

**mgr inż. Patrycja Waclawik**

**Dziedzina:** nauki rolnicze

**Dyscyplina:** zootechnika

**Data otwarcia przewodu doktorskiego:** 25.09.2018

**Temat:** Zastosowanie biotechnik rozrodu w reprodukcji wizona amerykańskiego (*Neogale vison*)

**Topic:** The application of assisted reproduction techniques in the American mink (*Neogale vison*)

**Promotor:** dr hab. inż. Wojciech Kruszyński, profesor UPWr

**Drugi promotor:** prof. dr hab. Wojciech Nizański

Wacławik Patrycja

## Streszczenie

Głównym celem badań własnych było przeprowadzenie kompleksowej oceny jakości nasienia wizonów amerykańskich. W ramach badań przeprowadzono szczegółową ocenę nasienia z wykorzystaniem nowoczesnych technik takich jak CASA czy cytometria przepływowa oraz dokonano oceny morfometrycznej jąder pobranych w sezonie rozrodczym, a także poza nim. Sprawdzone również występowanie różnic w jakości nasienia pomiędzy trzema różnymi odmianami barwnymi. Podjęto także próbę kriokonserwacji próbek nasienia celem oceny przeżywalności plemników i możliwości wykorzystania tej metody przechowywania materiału genetycznego od łasicowatych.

W badaniach wykorzystano 70 samców, w wieku od 7 miesiąca do 3 lat, wszystkie zwierzęta osiągnęły dojrzałość płciową i zakończyły rozwój somatyczny. Jądra pozyskano dwukrotnie (w i poza sezonem rozrodczym) po uboju technologicznym zwierząt na fermie. Grupa w sezonie (marcowa) liczyła 40 samców, a grupa poza sezonem (listopadowa) – 30 samców. Nasienie pobrano poprzez pokrojenie najądrzy tuż po dostarczeniu materiału do laboratorium. Pomiar morfometryczny jąder wykonane zostały za pomocą suwmiarki. Ruchliwość i koncentrację plemników oceniono przy użyciu systemu CASA. Morfologia plemników oceniona została na podstawie preparatów mikroskopowych wybarwionych metodą Watson'a i Martin'a, a stosunek ilości plemników żywych do martwych oceniono na podstawie preparatów wykonanych przy użyciu barwnika eozynowo-nigrozynowego. Badania przy użyciu barwienia fluorescencyjnego i cytometrii przepływowej pozwoliły na dokonanie szczegółowej oceny żywotności plemników i częstotliwości występowania u nich różnorodnych uszkodzeń i wad. Do procesu mrożenia-rozmrażania zakwalifikowano 21 próbek o najlepszych parametrach ruchliwości plemników. Celem sprawdzenia przydatności plemników wizonów do kriokonserwacji, wszystkie testy oceniające jakość nasienia wykonano również po rozmrożeniu próbek, a otrzymane wyniki porównano między próbkami uzyskanymi od tego samego samca.

Przeprowadzone badania poszerzyły dostępną wiedzę na temat biologii rozrodu wizonów amerykańskich. Uzyskane wyniki wskazują na istnienie różnic w wielkości jąder w i poza sezonem reprodukcyjnym wizonów, ponadto w najądrzach pobranych w listopadzie nie zaobserwowano obecności żywych plemników co jednoznacznie potwierdza sezonowy charakter ich procesów reprodukcyjnych. Zaobserwowano również statystycznie istotne różnice w jakości nasienia pomiędzy badanymi odmianami barwnymi. Do najważniejszych

*Wojciech Polny*

parametrów dla których obserwowano różnice należały: liczba plemników ruchliwych i o ruchu progresywnym, a także liczba plemników z nieuszkodzonym akrosomem oraz nie wykazujących zmian apoptotycznych. Przeprowadzone badania wskazują na przydatność plemników wizonów do kriokonserwacji, po rozmrożeniu próbek plemniki nadal wykazują ruch progresywny (średnia na poziomie 23%). Zaobserwowano również dużą wrażliwość akrosomu na proces mrożenia i rozmrażania (wzrost liczby plemników wykazujących uszkodzenia akrosomu o około 4% w badaniach wykorzystujących cytometrię przepływową, i o około 11% w ocenie morfologicznej).

Podsumowując, zaprezentowane wyniki stanowią podstawę do opracowania biotechnik rozrodu mogących znaleźć zastosowanie zarówno u wizonów amerykańskich jak również u zagrożonych łasicowatych. Uzyskane wyniki sugerują kontynuację badań pod kątem opracowania lepszego krioprotektora celem poprawy przeżywalności i ruchliwości plemników po rozmrożeniu. Także kwestia zróżnicowania jakości nasienia pomiędzy odmianami barwnymi jest interesującym zagadnieniem, które może mieć wpływ na wyniki reprodukcyjne wizonów.

**Słowa kluczowe:** norka amerykańska, morfometria jąder, CASA, morfologia plemników, kriokonserwacja nasienia

*Devonali Podrypa*



## Abstract

The aim of the study was to perform an extensive evaluation of American mink semen. During the study a series of analyses were performed, using a variety of modern techniques, such as CASA or flow cytometry and comparing morphometrical measurements of mink testes in and out of reproductive season. Differences in semen quality between three different coat colours were also checked. An attempt to cryopreserve mink semen was made, in order to check the viability of sperm cells after freezing and thawing, and to evaluate the possibility of using cryopreservation to preserve genetic material from the *Mustelidae* family.

Seventy males, aged 7 months to 3 years, were used in the study, all animals reached both somatic and sexual maturity. The testes were collected two times (in and out of the reproductive season) after the technological slaughter of the animals. The group in the reproductive season (March) accounted 40 males, and the one out of the reproductive season (November) – 30 males. The semen was collected by epididymal slicing, right after their arrival to the laboratory. The morphometric measurements were taken with a caliper. Sperm concentration and motility was assessed using CASA. Sperm morphology was assessed using microscopical specimens stained using the Watson-Martin method and sperm viability – on eosin-nigrosine-stained slides. The cytometric evaluation allowed for detailed assessment of sperm viability and the occurrence of different abnormalities and defects. Twenty-one samples with the best motility parameters were qualified for testing the cryopreservation process. In order to check whether mink semen qualifies for freezing, all the analyses assessing semen quality were repeated after thawing and the results were compared between the samples obtained from the same male.

Conducted study broadened the available knowledge about the reproduction biology of American mink. The results show a distinct difference in the testes morphometry in and out of the reproductive season, furthermore, no viable spermatozoa were found in the testes from the November group, which clearly classifies them as a seasonal breeder. Statistically significant differences were also observed between the different coat colours. The most important ones would include: the amount of motile spermatozoa and those moving progressively, as well as the quantity of sperm cells with intact acrosome and without apoptosis. Obtained results indicate that American mink semen can be frozen and the sperm cells are still moving progressively after thawing (around 23% of all the motile sperm). Moreover, it was observed that the acrosome is exceptionally susceptible to the freezing process (the number of

*Wacław Poltyła*

sperm with damaged acrosome increased by around 4% in the flow cytometry assessment, and by around 11% in the morphological evaluation).

To sum up, the results presented may be a base for creating assisted reproduction techniques, that would be applicable both in the American mink and in endangered mustelids. Obtained results suggest to continue the research of creating a better cryoprotector in order to better the sperm viability and motility after thawing. Likewise, the differences in semen quality observed between different colour variations is an interesting issue, that might affect the reproduction of American mink.

**Key words:** American mink, testes morphometry, CASA, sperm morphology, semen cryopreservation

Detomir Petryjo