التكراري المتوسط 17°/5°	7 21°/6° المدرج التكراري المتوسط 17°/5°	8 19°/9° المدرج التكراري المتوسط 16°/5°	9 20°/7° المدرج التكراري المتوسط 16°/5°	10 18°/9° المدرج التكراري المتوسط 16°/5°	11 18°/8° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°
12 18°/6° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	13 20°/7° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	14 16°/4° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	15 17°/4° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	16 20°/8° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	17 22°/10° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	18 18°/9° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°
19 21°/9° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	20 22°/8° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	21 17°/9° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	22 14°/9° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	23 14°/8° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	24 19°/6° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	25 12°/6° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°
26 16°/6° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	27 17°/4° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	28 18°/6° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	29 21°/9° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	30 19°/7° المدرج التكراري المتوسط 16°/4°	31 23°/7° المدرج التكراري المتوسط 16°/5°	12/ 17°/8° المدرج التكراري المتوسط 16°/5°

ملحق (1) درجات الحرارة في شهر كانون الثاني

الأحد	الاثنين	الثلاثاء	الأربعاء	الخميس	الجمعة	السبت
261/ 16°/6° المندرج التكراري المتوسط 16°/4°	271/ 17°/4° المندرج التكراري المتوسط 16°/4°	281/ 18°/6° المندرج التكراري المتوسط 16°/4°	291/ 21°/9° المندرج التكراري المتوسط 16°/4°	301/ 19°/7° المندرج التكراري المتوسط 16°/4°	311/ 23°/7° المندرج التكراري المتوسط 16°/5°	1 17°/8° المندرج التكراري المتوسط 16°/5°
2 18°/7° المندرج التكراري المتوسط 16°/5°	3 17°/5° المندرج التكراري المتوسط 16°/5°	4 20°/5° المندرج التكراري المتوسط 16°/5°	5 22°/8° المندرج التكراري المتوسط 17°/5°	6 24°/9° المندرج التكراري المتوسط 17°/5°	7 26°/13° المندرج التكراري المتوسط 17°/5°	8 21°/11° المندرج التكراري المتوسط 17°/5°
9 15°/11° المندرج التكراري المتوسط 17°/6°	10 9°/3° المندرج التكراري المتوسط 17°/6°	11 7°/1° المندرج التكراري المتوسط 17°/6°	12 13°/1° المندرج التكراري المتوسط 18°/6°	13 21°/4° المندرج التكراري المتوسط 18°/6°	14 20°/7° المندرج التكراري المتوسط 18°/6°	15 21°/8° المندرج التكراري المتوسط 18°/6°
16 19°/9° المندرج التكراري المتوسط 18°/6°	17 21°/10° المندرج التكراري المتوسط 18°/7°	18 20°/9° المندرج التكراري المتوسط 19°/7°	19 24°/15° المندرج التكراري المتوسط 19°/7°	20 22°/11° المندرج التكراري المتوسط 19°/7°	21 24°/10° المندرج التكراري المتوسط 19°/7°	22 27°/12° المندرج التكراري المتوسط 19°/7°
23 25°/12° المندرج التكراري المتوسط 20°/7°	24 25°/15° المندرج التكراري المتوسط 20°/7°	25 18°/12° المندرج التكراري المتوسط 20°/8°	26 17°/11° المندرج التكراري المتوسط 20°/8°	27 21°/9° المندرج التكراري المتوسط 20°/8°	28 23°/10° المندرج التكراري المتوسط 21°/8°	29 25°/11° المندرج التكراري المتوسط 21°/8°

ملحق (2) درجات الحرارة في شهر شباط

الأحد	الاثنين	الثلاثاء	الأربعاء	الخميس	الجمعة	السبت
1 23°/12° المدرج التكراري المتوسط 21°/8°	2 22°/10° المدرج التكراري المتوسط 21°/8°	3 23°/10° المدرج التكراري المتوسط 21°/8°	4 24°/12° المدرج التكراري المتوسط 22°/9°	5 25°/11° المدرج التكراري المتوسط 22°/9°	6 27°/14° المدرج التكراري المتوسط 22°/9°	7 24°/14° المدرج التكراري المتوسط 22°/9°
8 25°/13° المدرج التكراري المتوسط 22°/9°	9 29°/13° المدرج التكراري المتوسط 23°/9°	10 30°/14° المدرج التكراري المتوسط 23°/9°	11 31°/16° المدرج التكراري المتوسط 23°/9°	12 31°/17° المدرج التكراري المتوسط 23°/10°	13 26°/20° المدرج التكراري المتوسط 24°/10°	14 22°/15° المدرج التكراري المتوسط 24°/10°
15 23°/15° المدرج التكراري المتوسط 24°/10°	16 26°/15° المدرج التكراري المتوسط 24°/10°	17 28°/16° المدرج التكراري المتوسط 24°/10°	18 25°/16° المدرج التكراري المتوسط 25°/11°	19 21°/13° المدرج التكراري المتوسط 25°/11°	20 24°/13° المدرج التكراري المتوسط 25°/11°	21 21°/10° المدرج التكراري المتوسط 25°/11°
22 18°/9° المدرج التكراري المتوسط 25°/11°	23 26°/11° المدرج التكراري المتوسط 25°/11°	24 27°/11° المدرج التكراري المتوسط 26°/11°	25 28°/16° المدرج التكراري المتوسط 26°/12°	26 30°/17° المدرج التكراري المتوسط 26°/12°	27 27°/17° المدرج التكراري المتوسط 26°/12°	28 25°/16° المدرج التكراري المتوسط 26°/12°
29 23°/15° المدرج التكراري المتوسط 27°/12°	30 26°/14° المدرج التكراري المتوسط 27°/13°	31 30°/17° المدرج التكراري المتوسط 27°/13°	14/ 34°/19° المدرج التكراري المتوسط 27°/13°	24/ 27°/18° المدرج التكراري المتوسط 27°/13°	34/ 30°/16° المدرج التكراري المتوسط 27°/13°	44/ 30°/18° المدرج التكراري المتوسط 28°/14°

ملحق (3) درجات الحرارة في شهر آذار

الأحد	الاثنين	الثلاثاء	الأربعاء	الخميس	الجمعة	السبت
293/ 23°/15° المنرج التكراري المتوسط 27°/12°	303/ 26°/14° المنرج التكراري المتوسط 27°/13°	313/ 30°/17° المنرج التكراري المتوسط 27°/13°	1 34°/19° المنرج التكراري المتوسط 27°/13°	2 27°/18° المنرج التكراري المتوسط 27°/13°	3 30°/16° المنرج التكراري المتوسط 27°/13°	4 30°/18° المنرج التكراري المتوسط 28°/14°
5 30°/17° المنرج التكراري المتوسط 28°/14°	6 35°/21° المنرج التكراري المتوسط 28°/14°	7 28°/20° المنرج التكراري المتوسط 28°/14°	8 33°/20° المنرج التكراري المتوسط 28°/14°	9 34°/21° المنرج التكراري المتوسط 29°/15°	10 30°/20° المنرج التكراري المتوسط 29°/15°	11 29°/17° المنرج التكراري المتوسط 29°/15°
12 29°/17° المنرج التكراري المتوسط 29°/15°	13 29°/17° المنرج التكراري المتوسط 29°/15°	14 29°/16° المنرج التكراري المتوسط 29°/16°	15 31°/18° المنرج التكراري المتوسط 30°/16°	16 33°/17° المنرج التكراري المتوسط 30°/16°	17 34°/17° المنرج التكراري المتوسط 30°/16°	18 28°/18° المنرج التكراري المتوسط 30°/17°
19 32°/16° المنرج التكراري المتوسط 31°/17°	20 35°/19° المنرج التكراري المتوسط 31°/17°	21 36°/21° المنرج التكراري المتوسط 31°/17°	22 37°/22° المنرج التكراري المتوسط 31°/17°	23 39°/25° المنرج التكراري المتوسط 31°/18°	24 34°/23° المنرج التكراري المتوسط 32°/18°	25 37°/23° المنرج التكراري المتوسط 32°/18°
26 29°/19° المنرج التكراري المتوسط 32°/18°	27 31°/18° المنرج التكراري المتوسط 32°/19°	28 36°/21° المنرج التكراري المتوسط 32°/19°	29 28°/20° المنرج التكراري المتوسط 33°/19°	30 34°/19° المنرج التكراري المتوسط 33°/19°	15/ 37°/21° المنرج التكراري المتوسط 33°/20°	25/ 35°/23° المنرج التكراري المتوسط 33°/20°

ملحق (4) درجات الحرارة في شهر نيسان

الأحد	الاثنين	الثلاثاء	الأربعاء	الخميس	الجمعة	السبت
264/ 29°/19° المنرج التكراري المتوسط 32°/18°	274/ 31°/18° المنرج التكراري المتوسط 32°/19°	284/ 36°/21° المنرج التكراري المتوسط 32°/19°	294/ 28°/20° المنرج التكراري المتوسط 33°/19°	304/ 34°/19° المنرج التكراري المتوسط 33°/19°	1 37°/21° المنرج التكراري المتوسط 33°/20°	2 35°/23° المنرج التكراري المتوسط 33°/20°
3 36°/19° المنرج التكراري المتوسط 34°/20°	4 40°/22° المنرج التكراري المتوسط 34°/20°	5 42°/27° المنرج التكراري المتوسط 34°/20°	6 31°/22° المنرج التكراري المتوسط 34°/21°	7 33°/20° المنرج التكراري المتوسط 34°/21°	8 36°/23° المنرج التكراري المتوسط 35°/21°	9 41°/25° المنرج التكراري المتوسط 35°/21°
10 33°/22° المنرج التكراري المتوسط 35°/21°	11 36°/20° المنرج التكراري المتوسط 35°/22°	12 35°/22° المنرج التكراري المتوسط 36°/22°	13 38°/22° المنرج التكراري المتوسط 36°/22°	14 40°/23° المنرج التكراري المتوسط 36°/22°	15 41°/25° المنرج التكراري المتوسط 36°/22°	16 42°/25° المنرج التكراري المتوسط 36°/22°
17 44°/26° المنرج التكراري المتوسط 37°/23°	18 42°/29° المنرج التكراري المتوسط 37°/23°	19 44°/24° المنرج التكراري المتوسط 37°/23°	20 42°/28° المنرج التكراري المتوسط 37°/23°	21 45°/26° المنرج التكراري المتوسط 37°/23°	22 46°/27° المنرج التكراري المتوسط 38°/23°	23 37°/27° المنرج التكراري المتوسط 38°/23°
24 43°/24° المنرج التكراري المتوسط 38°/23°	25 32°/22° المنرج التكراري المتوسط 38°/24°	26 36°/23° المنرج التكراري المتوسط 38°/24°	27 40°/21° المنرج التكراري المتوسط 39°/24°	28 45°/25° المنرج التكراري المتوسط 39°/24°	29 41°/30° المنرج التكراري المتوسط 39°/24°	30 37°/26° المنرج التكراري المتوسط 39°/24°
31 38°/28° المنرج التكراري المتوسط 39°/24°	16/ 44°/28° المنرج التكراري المتوسط 40°/24°	26/ 44°/29° المنرج التكراري المتوسط 40°/24°	36/ 43°/28° المنرج التكراري المتوسط 40°/24°	46/ 41°/27° المنرج التكراري المتوسط 40°/25°	56/ 41°/28° المنرج التكراري المتوسط 40°/25°	66/ 43°/30° المنرج التكراري المتوسط 40°/25°

ملحق (5) درجات الحرارة في شهر أيار

الأحد	الاثنين	الثلاثاء	الأربعاء	الخميس	الجمعة	السبت
315/ 38°/28° المنرج التكراري المتوسط 39°/24°	1 44°/28° المنرج التكراري المتوسط 40°/24°	2 44°/29° المنرج التكراري المتوسط 40°/24°	3 43°/28° المنرج التكراري المتوسط 40°/24°	4 41°/27° المنرج التكراري المتوسط 40°/25°	5 41°/28° المنرج التكراري المتوسط 40°/25°	6 43°/30° المنرج التكراري المتوسط 40°/25°
7 43°/30° المنرج التكراري المتوسط 41°/25°	8 45°/29° المنرج التكراري المتوسط 41°/25°	9 46°/29° المنرج التكراري المتوسط 41°/25°	10 47°/30° المنرج التكراري المتوسط 41°/25°	11 45°/30° المنرج التكراري المتوسط 41°/25°	12 41°/28° المنرج التكراري المتوسط 41°/25°	13 40°/26° المنرج التكراري المتوسط 42°/25°
14 41°/27° المنرج التكراري المتوسط 42°/26°	15 46°/30° المنرج التكراري المتوسط 42°/26°	16 46°/32° المنرج التكراري المتوسط 42°/26°	17 43°/29° المنرج التكراري المتوسط 42°/26°	18 44°/29° المنرج التكراري المتوسط 42°/26°	19 41°/29° المنرج التكراري المتوسط 42°/26°	20 41°/27° المنرج التكراري المتوسط 43°/26°
21 39°/27° المنرج التكراري المتوسط 43°/26°	22 42°/27° المنرج التكراري المتوسط 43°/27°	23 44°/27° المنرج التكراري المتوسط 43°/27°	24 43°/29° المنرج التكراري المتوسط 43°/27°	25 42°/28° المنرج التكراري المتوسط 43°/27°	26 45°/26° المنرج التكراري المتوسط 43°/27°	27 46°/28° المنرج التكراري المتوسط 43°/27°
28 46°/28° المنرج التكراري المتوسط 43°/27°	29 45°/29° المنرج التكراري المتوسط 43°/27°	30 44°/29° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	17/ 44°/30° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	27/ 45°/31° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	37/ 46°/29° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	47/ 47°/30° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°

ملحق (6) درجات الحرارة في شهر حزيران

الأحد	الاثنين	الثلاثاء	الأربعاء	الخميس	الجمعة	السبت
286/ 46°/28° المنرج التكراري المتوسط 43°/27°	296/ 45°/29° المنرج التكراري المتوسط 43°/27°	306/ 44°/29° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	1 44°/30° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	2 45°/31° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	3 46°/29° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	4 47°/30° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°
5 48°/34° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	6 49°/31° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	7 48°/32° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	8 49°/28° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	9 46°/34° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	10 45°/34° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°	11 47°/35° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°
12 45°/34° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°	13 47°/32° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°	14 46°/20° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°	15 47°/32° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°	16 47°/34° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°	17 47°/33° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°	18 47°/31° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°
19 46°/33° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°	20 46°/34° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°	21 48°/32° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°	22 48°/32° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°	23 49°/32° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°	24 49°/35° المنرج التكراري المتوسط 44°/29°	25 51°/37° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°
26 48°/38° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	27 50°/35° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	28 49°/35° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	29 48°/36° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	30 50°/38° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	31 48°/35° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°	18/ 47°/25° المنرج التكراري المتوسط 44°/28°

ملحق (7) درجات الحرارة في شهر تموز

Abstract

This study was conducted in the graduate Studies Laboratory due to the Department of Animal production/ College of Agriculture / University of AL-Muthanna. during the period from December 1, 2019 to July 29, 2020. To study the effect time of oocytes collection (weeks) and adding different concentration of bovine follicle fluid to the culture mediums on the percentages of in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes.

The study was included two experiment. The first experiment was designed to study the effect of adding different concentrations of bovine follicle fluid (0,5,10,15%) to the culture medium of in vitro maturation IVM (TCM-199) on the percentage of IVM of bovine oocytes during weeks of bovine oocytes collection.

The result of experiment I shows a significant difference ($P \leq 0.05$) where the third treatment with a concentration of 15% bovine follicular fluid was superior for the different weeks and the maturation rate was 68.8% compared to the maturation ratios for the other treatments 61.40% for the control treatment and 58.62% for the first treatment 5% bovine follicular fluid and 63.33% For the second treatment 10% bovine follicular fluid.

The second experiment was designed to study the effect of adding different of bFF to the culture medium (fert-TALP) , on the percentage of IVF of bovine oocytes during weeks of collection.

The result of second experiment shows the third treatment excelled with a concentration of 15% bovine follicular fluid and for different weeks, and the

fertilization rate was 35.71% compared to the fertilization ratios for the other treatments 25.71% for the control treatment and 29.41% for the first treatment 5% bovine follicular fluid and 31.58% for the second treatment 10% bovine follicular fluid .

The control treatment exceeded the rate of maturation 61.40% over the first treatment 5% bovine follicular fluid, which was 58.62%. However, the first treatment 5% surpassed the fertilization rate of 29.41% over the control treatment, and its rate was 25.71%.

And through the results, it was found that adding bovine follicular fluid at a concentration of 15% was the best concentrations used and gave the best results in the processes of maturation and fertilization.

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

Al-Muthanna University / College of Agriculture

Animal Production Department



Effect of follicular fluid adding to different culture media for maturation and fertilization cows ovas in vitro

A Thesis submitted

to the Board of the College of Agriculture / Al-Muthanna
University as part of the requirements for a master's degree in
agricultural sciences, Livestock Department

By

Hussein Ali Hussein

Supervised by

Prof.Dr.Ali Abdullah Alsaadoon

2021A

1442H