

CRIOCONSERVAREA SPERMEI DE BERBEC

Bradu N., Rotari D., Cibotaru E., Darie Gr., Djenjera I.

Institutul Științifico Practic de Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară

Abstract: *The object of research was semen taken from breeding rams of the Moldovan Tigaie breed for milk, meat, wool, raised at the STE "Maximovca" sheep farm. The microscopic testing of the ejaculates taken was carried out using the CEROS computer program. For the dilution of the semen admitted for processing, the dilution medium G7J (glucose, sodium citrate, egg yolk) was used, in the composition of which, as an additional component, the preparation BioR was introduced, in a concentration of 0.6-0.7%V. After freezing-reanimation, the media proposed for this technique protect the spermatozoa against damage to the acrosome and biological membranes and allow the functional integrity of the spermatozoa to be preserved.*

Keywords: *ram, diluent, sperm, mobility, freezing, reanimation.*

INTRODUCERE

În perioada de trecere la economia de piață, creșterea ovinelor a trecut printr-o perioadă economică complicată, ceea ce a dus la diminuarea eficienței creșterii ovinelor. Totuși, în ultimul deceniu, în sectorul creșterii ovinelor s-a instalat o tendință de stabilizare a ramurii, au parvenit interese în creșterea ovinelor, s-au procurat diverse rase mai productive, care va permite restabilirea efectivului de ovine din rase mai productive. Una din condițiile care vor permite sporirea producțiilor și efectivelor, paralel cu crearea unei baze furajere de foarte buna calitate și cantitate este reproducția intensivă, folosirea la maximum a potențialul biologic al reproducătorilor de mare valoare zootehnică [13, 10, 9, 1, 5].

Elaborarea metodei de crioconservare a materialul seminal nu a fost posibilă fără cunoștințe profunde privind mecanismul deteriorării și stabilizării integrității celulare în procesul crioconservării. Succesul metodei crioconservării-reanimării se datorează proceselor fizico-chimice ale apei și comportamentul ei în procesul scăderii temperaturii, însă procesul propriu-zis de cristalizare și topire a gheții este influențat de caracterul obiectului, compoziția lichidului biologic și viteza de scădere a temperaturii.

În lucrările cercetătorilor [12, 6, 7, 10, 8] se menționează că una din neajunsurile fecundității joase a oilor sunt factorii de rutină prin folosirea unor tehnologii, metode și instrumentar neadecvate pentru însămânțarea artificială care influențează negativ asupra fecundității.

Totodată, s-a demonstrat că, eficiența însămânțărilor artificiale a oilor cu material seminal crioconservat prezintă rezultate sub nivelul cerințelor și necesită cercetări fundamentale care vor permite elaborarea metodelor eficiente privind viabilitatea spermatozoizilor după reanimare și menținerea capacității fecundante a lor. De aceea, argumentarea proceselor de protejare a spermatozoizilor în procesul tehnologic de crioconservare a materialului seminal va permite de a proteja crior deteriorările spermatozoizilor în procesul conservării și depozitării lor.

Cunoașterea factorilor deteriorării spermatozoizilor la diferite etape a protocolului de crioconservare va permite elaborarea tehnologiilor adecvate de crioconservare a materialului seminal prelevat de la berbeci [9, 1, 5].

Cea mai accesibilă metodă de soluționare a problemelor reproducției ovinelor este elaborarea metodelor eficiente de crioconservare a materialului seminal prelevat de la berbeci reproducători cu păstrarea la nivel înalt a capacității fecundante a spermatozoizilor după reanimare, exploatarea berbecilor reproducători pe parcursul întregului an, crearea

băncii de material seminal crioconservat, apt pentru folosirea la însămânțarea artificială a oilor [13, 3, 2, 4, 11].

MATERIAL ȘI METODE

Cercetările au fost efectuate pe sperma prelevată de la berbeci-reproducători în laboratorul “Biotehnologii în Reproducție și Transfer de Embrioni” a Institutului Științifico-Practic de Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară. După testarea microscopică, ejaculatele admise pentru prelucrare au fost supuse diluării cu mediul GȚJ în componența căruia ca component suplimentar a fost introdus preparatul BioR în concentrație de la 0,1 până la 1,0%V. Prin metoda computerizată CEROS s-a determinat mobilitatea totală a spermatozoizilor după diluare, refrigerare și crioconservare-reanimare, Viabilitatea spermatozoizilor după reanimare, integritatea acrosomului în procesul crioconservării spermatozoizilor și mobilitatea spermatozoizilor cu mișcări rectilinie.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pe scară tot mai largă, în ultimii ani se efectuează cercetări privind perfecționarea și elaborarea noilor medii pentru conservarea materialului seminal prelevat de la berbeci-reproducători cu scopul păstrării integrității biologice și a capacității fecundante a spermatozoizilor. A fost studiată capacitatea protectoare a preparatului BioR elaborat la Institutul de Microbiologie și Biotehnologii a Universității Tehnice din Moldova, care are proprietăți de antioxidant și de a stabiliza membranele celulare.

În cercetările noastre preparatul BioR a fost introdus ca component suplimentar în mediul de diluție GȚJ (glucoză, citrat de sodiu, gălbenuș de ou) în concentrație de la 0,1 până la 1,0 %/V.

Mobilitatea spermatozoizilor în procesul de crioconservare a spermei diluate cu GȚJ în componența căreia ca component suplimentar a fost introdus preparatul BioR, este prezentat în tabelul 1.

Tabelul 1. Influența preparatului BioR asupra mobilității spermatozoizilor (n=12),%

Specificare Specification				După diluare:/ After dilution:	Dupa refrigerare:/ After refrigeration	Dupa reanimare: / After defrosting
Martor GȚJ/ Control				88,7±2,8	83,0±3,5	30,5±4,5
Lotul experimental/ The experimental batch	1	Concentrația BioR (%) în mediul de diluție GȚJ / BioR concentration (%) in the GTJ dilution medium	0,1	85,3±5,2	81,3±9,3	47,0±15,0
	2		0,2	88,0±1,7	85,3±5,2	49,0±5,5
	3		0,3	84,0±9,5	84,3±6,8	36,3±9,1
	4		0,4	92,3±1,9	87,7±4,5	41,0±5,0
	5		0,5	83,7±6,4	84,3±7,2	48,0±7,0
	6		0,6	88,7±3,7	84,3±7,2	62,0±2,9**
	7		0,7	91,0±1,7	89,7±1,8	55,0±8,0
	8		0,8	85,0±5,6	85,7±5,9	53,3±4,5*
	9		0,9	90,7±1,8	87,0±4,5	57,0±8,0
	10		1,0	87,3±8,2	83,0±6,0	60,0±2,6*

*P≤0,05; **P≤0,01

Datele tabelului demonstrează că, mobilitatea spermatozoizilor după diluare cu mediile în componența căruia a fost introdus preparatul BioR în concentrație de la 0,1 până la 1,0%, a fost practic de aceeași valoare atât în loturile experimentale cât și în lotul martor de la 83,7±6,4 până la 92,3±1,9% ceea ce denotă că, preparatul BioR nu este toxic pentru spermatozoizi în diapazonul concentrațiilor studiate.

După reanimare în loturile experimentale, precum și în lotul martor au avut loc diminuări drastice a mobilității spermatozoizilor. Cele mai bune rezultate a mobilității au

fost obținute în lotul experimental 6 în care concentrația preparatului BioR introdus ca component suplimentar în mediu de diluție a fost de 0,6%- 62,0±2,9 % (**P≤0,01).

În continuare au fost efectuate cercetări privind influența preparatului BioR introdus ca component suplimentar în componența mediului GȚJ asupra viabilității spermatozoizilor după reanimare la temperatura de +37⁰ C . Datele experimentale sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2. Influența preparatului BioR asupra viabilității spermatozoizilor după reanimare (n=12), %

Specificare / Specification			După reanimare/ After defrosting	Viabilitatea, după:/ Viability					
				1 oră/ hour	2 ore/ hour	3 ore/ hour	4 ore/ hour	5 ore/ hour	
Martor GȚJ/ Control			30,5±4,5	29,0±3,2	25,5±1,3	24,7±2,6	118,0±1,5	15,3±1,9	
Grupe experimentale/ The experimental batch	1	Concentrația BioR (%) în mediu GȚJ / BioR concentration (%) in the GȚJ	0,1	47,0±15,0	38,5±6,8	42,0±4,7	36,0±4,5	20,7±4,8	20,0±4,5
	2		0,2	49,0±5,5	42,8±2,8	40,8±2,3	40,0±3,0	26,0±3,1	19,3±1,8
	3		0,3	36,3±9,1	33,0±3,1	33,3±3,0	33,0±4,5	32,7±4,2	29,0±3,1
	4		0,4	41,0±5,0	39,5±3,9	38,5±3,4	37,0±6,9	33,0±6,0	29,7±4,3
	5		0,5	48,0±7,0	40,5±3,9	39,8±4,1	36,7±0,9*	34,3±2,0*	25,3±2,7
	6		0,6	62,0±2,9**	51,0±2,6*	48,8±2,1*	45,0±2,1*	41,7±2,7*	31,3±3,0*
	7		0,7	55,0±8,0	48,5±2,6*	46,3±3,4*	46,0±6,1	40,7±5,4	28,0±1,5*
	8		0,8	53,3±4,5*	48,3±3,1	46,5±3,0*	45,7±5,2	38,0±4,5	27,0±4,2
	9		0,9	57,0±8,0	50,0±4,9*	48,0±2,9*	41,3±0,7*	28,3±2,7	25,3±2,9
	10		1,0	60,0±2,6*	53,3±1,4*	47,3±2,6*	40,7±1,2*	39,7±7,9	28,7±7,9

*P≤0,5; **P≤0,01 (comparativ cu lotul martor)

Stocarea spermei reanimată la temperatura de +37⁰ C duce la diminuarea mobilității spermatozoizilor. După 5 ore de stocare la temperatura de +37⁰ C, în loturile experimentale 6 și 7, mobilitatea spermatozoizilor a fost mai mare (P ≤ 0,5), comparativ cu lotul martor. Apreciind integritatea acrosomului s-a depistat că, în sperma reanimată un număr mare de spermatozoizi au diferite deteriorări structurale a membranei acrosomului.

Studiul integrității acrosomului în procesul crioconservării spermei este prezentat în figura 1.

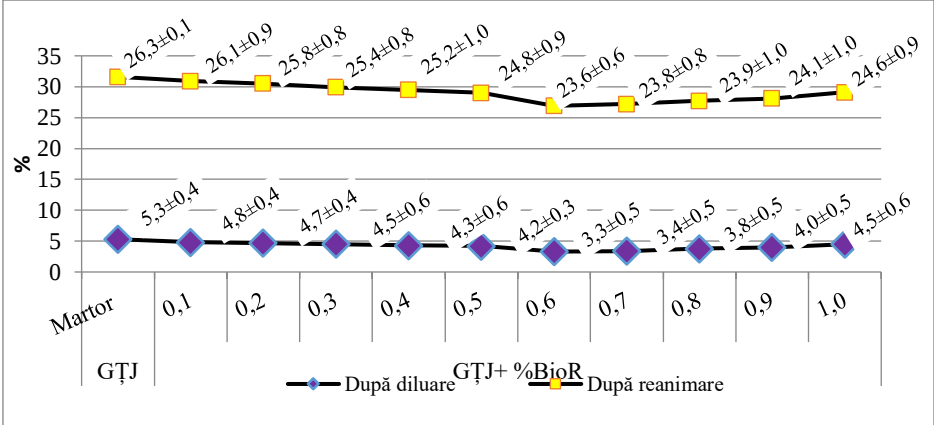


Figura 1. Influența preparatului BioR asupra integrității acrozomului (n=12),%

Datele experimentale, prezentate în figura 1 demonstrează că, cele mai accentuate deteriorări a spermatozoizilor au loc încă în perioada pregătitoare, înainte de procesul

de congelare. În spermă după diluare numai 5% spermatozoizi aveau acrosomul deteriorat. După refrigerare acest indice s-a mărit nesemnificativ, iar după crioconservare și reanimare acest indice s-a mărit până la 24-26%. Este necesar de menționat că cele mai bune rezultate au fost obținute când suplimentar în mediile de diluție a fost introdus preparatul BioR în concentrație de 0,6-0,7%/V ($23,6 \pm 0,6$ și $23,8 \pm 0,8\%$).

S-au efectuat cercetări și privind influenței preparatului BioR asupra calității spermei supuse refrigerării (+2-4°C) și procesului de crioconservare. Datele experimentale privind studiul duratei de refrigerare a spermei diluate cu mediul GȚJ în componența căruia ca component suplimentar s-a introdus preparatul BioR în diferite concentrații și proporții de diluție sunt prezentate în figura 2.

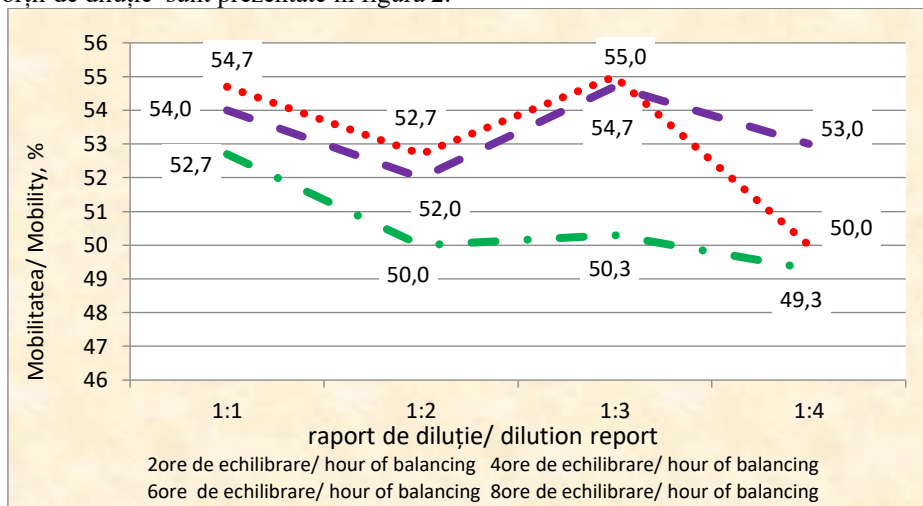


Fig 2. Dinamica mobilității spermatozoizilor după reanimare, %

Rezultatele experimentale obținute demonstrează că, refrigerarea spermei diluate pe o perioadă de 6 ore înaintea procesului de crioconservare a diminuat mobilitatea spermatozoizilor după reanimare, indiferent de proporțiile diluării. Cei mai buni indici a mobilității spermatozoizilor după reanimare au fost obținuți când sperma a fost diluată în proporție de 1:3 și o durată de refrigerare înaintea congelării de 2 și 4 ore. În baza datelor experimentale obținute putem concluziona că, sperma diluată cu mediul GȚJ, în componența căruia ca component suplimentar a fost introdus preparatul BioR în concentrație de 0,6-0,7%, perioada de refrigerare, înainte de congelare, poate fi redusă până la 2 ore, fără a diminua mobilitatea spermatozoizilor, comparativ cu metoda clasică de crioconservare a spermei unde durata de refrigerare este de 6 ore.

Datele experimentale și rezultatele obținute ne-au permis să elaborăm un mediu eficient pentru diluarea și crioconservarea materialului seminal de berbec cu următoarea componență (brevet de invenție Nr.4513):

- Glucoză – 0,8 g
- Citrat de sodiu – 2,8 g
- Gălbenuș de ou de găină – 20%/V
- Glicerină -7%/V
- Antibiotice – 50 mii U.I.
- BioR (5 mg/ml) – 0,6%/V
- Apă distilată – până la 100 ml.

În perioada anilor 2016-2022 folosind mediul elaborat destinat tehnologiei de crioconservare a materialului seminal prelevat de la berbeci-reproducători, s-au congelat și

transmis în banca genetică 2403 doze de material seminal, admis pentru înșămânțarea artificială a oilor.

CONCLUZII

1. Diluarea materialului seminal cu mediul elaborat, în componența căruia ca component suplimentar a fost introdus preparatul BioR în concentrație de 0,6% (brevet de invenție №4513), mobilitatea spermatozoizilor după reanimare s-a menținut la un nivel ridicat- $62,0 \pm 2,9\%$ ($P \leq 0,01$), comparativ cu lotul martor.

2. Mediul de diluție a spermei de berbec, mai bine, comparativ cu mediile propuse pentru aceasta tehnică, protejează spermatozoizii împotriva deteriorării acrosomului și a membranelor biologice, permite păstrarea integrității funcționale a spermatozoizilor.

BIBLIOGRAFIE

1. ASTURIANO, J.G., CABRITA, E., HORVATH, A. Progress challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*. 2017, № 245, pp. 69-76
2. CIBOTARU, E.; DARIE, G.; PÎRLOG, A.; PLEȘCA, D. The role of antioxidants in boar semen preservation. *Scientific Papers-Animal Science Series: Lucrări Științifice - Seria Zootehnie*. Vol. 73(25). Editura „Ion Ionescu de la Brad”, Iași 2020. pp. 9-12. Print –ISSN: 1454-7368, electronic –ISSN: 2067-2330.
3. MICLEA, V., ZĂHAN, M., MICLEA, I., ILIȘIU, E., RUSU, A., VARO-GHIURU, F. Effect of freezing on spermatozoa from Tigaie rams belonging to the mountain ecotype. *Bulletin of USAMB Timișoara, Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 2011, Vol. 44 (1), P 297-299, ISSN1841-9364
4. ROTARI, D. Research of the influence of antioxidants on the rams spermogram. *Scientific Papers. Series D. Animal Science*. Vol. LXIII, Issue 1, Bucuresti 2020, pp. 74-82. ISSN 2285-5750.
5. ROTARI, D., DARIE, G., CHISELITA, O. Preservation of ram semen by refrigeration. In: *Scientific Papers. Series D. Animal Science*. Vol. LXIV, No. 1. București 2021, pp. 87-93; ISSN-L 2285-5750. Disponibil: DOI: 10.17930, ISI Web of Science.
6. АВАНОВ, Н.Я. Достижения в криоконсервировании спермы баранов. *Зоотехния*, 1990. № 2, 23 с.
7. АЙБАЗОВ, А.-М. М., АШУРБЕТОВ, К.К., МАЛАХОВА, Л.С. Биологические методы воспроизводства овец и коз. “Овцы, козы, шерстяное дело”, 2002. № 3, 25 с.
8. ДЕРЯЖЕНЦЕВ, В. И., ЕПИШИНА, Т. М. Новый криопротектор синтетической среды для разбавления и криоконсервации спермы баранов. *Ветеринарная патология*, 2008. № 3. 36-38 с.
9. ЕПИШИНА, Т.М. Повышение репродуктивных качеств свиней и овец. Москва, 2009, 163 с.
10. ЕРОХИН, А.С. Криозащитное влияние на сперму баранов различных полиэтиленгликолей. Овцы, козы, шерстяное дело, 2003. № 1
11. КАЗАКОВА, Ю., БОРОНЧУК, Г., БАЛАН, И., БУЗАН, В., МЕРЕУЦА, И., РОШКА, Н., БУКАРЧУК, М. Действие антиоксидантов в составе синтетических сред для криоконсервации спермы человека. Chișinău, Print Caro, 2020, pp. 399-400, ISBN 978-9925-56-808-0
12. ЛОПЫРИН, А.И. Биология размножения овец. М., Мир. 1971. 186.с
13. МИЛОВАНОВ, В.К. Биология воспроизведения и искусственного осеменения животных, М. 1962. 696 с.
14. ОСТАШКО, Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. Киев: Урожай. 1978, 254 с.

Cercetările științifice au fost efectuate în cadrul proiectului: 20.80009.5107.20 „Managementul potențialului genetic și a producțiilor animalelor de rasă reproduse și exploatate în condițiile pedoclimaterice ale Republicii Moldova” și 20.80009.5107.16: „Preparate microbiene biologice active noi pentru majorarea potențialului reproductiv și productiv al animalelor de interes zootehnic”