

ZDZISŁAW SMORAŁ

Zmiany w ultrastrukturze plemników występujące pod wpływem mrożenia

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt Instytutu Zootechniki, Balice k/Krakowa
Kierownik: doc. dr S. WIERZBOWSKI

Powszechnie stosowanym miernikiem wartości zapładniającej nasienia mrożonego jest jego ruchliwość po rozmrożeniu. Metoda oceny nasienia przy pomocy tego kryterium daje zadowalające rezultaty w przypadku buhajów i ogierów, zawodzi natomiast w odniesieniu do innych gatunków. I tak u tryków, mimo dobrej ruchliwości plemników, dorównującej stwierdzonej u buhaja, procent zapłodnień jest niski, u knurów przy użyciu nasienia o ruchliwości 30—50%, a nawet 70% po rozmrożeniu nie używano zapłodnienia (2, cyt. za 4).

Zaobserwowane zjawisko nasunęło przypuszczenie, że zmniejszona lub całkowita utrata zdolności zapładniającej nasienia mrożonego, jest związana ze zmianami struktury nie powodującymi wprawdzie utraty ruchliwości, wywołującymi jednak utratę zdolności zapładniającej. Spowodowało to zajęcie się ultrastrukturą plemnika mrożonego szczególnie zaś ultrastrukturą główki. Badania te zostały przeprowadzone przy zastosowaniu mikroskopu elektronowego i ulepszonych metod przygotowania preparatów. W oparciu o nie Haeley (4), badając plemniki buhaja, knura, ogiera, tryka i szynszyla przed i po mrożeniu stwierdził, że plemniki badanych gatunków zwierząt mimo identycznych warunków mrożenia i rozmrażania, wykazywały duże zróżnicowanie zmian w ultrastrukturze. Plemniki buhaja przedstawiały normalny wygląd, ich błona cytoplazmatyczna była luźno związana z przednią i środkową częścią akrosomu, ściśle przylegała jednak do części tylnej, wierzchołek akrosomu posiadał widoczne obszary zagęszczone i ostre brzegi. Opisane cechy nieuszkodzonych plemników stwierdzili również Nicander i Bane (11) oraz Kojima (8).

Podobnie prawie żadnych zmian nie wykazywały plemniki ogiera. Natomiast znaczne zmiany wystąpiły w plemnikach knurów i szynszyla. U tryków mrożenie powodowało znaczne uszkodzenie akrosomu w postaci wzdęć i pęcherzyków, substancja akrosomalna stawała się bardziej ziarnista, a jądro zatracalo swój marmurkowy wygląd. W niektórych plemnikach występowała całkowita utrata akrosomu, jego resztki przylegały do oddzielonej błony komórkowej. Substancja podakrosomalna nie wykazywała żadnych zmian. Akrosomy plemników nasienia knurów znajdowały się w zaawansowanym stadium rozpadu.

Największe zmiany zaobserwowano w plemnikach szynszyla: zniszczenie błony komórko-

wej oraz przedniej i środkowej części akrosomu, przy czym nienaruszona pozostała część tylna akrosomu. Autor sądzi, że opisane zmiany w plemnikach mrożonych są także możliwe do zaobserwowania w mikroskopie świetlnym.

Badania Quinna i wsp. (13) nad plemnikami tryków zamrażanymi do temperatury -79°C , potwierdziły występowanie zmian w ultrastrukturze przedniej i środkowej części akrosomu. Zmiany zaobserwowane przez niego podobne były do tych, które opisał Healey (4), przy czym Quinn (13) wymienia jeszcze zmniejszenie gęstości błony akrosomu i widoczną utratę jego zawartości.

Rapatz i wsp. (14) w swych badaniach na mrożonych plemnikach buhajów, nie stwierdzili żadnych zmian w ultrastrukturze główki, co potwierdzałoby badania Healey'a. Natomiast Warnawskij i Turbin (22) stwierdzili badając mrożone plemniki buhaja w mikroskopie elektronowym, że znaczny ich procent posiadał uszkodzone akrosomy. Również Buttle i wsp. (1) zaobserwowali, że znaczna ilość mrożonych plemników buhaja posiadała uszkodzone akrosomy. Rozróżniali oni plemniki uszkodzone od nieuszkodzonych na podstawie zarysu przedniej części główki, przy czym ostry zarys oznaczał, że plemnik był nieuszkodzony, natomiast linia poszarpana wskazywała na uszkodzenie plemnika. Badania te przeprowadzili przy użyciu mikroskopu świetlnego.

Zmiany ultrastruktury plemników po mrożeniu występują nie tylko w główce, lecz w nieznacznym stopniu także w innych częściach plemnika. I tak, Saacke i Marshall (15) mroząc plemniki buhaja do temperatury -20°C , a następnie ogrzewając do temperatury pokojowej i ochładzając ponownie do 0°C stwierdzili, że większość wstawek była pozbawiona błony. Quinn i wsp. (13) stwierdzili w mrożonych plemnikach tryka zmiany w ułożeniu włókna osiowego zewnętrznych fibrylii, a także zaobserwowali, że substancja produkująca osłonę mitochondrialną była jaśniejszego koloru; tylna część witki miała wygląd normalny. Również Rapatz i wsp. (14) stwierdzili w mrożonych plemnikach buhaja zmiany w witce. Polegały one na wystąpieniu wgłębień w substancji otaczającej fibrylle oraz w spirali mitochondrialnej.

Na uwagę zasługuje metoda Koehlera (7), który dla celów obserwacji ultrastruktury plemników w stanie zamrożonym wykorzystał

technikę akwafortową. Polega ona na tym, że z materiału mrożonego poddanego cięciu, a następnie wytrawionego przy pomocy kwasu uzyskuje się odbicie, które obserwowane pod mikroskopem elektronowym nie różni się od obrazu otrzymywanego technikami stosowanymi dotychczas. Metoda posiada jednak tę zaletę, że eliminuje uszkodzenie ultrastruktury mogące powstać podczas sporządzania preparatu (zmiany na skutek utrwalania, dehydratacji i zatapiania). Stwierdził on, że przednia część główki była względnie gładka, w przeciwieństwie do nierównej części tylnej.

Onuma (12) utrwalając w płynie Ortha i barwnikiem Giemzy plemniki buhaja i knura (w nasieniu świeżym, konserwowanym i poddanym szokowi chłodowemu) zaobserwował zmiany polegające na obrzmieniu lub utracie akrosomu. Zmiany te były niewielkie w nasieniu świeżym, ich ilość wzrastała w nasieniu konserwowanym i poddanym szokowi chłodowemu, przy czym wzrost ten był nieznaczny u buhaja, a duży u knura. Marshall i wsp. (10) stosując mikroskopię interferencyjno-kontrastową stwierdzili zmiany morfologiczne występujące w obrębie główki. Saacke i Marschall (15) zabarwiając plemniki barwnikiem Giemzy obserwowali również stadia uszkodzeń akrosomu związane ze zmianą zabarwienia. Stwierdzali następujące zmiany w zabarwieniu: 1) bardziej intensywne zabarwienie akrosomu oraz powstanie pierścienia równikowego, 2) utratę intensywnego zabarwienia przez przednią część akrosomu wraz ze wzrostem widoczności pierścienia równikowego. Uszkodzona błona komórkowa i akrosom prowadzą do wzrostu intensywności zabarwienia substancji akrosomalnej, natomiast już większe uszkodzenia prowadzą do rozproszenia substancji akrosomalnej, a tym samym do utraty zabarwienia.

Metodą którą mogłaby znaleźć zastosowanie w wykrywaniu zmian w ultrastrukturze plemników jest fluorescencja. Stosowano ją do badań nad ruchliwością plemników (21) jak też

Wydaje się, że powodem występowania podobnych zmian w ultrastrukturze plemników może być także szok chłodowy. Występujące wówczas zmiany są zbliżone do zmian powstających na skutek mrożenia, jednak nie zaznaczają się w takim stopniu.

Dott (3) obserwując pod stereoskopowym mikroskopem elektronowym poddane szokowi chłodowemu plemniki tryka, stwierdził występowanie wgłębień wzdłuż tylnej krawędzi pierścienia równikowego i wyniesienie przedniej jego krawędzi nad otaczającą powierzchnię. Obserwowana również przez niego całkowita utrata akrosomu była pogłębieniem tych zmian. W takich wypadkach pierścień równikowy był podniesiony nad otaczającą powierzchnię, a przy tylnej krawędzi widoczne były w dalszym ciągu wgłębienia i rowki. U królika pier-

ścień równikowy był bardziej widoczny w plemnikach nieuszkodzonych.

Poddane szokowi chłodowemu plemniki tryka obserwowali również Quinn i wsp. (13) stwierdzając uszkodzenie przedniej i środkowej części akrosomu. Oni też wykazali, że zmiany w ultrastrukturze plemników tryka spowodowane szokiem chłodowym bądź mrożeniem pociągają za sobą zmiany biochemiczne: ubytek fosfolipidów, protein i polisacharydów (ubytek ten jest większy po mrożeniu niż po szoku chłodowym). Związki te są tracone przez akrosomalną część plemnika.

do badań morfologicznych (cyt. za 21) i akrosomu (9). Metoda ta umożliwia szczegółową obserwację jądra a także akrosomu (cyt. za 21, 9), części plemnika najbardziej podatnej na uszkodzenie w procesie zamrażania. Próby Tischnera (19) wskazuje na możliwość zastosowania tej metody do oceny nasienia mrożonego. Także pomocna w ocenie nasienia mrożonego może być metoda polegająca na wykrywaniu aktywności dehydrogenazy w osłonce witki plemnika — cechy wysoko skorelowanej z ruchliwością plemników (5).

Wobec roli akrosomu w procesie zapłodnienia (6, 10, 16) utrata jego zawartości w tym także enzymów, którym przypisuje się zdolność rozpuszczania osłonek jaja (4, 16, 18), może mieć decydujący wpływ na zdolność zapłodniającą plemników.

Przedstawione prace wskazują na występowanie szeregu zmian dotyczących ultrastruktury zamrażanych bądź poddanych szokowi chłodowemu plemników, oraz na możliwość ich wykrywania. Tak więc szok chłodowy i mrożenie wywierają wpływ na ultrastrukturę plemników tryka, knura, królika i szynszyla, powodując nieznaczne tylko zmiany w ultrastrukturze plemników buhaja i ogiera.

Zachodzące zmiany dotyczą w głównej mierze akrosomu powodując wzdęcia aż do całkowitej jego utraty. Wymienione zmiany w ultrastrukturze pociągają za sobą zmiany biochemiczne.

Badania przy użyciu mikroskopu elektronowego, pozwalają na wykrywanie nawet bardzo nieznacznych zmian; zmiany większe mogą być z powodzeniem wykrywane przy pomocy mikroskopu świetlnego przez zastosowanie odpowiedniego barwienia jak również przy użyciu fluorescencji.

Piśmiennictwo

1. Buttle H. M., Hancock, J. L., Purser A. F.: *Animal Prod.* 7, (1), 59, 1965.
2. Dalrymple J. R., Macpherson J. W.: *Can. J. Animal Sci.* 49, 45, 1969.
3. Dott H. M.: *J. Reprod. Fert.* 18 (1), 133, 1969.
4. Healey P.: *J. Reprod. Fert.* 18 (1), 21, 1969.
5. Hrudka F.: *J. Reprod. Fert.* 10, 15, 1965.
6. Imre Veres: VI. Congr. Reprod. Insem. Artif., 205, 1968.
7. Koehler J. K.: *J. Ultrastructure Res.*, 16, 359, 1966.
8. Kojima Y.: *Jap. J. Vet. Res.* 53, 626, 1968.

9. Marcus W. H., Bishop M., Smiles J.: J. Reprod. Fert. 6, 297, 1963.
10. Marshall C. E., Saacke R. G., White J. M.: J. Dairy Sci. 51, 950, 1968.
11. Nicader L., Bane A.: L. Zellforsch. mikrosk. Anat. 72, 496, 1966.
12. Onuma H.: Biuletyn of the National Institute of Animal Industry 3, 105, 1963.
13. Quinn P. J., White J. G., Clelland K. W.: J. Reprod. Fert. 18, 209, 1969.
14. Rapatz G. L., Menz K. J., Luyet B. J.: Anatomy of the freezing process in biological materials, w: Cryobiology, 139, Academic Press, London and New York 1966.
15. Saacke R. G., Marshall D. E.: J. Reprod. Fert. 16, 511, 1968.
16. Srivastava P. A., Adams C. E., Hartree E. F.: J. Reprod. Fert. 10, 61, 1965.
17. Staehlin A. L.: Ultrastructure Res. 22 (3, 4), 326, 1968.
18. Stambaugh R., Jean Buckley: J. Reprod. Fert. 19, 423, 1969.
19. Tischner M.: Informacja ustna.
20. Vaidya R. A., Bedford J. M., Glass R. H., Morris J.: J. Reprod. Fert. 19, 483, 1969.
21. Van Demark N. L., Estergreen J. R., Schoor R., Kuhlman D. E.: J. Dairy Sci. 8, 1314, 1959.
22. Warnawski A., Turbin: Ziwnotnowodstwo, 10, 71, 1968.

Adres autora: Zdzisław Smorąg, Balice/Kraków, Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt.

HODOWLA I ZOOHIGIENA

LEON SABA, ANTONI POLONIS, BOGDAN RZĄCZYŃSKI

Zoohigieniczna ocena mikroklimatu obory wolnowybiegowej

Katedra Zoohigieny Wydziału Zootechnicznego WSR
w Lublinie

Kierownik: prof. dr **A. CHODKOWSKI**

Zagadnienie chowu bydła w oborach wolnowybiegowych, stanowiło przedmiot rozważań wielu autorów (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 16) mimo to pozostaje nadal sprawą interesującą.

Pierwsze prace dotyczące tego problemu prowadzili w Polsce Pająk i Jasiorowski (13) wykazując wyższość metody wychowu młodzi w warunkach surowych nad metodą tradycyjną. Masłowska (11) porównując trzy typy obór wykazała, że klimat obory otwartej z punktu widzenia zoohigieny jest bardziej korzystny od klimatu obór zamkniętych. Wyniki te znajdują potwierdzenie w doświadczeniach amerykańskich (Ohlem cyt. za 12) prowadzonych w ciągu 10 lat, na podstawie których stwierdzono, że ilość zachorowań w oborach otwartych była mniejsza o 59% w porównaniu do obór tradycyjnych.

Badania Stahla (14) wykazały, że niska temperatura otoczenia nie wywiera ujemnego wpływu na produkcję mleczną u krów średnio wydajnych, natomiast ulega znacznemu obniżeniu ilość mleka u krów wysokomlecznych. Hauptman (6) stwierdził, że w pierwszym roku trzmania krów w oborze wolnowybiegowej, mleczność obniżyła się o 8,32%. Wyniki te potwierdził Szep (15) stwierdzając znaczne obniżenie produktywności bydła przebywającego w oborze wolnowybiegowej.

Rozbieżność wniosków powyższych prac skłoniła nas do podjęcia badań nad mikroklimatem obory wolnowybiegowej z uwzględnieniem wydajności mlecznej krów.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w oborze wolnowybiegowej, typu wgłębionego o wymiarach wewnętrznych w planie 50,38 × 29,11 × 3,42 m. Budynek jest usytuowany dłuższą osią w kierunku SE-NW. Ściany zbudowane z cegły kratówki o grubości 25 cm na zaprawie cementowo-wapiennej, ocieplone 5 cm grubości

plytami wiórowo-cementowymi. Konstrukcja nośna dachu wykonana w postaci więzara stalowo-drewnianego. Strop ocieplony podwójnymi płytami trzcinyowymi grubości 5 cm. Dach kryty papą na lepiku.

Przez środek budynku przebiega korytarz paszowy o szerokości 2,35 m wykonany z gruzobetonu pokryty gładzią cementową na którego końcach znajdują się drzwi drewniane o wymiarach 3,45 × 2,70 m. W stropie nad dachem znajduje się 6 kanałów wyciągowych, ocieplonych, o wymiarach 40 × 40 cm. Budynek podzielony jest na 4 kwatery, przeznaczone dla 30 sztuk bydła, z kwater prowadzą drzwi o wymiarach 2,70 × 2,35 m na utwardzone wybiegi. Kwatery nie posiadają urządzeń odprowadzających gnojówkę. Nawóz usuwany jest 2 razy do roku. W budynku znajduje się 48 okien o wymiarach 76 × 106 cm. W trakcie prowadzenia badań w oborze przebywało 60 sztuk bydła.

Pomiary wykonywano w okresie jesienno-zimowym, w cyklach dobowych z częstotliwością co 2 godziny.

Temperaturę i wilgotność powietrza mierzono psychroaspiratorem Assmanna, ochładzanie i ruch powietrza katatermometrem Hilla. Stężenie CO₂ określano przez absorpcję tego gazu z określonej objętości powietrza na stałym NaOH. Amoniak określano sposobem kolorymetrycznym wykorzystując zdolność wiązania NH₃ przez roztwór kwasu siarkowego i reakcję jego z odczynnikiem Nesslera.

W celu stwierdzenia wpływu warunków środowiskowych na produkcję porównano wydajność 24 sztuk bydła w jednakowym wieku rasy ncb przebywających w 1967 r. w oborze zamkniętej o systemie chowu związanego z wydajnością tych samych sztuk bydła po przeniesieniu ich do badanej obory wolnowybiegowej.

Wyniki

Z przeprowadzonych pomiarów czynników fizycznych mikroklimatu wyliczono wartości średnie dla parzystych godzin doby, w których wykonywano badania.

Średnie posłużyły do wykonania wykresów uwidaczniających zmiany poszczególnych cech mikroklimatu w zależności od badanej cechy w makroklimacie.