



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

SZKOŁA DOKTORSKA
WYDZIAŁ MEDYCyny WETERYNARYJNEJ
KATEDRA ROZRODU Z KLINIKĄ ZWIERZĄT GOSPODARSKICH

lek. wet. Maria Eberhardt

BADANIA NAD WŁAŚCIWOŚCIAMI *IN VITRO* ORAZ ZDOLNOŚCIĄ
ZAPŁADNIAJĄCĄ PLEMNIKÓW ŻUBRA (*BISON BONASUS*)
W ASPEKCIE DOSKONALENIA METOD KRIOKONSERWACJI
GAMET MĘSKICH TEGO GATUNKU

Promotorzy

Prof. dr hab. Wojciech Nizański

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Prof. dr hab. Wanda Olech-Piasecka

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wrocław 2023

10. STRESZCZENIE

Badania nad właściwościami *in vitro* oraz zdolnością zapładniającą plemników żubra (*Bison bonasus*) w aspekcie doskonalenia metod kriokonserwacji gamet męskich tego gatunku

Żubr (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758) to najstarszy żyjący przedstawiciel rodziny krętorogich oraz największy lądowy ssak Europy, zamieszkujący niegdyś niemal każdą europejską puszcze. Wieki intensywnych polowań, kłusownictwo, rozwój cywilizacyjny oraz konflikty zbrojne sprawiły, że w 1919 roku jego populacja wymarła w naturalnym środowisku. Na całym świecie w ogrodach zoologicznych i zagrodach pokazowych przetrwały zaledwie 54 żubry. Gatunek ten, poprzez osiągnięcie liczebności bliskiej wyginięciu, uległ efektowi genetycznego wąskiego gardła (z ang. genetic bottleneck), czyli zmniejszenia populacyjnej różnorodności genetycznej. Niewielka liczebność populacji żubra, w powiązaniu z wysokim stopniem homogenetyczności, stanowi jedno z istotnych zagrożeń dla przyszłości całej populacji. Stąd, nie liczebność osobników, a zachowanie dobrostanu oraz różnorodności genetycznej stanowi obecnie wyzwanie w programie ochrony tego gatunku. Doskonałym uzupełnieniem programów hodowlanych jest wprowadzenie technik wspomaganego rozrodu (Assisted Reproductive Techniques, ART), u podstaw których znajdują się pozyskiwanie i kriokonserwacja gamet.

Wiele aspektów dotyczących charakterystyki gamet żubra, ich oceny oraz możliwości kriokonserwacji nie zostało poznanych. Co więcej, dotychczas uzyskane wyniki zapłodnienia *in vitro* oraz transferu zarodków są niesatysfakcjonujące. Potrzeba uzupełnienia wiedzy o charakterystykę plemników najądrzowych żubra pod kątem wykorzystania ich w ART stała się przyczyną realizacji niniejszej pracy doktorskiej. Nadrzędnym celem przedstawionych badań było ustalenie efektywnego protokołu postępowania z plemnikami najądrzowymi żubra w ramach doskonalenia procedur stosowanych w banku plemników tego gatunku.

Cel pracy zrealizowano w oparciu o cztery zadania badawcze. W toku badań szczegółowo scharakteryzowano plemniki najądrzowe żubra (zadanie I) oraz oceniono efekty ich kriokonserwacji w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu (zadanie II). Oceniono również wpływ selekcji plemników za pomocą wirowania w gradiencie gęstości Percoll® na ich porozmrożeniową jakość (zadanie III)

oraz sprawdzono możliwość wykorzystania testu wiązania z osłonką przejrzystą oocytu bydłęcego (ZBA) do oceny jakości pozyskanych plemników najądrzowych żubra (zadanie IV).

Przedstawiono morfologię, morfometrię, a także cechy morfo-funkcjonalne plemników pozyskanych z najądrzy żubrów. Otrzymane wyniki kriokonsrwacji gamet w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris z dodatkiem żółtka jaja kurzego i glicerolu przemawiają za możliwością wykorzystania pozyskanych i mrożonych w ten sposób plemników do tworzenia rezerwy genetycznej dla tego gatunku. Udowodniono również, że wirowanie w gradiencie gęstości Percoll[®], przed procesem kriokonserwacji, poprawia porozmrożeniową jakość plemników. Wykazano także, że test wiązania z heterologiczną osłonką przejrzystą oocytu bydłęcego jest odpowiedni do oceny plemników najądrzowych żubra i powinien być włączony do protokołu rutynowej oceny kriokonserwowanych gamet tego gatunku.

11. SUMMARY

Research on the *in vitro* properties and fertilizing capacity of wisent (*Bison bonasus*) spermatozoa in terms of improving methods of cryopreservation of male gametes of this species

The wisent (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758) is the oldest living representative of the Bovidae family and the largest land mammal in Europe, once inhabiting almost every European forest. Centuries of intense hunting, poaching, civilization development, and armed conflicts caused its population to become extinct in its natural environment in 1919. Only 54 wisents survived in zoos and enclosures around the world. This species, by reaching a population close to extinction, has suffered from the genetic bottleneck effect, i.e. a reduction in population genetic diversity. The small size of the wisent population, combined with the high degree of homogeneity, constitutes one of the significant threats to the future of the entire population. Hence, it is not the number of individuals, but maintaining the well-being and genetic diversity that is currently the challenge in the conservation program of this species. A perfect complement to breeding programs is the introduction of Assisted Reproductive Techniques (ART), based on the acquisition and cryopreservation of gametes.

Many aspects regarding the characteristics of wisent gametes, their evaluation, and the possibility of cryopreservation have not been known. Moreover, the results of *in vitro* fertilization and embryo transfer obtained so far are unsatisfactory. The need to supplement knowledge with the characteristics of wisent epididymal sperm in terms of their use in ART was the reason for the implementation of this doctoral thesis. The primary goal of the presented research was to establish an effective protocol for dealing with wisent epididymal sperm as part of improving the procedures used in the sperm bank of this species.

The aim of this study was achieved based on four research tasks. During the research, wisent epididymal sperm were characterized in detail (task 1) and the effects of their cryopreservation in an extender based on Tris buffer, egg yolk, and glycerol were assessed (task 2). The impact of sperm selection using Percoll® density gradient centrifugation on their post-thaw quality (task 3) was also assessed, and the possibility of using the bovine oocyte zona pellucida (ZBA) binding test to assess the quality of the obtained wisent epididymal sperm was evaluated (task 4).

The morphology, morphometry, and morpho-functional features of sperm obtained from the epididymis of wisents were presented. The obtained results of cryopreservation of gametes in an extender based on Tris buffer with the addition of egg yolk and glycerol support the possibility of using sperm obtained and frozen in this way to create a genetic reserve for this species. It has also been proven that Percoll® density gradient centrifugation, before the cryopreservation process, improves the post-thaw quality of sperm. The bovine oocyte heterologous zona pellucida binding test has also been shown to be appropriate for the evaluation of wisent epididymal spermatozoa and should be included in the protocol for routine evaluation of cryopreserved gametes of this species.