

**ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY
W SZCZECINIE**

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I HODOWLI ZWIERZĄT

mgr Ewa Kwita

PRACA DOKTORSKA

**OCENA FUNKCJONALNYCH I STRUKTURALNYCH ZMIAN PLEMNIKÓW KNURA
PODCZAS PRZECHOWYWANIA NASIENIA W STANIE PŁYNNYM
Z UWZGLĘDNIENIEM POLIMORFIZMU GENÓW *CD9*, *DAZL*, *ESR2* I *PIWIL4*
ORAZ GRUPY GENETYCZNEJ**

Streszczenie

Inseminacja w hodowli świń ma już ponad 50 letnią historię i spośród dostępnych technologii reprodukcyjnych jest metodą w największym stopniu wykorzystywaną w doskonaleniu postępu genetycznego. W przypadku trzody chlewnej nasienie kriokonserwowane ma niewielkie zastosowanie, a przyczyną tego jest duża wrażliwość plemników knura na szok chłodowy, wiązana ze specyficznym składem błony plazmatycznej tych gamet, ulegającej strukturalnemu uszkodzeniu. Stąd też nasienie samców tego gatunku zwierząt przechowywane jest głównie w stanie płynnym, a jego przydatność do wykorzystania ograniczona jest zazwyczaj do kilkunastu dni i zależy od wielu czynników środowiskowych i genetycznych.

Celem pracy było określenie zmian strukturalno-funkcjonalnych plemników przechowywanych w stanie płynnym z uwzględnieniem polimorfizmu genów *CD9*, *DAZL*, *ESR2* i *PIWIL4* oraz rasy/grupy genetycznej knurów. Badania przeprowadzono na 195 knurach ras/grup genetycznych: duroc, duroc × pietrain, pbz, PIC oraz wbp w wieku od 18 do 36 miesięcy. Po pobraniu i rozrzedzeniu nasienia w rozcieńczalnikach Vitasem LD oraz Gedil przechowywano je w tubach w temperaturze 16 °C. Pierwszego dnia badań wykonano preparaty morfologiczne (eozyna – nigrozyna) określając odsetek plemników żywych i z nieuszkodzonym akrosomem, procent plemników z wadami morfologicznymi głównymi i podrzędnymi. W 1., 3., 5. i 7. dniu określano procent plemników o ruchu postępowym na stoliku Bloma, ruchliwość plemników (system CASA), ocenę integralności błony

komórkowej i aktywności mitochondriów plemników na podstawie barwienia fluorescencyjnego (fluorochromy SYBR-14 i PI, JC-1), oraz integralności akrosomów (lektyna PNA). Analizę genetyczną knurów wykonano na wyizolowanym z plemników DNA, identyfikując polimorfizmy wybranych genów metodą PCR–RFLP.

Przeprowadzone badania wykazały, że czas konserwacji miał istotny wpływ na ruchliwość plemników ocenianą metodą tradycyjną na stoliku Bloma i za pomocą systemu CASA, integralność błony komórkowej i akrosomu oraz aktywność mitochondriów plemników. Wraz z upływem czasu konserwacji oceniane wskaźniki charakteryzujące kinetykę i żywotność plemników oraz integralność błony komórkowej ulegały wyraźnemu pogorszeniu. Skłania to do wykonywania zabiegów inseminacyjnych, o ile to możliwe, nasieniem mającym krótszy okres przechowywania. W przypadku różnych wskaźników wykazano istotne różnice między wariantami polimorficznymi genów, z wyjątkiem genu *PIWIL4*. Stwierdzono jednocześnie istotny wpływ rasy/grupy genetycznej na kształtowanie się tych cech, co nie pozwala na jednoznaczną preferencję nasienia knurów z daną formą polimorficzną do konserwacji w stanie płynnym. Najwyższymi wartościami analizowanych wskaźników w czasie przechowywania, z wyjątkiem wysokiej aktywności mitochondriów, ogólnie charakteryzowały się knury linii PIC, a najniższymi knury rasy wbp, u których między pierwszym a ostatnim dniem wystąpiły największe różnice. Wykazane pozytywne zależności między procentowym udziałem plemników o ruchu postępowym ocenianym szacunkowo pod mikroskopem a wskaźnikami charakteryzującymi ruchliwość plemników, integralność ich błony komórkowej i aktywność mitochondriów wskazują na pełną przydatność powszechnie wykorzystywanej metody w praktyce laboratoryjnej do określania jakości nasienia i kwalifikacji ejakulatów do dalszego wykorzystania w inseminacji.

Słowa kluczowe: knur, nasienie, przechowywanie, stan płynny, *CD9*, *DAZL*, *ESR2*, *PIWIL4*, polimorfizm, CASA, testy fluorescencyjne

16.09.2024 K. S. K.