

Mgr Justyna Zawadzka – Jurochnik

- **Dziedzina:** nauki rolnicze
- **Dyscyplina:** zootechnika
- **Data otwarcia przewodu doktorskiego:** 17.09.2013
- **Temat:** Opracowanie metody mrożenia nasienia kaczorów pochodzących od dzikiej kaczki krzyżówki *Anas platyrhynchos*.
- **Promotor:** Prof. dr hab. Artur Kowalczyk
- **Recenzenci:** 1) Prof. dr hab. Marek Bednarczyk
2) Prof. dr hab. Krzysztof Kozłowski

Zawadzka Jurochnik

Streszczenie

Spadek różnorodności biologicznej odnotowany zarówno wśród gatunków dziko żyjących, jak i hodowlanych wymusza poszukiwanie rozwiązań mających na celu ochronę zasobów genetycznych. Wśród najczęściej stosowanych metod przeciwdziałających utracie bioróżnorodności w przypadku zwierząt gospodarczych można wymienić tworzenie specjalnych programów hodowlanych i stad zachowawczych (ochrona *ex situ in vivo*) oraz banków materiału genetycznego *ex situ in vitro*, w postaci zamrożonego materiału biologicznego: fragmentów DNA, krwi, komórek rozrodczych, komórek macierzystych, tkanek i embrionów. Mrożenie nasienia ptaków jest najczęściej stosowaną metodą ochrony bioróżnorodności *ex situ in vitro* tej gromady zwierząt, gdyż specyfika fizjologii rozrodu uniemożliwia zamrożenie komórek rozrodczych samic. Mrożenie ptasich oocytów, podobnie jak zarodków, nie jest możliwe ze względu na obecność i duże rozmiary żółtka.

Celem niniejszej pracy było określenie optymalnych parametrów rozrzedzalnika dla nasienia kaczorów pochodzących od dzikiej kaczki krzyżówki *Anas platyrhynchos* L., pozwalających na zamrożenie nasienia prostą, możliwą do wykonania w warunkach terenowych techniką nie wymagającą wykorzystania specjalistycznej komory kriogenicznej.

W badaniach własnych wykorzystano nasienie kaczorów dwóch najbardziej oddalonych pod względem genetycznym rodów spośród polskich stad zachowawczych: kaczki pomniejszone K2 oraz mieszance KhO-1.

Badania przeprowadzono w trzech etapach. W pierwszym etapie badań analizowano dwa rozrzedzalniki nasienia wykorzystywane w mrożeniu nasienia ptaków wodnych, których skład chemiczny wzbogacono różnymi poziomami wit. E i selenu: EK oraz HIA 1. Oceniano wpływ rozrzedzalników na ruchliwość oraz obraz morfologiczny plemników przechowywanych przez 2 i 5 godzin w stanie płynnym. W drugim etapie badań testowano najlepsze warianty wzbogaconego rozrzedzalnika EK: EK, EK + 8µg wit E/ml, EK + 8µg wit E + 1µg Se/ml, EK + 1µg Se/ml, wykonując w ich obecności próby zamrożenia/rozmrózenia nasienia. W trzecim etapie badań analizowano wpływ kriokonserwacji nasienia na badane cechy plemników kaczorów. W rozrzedzonym oraz kriokonserwowanym nasieniu (Etap II i III) oceniano z zastosowaniem cytometrii przepływowej żywotność plemników oraz peroksydację lipidów błon komórkowych. Wykonano również oceny potencjalnej zdolności zapładniającej plemników poddanych kriokonserwacji stosując *in vitro* test interakcji plemników z błoną oko żółtkową (Etap III).

Uzyskane wyniki jasno wskazują, że spośród badanych rozcieńczalników, EK jest bardziej optymalnym środowiskiem dla przechowywanego nasienia badanych rodów kaczorów pekin. Proces kriokonserwacji nasienia wpływała negatywnie na badane cechy plemników, przy czym

plemniki rodu K2 są mniej podatne na proces zamrażania/rozmrężania. Suplementacja badanych przeciwutleniaczy do rozcieńczonego EK, nie ogranicza peroksydacji lipidów błon komórkowych oraz nie wpływa istotnie na pozostałe badane cechy plemników, dlatego nie ma wskazań do ich stosowania. Dwugodzinne przechowywanie nasienia w rozcieńczonego EK w 4°C przed zamrożeniem pozwala uzyskać w przypadku obu badanych rodzajów kaczek najwyższą potencjalną zdolność zapładniająca plemników.

Podsumowując, opracowana w badaniach własnych metoda kriokonserwacji nasienia kaczek pekin, jest prosta i możliwa do zastosowania w warunkach terenowych (np. miejscu pobrania nasienia) jak i laboratoryjnych, bez konieczności zastosowania specjalistycznej aparatury.

Zawadzka-Juracka

Abstract

The decline in biodiversity noted both among wild-living and farmed species enforces the search for solutions aimed at the protection of genetic resources. The most commonly used methods to counteract the loss of biodiversity in the case of farm animals include the creation of special breeding programs and conservation herds (*ex situ in vivo* protection) and *ex situ in vitro* genetic material banks in the form of frozen biological material: DNA fragments, blood, reproductive cells, stem cells, tissues and embryos. Freezing of the bird semen is the most frequently used method of *ex situ in vitro* biodiversity protection of this group of animals, as the specificity of reproductive physiology makes it impossible to freeze female reproductive cells. Freezing bird oocytes, like embryos, is not possible due to the presence and large size of the yolk.

The aim of this study was to determine the optimal parameters of extender for semen of drakes derived from the wild mallard *Anas platyrhynchos* L., which allow to freeze the semen using a simple, possible to be performed in the field conditions, technique that does not require the use of a specialized cryogenic chamber.

In this research, the semen of drakes of two genetically most distant lines from among the Polish conservation flocks was used: Miniducks K2 and the crossbred KhO-1.

Research was conducted in three stages. In the first stage of the research, two semen extenders used in freezing waterfowl semen were analyzed, which chemical composition was enriched with various levels of vitamin E and selenium: EK and HIA 1. The effect of extenders on the mobility and morphology of spermatozoa stored for 2 and 5 hours in a liquid state was assessed. In the second stage of the research, the most effective variants of the enriched EK diluent were tested: EK + 8 µg vit E / ml, EK + 8 µg vit E + 1 µg Se / ml, EK + 1 µg Se / ml. In their presence trials of freeze / thaw semen were carried out. In the third stage the effect of cryoconservation on tested duck semen characteristics was analyzed. Sperm viability and lipid peroxidation of cell membranes were assessed using flow cytometry in diluted and cryopreserved semen (Stage II and III). The potential fertilizing capacity of the cryopreserved spermatozoa was also assessed using an *in vitro* sperm-egg interaction test (Stage III).

The obtained results clearly indicate that among the tested extenders, EK is a more optimal environment for the stored semen of the studied Pekin duck lines. The sperm cryopreservation process negatively influenced the examined sperm characteristics, showing that the K2 sperm is less susceptible to the freezing / thawing process. Supplementation of the tested antioxidants to the EK diluent does not limit the peroxidation of cell membrane lipids and does not significantly affect the

other tested sperm characteristics, therefore there are no indications for their use. The two-hour storage of semen in EK extender at 4°C before freezing allows to obtain the highest potential sperm fertilizing capacity in both tested duck lines.

To sum up, the Pekin duck semen cryopreservation method developed in the own research is simple and can be used in field conditions (e.g. the place of semen collection) and in the laboratory, without the need to use specialized equipment.

Lewandowski-Juradnik