

REZUMAT

Cuvinte cheie: taur, fertilitate, rata non-return, CASA.

Teza de doctorat intitulată **„Corelații între valoarea biologică a spermei și fertilitate, la taurii din rasele pentru carne”** cuprinde 176 pagini și conform normativelor aflate în vigoare la ora actuală, este constituită din două părți principale. Pentru realizarea acesteia s-a utilizat ca sursă de informare și documentare un număr de 181 titluri bibliografice din literatura de specialitate din țară și din străinătate referitoare la subiectul tezei, informații ce au fost folosite ulterior pentru interpretarea datelor obținute în partea a doua.

Prima parte intitulată **„Studiul actual al cunoașterii”** se extinde pe un număr de 72 pagini, fiind structurată în 3 capitole ce prezintă date din literatura de specialitate referitoare la morfologia și fiziologia aparatului reproducător la taur, managementul taurilor în vederea recoltării materialului seminal, metode de recoltare a materialului seminal, evaluarea valorii biologice a materialului seminal, diluarea și conservarea materialului seminal și însămânțarea artificială.

Partea a doua intitulată **„Contribuții personale”** se desfășoară pe un număr de 100 pagini și este structurată în 7 capitole, în care se prezintă scopul și importanța cercetărilor, materialele și metodele de lucru, rezultatele obținute în urma analizelor efectuate și discuțiile aferente și se încheie cu concluziile generale.

În primul capitol din partea a doua intitulat **„Scopul și obiectivele tezei”** sunt prezentate obiectivele cercetării și anume:

- stabilirea importanței utilizării tehnicilor de analiză asistată de computer pentru obținerea a cât mai multe informații obiective despre valoarea biologică a materialului seminal proaspăt sau congelat/decongelat;
- evaluarea fertilității taurilor din rasele de carne pe baza datelor colectate din teren despre performanțele reproductive ale vacilor;
- evaluarea fertilității taurilor în funcție de unii parametri ai materialului seminal și rata non-return a vacilor;
- determinarea corelațiilor existente între diferiți parametri ai materialului seminal (mobilitate, volum, concentrație, etc.) și rata non-return a vacilor.

În capitolul V - „**Metode de prelucrare a spermei în două unități de producere a materialului seminal congelat de taur** ” este prezentată metodologia de apreciere a valorii biologice a materialului seminal de taur din două unități de producere de material seminal, din România și influența metodologiei asupra calității materialului seminal.

În capitolul VI intitulat „**Analiza fertilității taurilor din rasele de carne din unitatea B, exprimată prin rata non-return a vacilor**”, sunt realizate corelații între fertilitatea materialului seminal provenit de la 10 tauri din diferite rase de carne pe o perioadă de 4 ani (2008 – 2011) și valoarea ratei non-return a femelelor, în funcție de: an, lună, vârsta vacilor la însămânțare și rasa taurilor. În urma analizei ratei non-return pe fiecare an luat în studiu, a reieșit că în anul 2011 s-a înregistrat cea mai mică valoare a ratei non-return ($62,32 \pm 9,72\%$) iar cea mai mare valoare ($67,22 \pm 7,77\%$) s-a înregistrat în anul 2009. Media ratei non-return pe perioada luată în studiu a fost de $64,84 \pm 5,83\%$.

Vârsta vacilor la însămânțare a fost raportată în mod constant ca având un efect important asupra ratei non-return (Vinson, 1982; Murray și col., 1983; Taylor și col., 1985; Jansen și Lagerweij, 1987; Nadarajah și col., 1988; Reurink și col., 1990). Valorile ratei non-return la vițele (71,15%) au înregistrat valori net superioare valorilor ratei non-return a vacilor (62,88%), care au fătat cel puțin o dată. Această diferență a valorilor fertilității între vaci la mai mult de o fătare și vițele, există datorită afectării integrității morfo-funcționale a aparatului genital în cazul vacilor ce au suportat deja o gestație și o lactație.

În ceea ce privește valoarea ratei non-return în funcție de luna în care s-au realizat însămânțările artificiale, s-a obținut o valoare mai ridicată a acesteia în lunile aprilie-mai-iunie, perioadă ce coincide cu scoaterea animalelor la pășune, moment în care se trece la alimentația pe bază de iarbă plus un tain de concentrate. Berry și col. (2011), în urma unui studiu realizat în Irlanda privind evoluția ratei non-return pe fiecare lună a anului, au observat de asemenea o creștere a fertilității în lunile aprilie și mai. Aceste variații ale ratei non-return în fiecare lună pot fi cauzate de o multitudine de factori, incluzând: condițiile meteorologice predominante din fiecare lună, lipsa de experiență a tehnicienilor care au realizat în aceea perioadă însămânțările artificiale, detectarea inexactă a estrului precum și numărul mai mic sau mai mare din fiecare lună de femele însămânțate.

Pe perioada luată în studiu, cea mai mare rata non-return a fost înregistrată la taurii din rasa Aberdeen Angus ($66,64 \pm 4,4\%$), pe următoarele poziții situându-se taurii din rasele Limousin ($64,95 \pm 2,44\%$), Blue Blanc Belgian ($64,09 \pm 1,92\%$) și Charolaise ($63,81 \pm 1,68\%$). Fertilitate scăzută pentru taurii de rasele Limousin și Charolaise a fost raportată și de Berry și col., într-un studiu publicat în anul 2011 (Berry și col., 2011).

În următoarele capitole a fost analizat materialul seminal provenit de la tauri din rasa Flechvieh (Dual Purpose Simmental), dintr-o unitate de producere a materialului seminal, din Bavaria, Germania. Taurii au fost hrăniți și au avut condiții de întreținere identice, fiind tauri de mare valoare și sunt utilizați ca donatori de material seminal de calitate.

Capitolul VII intitulat **„Rezistența în timp a spermei proaspete diluată cu Caprogen 5% și păstrată la diferite temperaturi de stocare”** a urmărit analiza parametrilor materialului seminal stocat pe o perioadă de până la 9 zile, la 3 temperaturi diferite: 4⁰C, 12⁰C și 22⁰C, cu scopul de a se observa modificările ce pot apărea în urma depozitării la cele trei temperaturi luate în studiu. În experimentul de față s-a constatat că valorile parametrilor analizați au fost superioare pentru lotul de material seminal depozitat la 4⁰C comparativ cu celelalte două categorii de temperatură. Rezultate care nu sunt în concordanță cu rezultatele obținute de Shannon și Curson în 1984, care au demonstrat că supraviețuirea spermatozoizilor (din sperma diluată cu Caprogen) la 37⁰C *in vitro* a fost semnificativ mai mare după stocarea la 16⁰C - 20⁰C, decât după stocarea la 5⁰C și de asemenea, a fost semnificativ mai mare după stocarea la 15,6⁰C - 21,1⁰C decât după stocarea la 26,7⁰C - 32,2⁰C. Parametrii de traiectorie (DSL, DCL și DAP) precum și parametrii de viteză (VAP, VCL și VSL) ai spermatozoizilor au înregistrat valori mari pentru temperatura de stocare de 4⁰C pe perioada celor 9 zile de studiu, valorile lor scăzând progresiv în cazul celorlalte două temperaturi de stocare, 12⁰C și respectiv 22⁰C. Atât parametrii care descriu mișcările de rectinitate ai spermatozoizilor (STR, LIN și WOB) cât și cei care descriu tipurile de mișcare ale spermatozoizilor (ALH și BCF) au avut valori mai mari pentru temperatura de stocare de 4⁰C. Unitatea în care s-au realizat cercetările, recomandă inseminarea cu materialul seminal diluat cu Caprogen 5% și depozitat la 4⁰C doar pe o perioadă de până la 4 zile, cu toate că din studiul de față, reiese că mobilitatea spermatozoizilor se menține în limite acceptabile, cel puțin 9 zile, la fel fiind și în cazul materialului seminal diluat cu Caprogen și depozitat la 12⁰C.

Centrele de înșămânțare artificială au nevoie de metode precise pentru a determina concentrația și integritatea membranei spermatozoizilor, determinări esențiale pentru maximizarea numărului și calității dozelor de inseminare preparate din material seminal proaspăt și pentru a optimiza fertilitatea materialului seminal dezghețat. Lipsa de precizie în estimarea concentrației materialului seminal afectează direct eficiența unităților specializate în producerea materialului seminal, calitatea materialului seminal și fertilitatea (Anzar și col., 2009). Astfel în capitolul VIII, intitulat **„Determinarea și compararea valorilor concentrației materialului seminal brut cu ajutorul a trei metode: SQA, SDM5 și cu camera de numărat THOMA”**, s-a urmărit evaluarea preciziei a 3 metode de determinare a

concentrației materialului seminal: 2 metode noi SQA și SDM5 și metoda clasică, camera de numărat Thoma.

Concentrația materialului seminal măsurată prin cele trei metode a fost de $1,11 \pm 0,22$ cu camera de numărat Thoma, de $1,13 \pm 0,16$ cu SQA și de $1,26 \pm 0,19$ cu SDM5. În cazul concentrației măsurată cu camera de numărat Thoma și cu SQA, valorile concentrației materialului seminal au fost asemănătoare iar concentrația măsurată cu SDM5 a fost mai mare decât în cazul primelor două metode. ANOVA – *one way* demonstrează că nu au existat diferențe semnificative statistic între cele trei metode comparate ($p=0,683$). De asemenea și testul Tukey a relevat că, concentrația materialului seminal măsurată cu camera de numărat Thoma, SQA și SDM5 sunt statistic similare ($p>0,05$).

În ceea ce privește relația de corelație între cele 3 metode, a rezultat că între cele trei metode există o puternică corelație liniară, pozitivă și semnificativă din punct de vedere statistic ($p<0,001$). Coeficientul de determinare (R^2) în cazul corelației dintre SQA vs. SDM5 a fost de 0,937, fiind foarte aproape de valoarea 1. În celelalte 2 situații de corelație Thoma vs. SQA și Thoma vs. SDM5, coeficientul de determinare a avut de asemenea o valoare foarte mare fiind de 0,897, respectiv 0,863. Determinarea concentrației materialului seminal cu SDM5 este cea mai rapidă și ieftină metodă. Timpul lung de determinare a concentrației cu camera de numărat Thoma, cât și erorile ce pot apărea datorită factorului uman, reprezintă un dezavantaj iar analiza cu SQA prezintă un mare dezavantaj datorită costurilor mari ale consumabilelor.

Însămânțarea artificială la vaci este în principal realizată cu material seminal înghețat/dezghețat. Însă procesul de crioconservare induce nu numai pierderea viabilității spermatozoizilor dar determină și distrugerea funcțiilor spermatozoizilor care supraviețuiesc, ceea ce are ca rezultat o capacitate de fertilizare mai mică a spermatozoizilor înghețați/dezghețați (Watson, 2000). Mai multe studii (Dhami și col., 1992; Dhami și Sahni, 1993; Foote și Kaproth, 2002; Gao și col., 1997; Muiño și col., 2007) pun sub semnul întrebării necesitatea de a efectua echilibrarea materialului seminal și beneficiul real al acesteia asupra viabilității spermatozoizilor. Astfel, durata minimă de echilibrare necesară pentru a avea rezultate satisfăcătoare în crioconservarea materialului seminal rămâne controversată (Dhami și col., 1992; Dhami și Sahni, 1993). Capitolul IX intitulat „**Analiza mobilității materialului seminal de taur congelat-decongelat, supus unor timpi diferiți de echilibrare, prin trei metode**” a urmărit analiza mobilității spermatozoizilor supusă unor timpi diferiți de echilibrare: 4, 24 și 72 de ore, cu ajutorul a trei metode. Cea mai mare mobilitate a spermatozoizilor fost obținută pentru timpul de echilibrare de 24 de ore în cazul

mobilității analizate de IFN Schonow ($56,5 \pm 10,75$) și SQA ($64,44 \pm 10,21$). De asemenea un procent bun al mobilității spermatozoizilor în cazul celor 2 metode a fost obținut și pentru timpul de echilibrare de 72 de ore, respectiv $48,08 \pm 6,73$ pentru IFN Schonow și $57,16 \pm 18,59$ pentru SQA. În cazul mobilității analizate cu SpermVison cel mai ridicat procent al mobilității a fost înregistrat pentru timpul de echilibrare de 4 ore ($43,19 \pm 7,17$) respectiv 72 ($41,41 \pm 5,78$) de ore.

Rezultatele obținute sunt în concordanță cu studiile realizate de Gilbert și Almquist (1978) precum și de către Frijters (2003), care sunt pentru un timp de echilibrare prelungit, între 9 și 16 ore deoarece au observat că după această perioadă se obține un procent mai bun al integrității acrozomului (integritatea membranei) comparativ cu perioadele mai scurte de echilibrare.

Capitolul X - **„Corelații între unii parametri ai spermei brute și rata non return la 60-90 de zile la taurii din rasa Fleckvieh”** a urmărit evaluarea calității materialului seminal, măsurarea gradului de fertilitate retrospectivă cu privire la rata non-return și de asemenea stabilirea relației dintre unii parametri ai materialului seminal determinați în laborator prin metode clasice de evaluare, timpul de echilibrare, tipul de material seminal (lichid sau congelat) și rata non-return. Un total de 1.275 de ejaculate cu 1.184 rate non-return asociate vacilor însămânțate și respectiv 449 rate non-return asociate junicilor însămânțate, au fost analizate. Aceste ejaculate au fost obținute pentru perioada 2 noiembrie 2009 – 28 octombrie 2011. Un total de 77.394 vaci și 40.250 junici au fost însămânțate. Dintre acestea 47.992 vaci și 28.284 junici au fost declarate gestante.

Media volumului ejaculatelor a fost de $6,03 \pm 1,96$ ml, cu limite cuprinse între $3,97 \pm 0,98$ ml și $8,18 \pm 1,92$ ml, diferențele dintre tauri fiind statistic semnificative ($p < 0.001$). Diferențele de volum ale materialului seminal dintre tauri pot fi date de variațiile individuale ale potențialului genetic, iar taurii superiori genetic produc volume mai mari de material seminal.

Media mobilității ejaculatelor la cei 8 tauri luați în studiu a fost de $68,88 \pm 5,51\%$, cu limite cuprinse între $62,67 \pm 5,37\%$ și $71,63 \pm 5,14\%$, diferențele dintre tauri fiind statistic semnificative ($p < 0.001$). Mobilitatea spermatozoizilor este unul dintre cei mai importanți parametri asociați cu capacitatea de fertilizare a materialului seminal și de mulți ani este recunoscută ca fiind esențială pentru transportul spermatozoizilor în tractul reproductiv femel (Januskauskas și col., 1999; Verstegen și col., 2002).

Media valorilor concentrației ejaculatelor a fost de $(1,49 \pm 0,39) \times 10^9$ spermatozoizi/ml, cu limite cuprinse între $(1,86 \pm 0,29) \times 10^9$ spermatozoizi/ml și $(0,87 \pm 0,25) \times 10^9$ spermatozoizi/ml, diferențele dintre tauri fiind statistic semnificative ($p < 0.001$).

La vaci valoarea medie a ratei non-return a fost de $63,11 \pm 8,24$ %. La vițele valoarea medie a ratei non-return a fost de $69,72 \pm 7,88\%$, cea mai mică valoare a acestora fiind de $66,47 \pm 9,69\%$, iar cea mai mare valoare a ratei non-return a fost de $71,45 \pm 2,95\%$. Diferențele între tauri privind rata non-return la vițele au fost nesemnificative, $p > 0,01$ ($p = 0,210$). În ceea ce privește diferențele ratei non-return între vaci și vițele, Malhi și col. (2007) sugerează că competența de dezvoltare redusă a ovocitelor la vacile în vârstă ar putea explica scăderea fertilității observată la acestea. De asemenea, fătările multiple sunt responsabile de întârzierea involuției uterine, precum și de diminuarea condițiilor uterine și reprezintă un risc major pentru fertilitatea postpartum (Berglund, 2008).

Analiza relației dintre volum și rata non-return. Valoarea coeficientului de corelație (r) estimat de $-0,783$ arată că între cele două variabile volum și rata non-return există o puternică corelație negativă, semnificativ diferită de zero ($p < 0,05$) iar coeficientul de determinare (R^2) are valoarea de $0,613$.

Analiza relației dintre mobilitate și rata non-return. Valoarea coeficientului de corelație estimat de $0,880$, arată că între cele două variabile mobilitate și rata non-return există o puternică corelație pozitivă, astfel pe măsură ce mobilitatea crește, crește și rata non-return. Corelația este semnificativ diferită de zero, unde $p < 0,01$ iar coeficientul de determinare are valoarea de $0,775$.

Analiza relației dintre concentrație și rata non-return. Valoarea coeficientului de corelație estimat de $0,822$ demonstrează că între cele două variabile concentrație și rata non-return există o puternică corelație pozitivă, astfel pe măsură ce concentrația crește, crește și rata non-return. Corelația este semnificativ diferită de zero, unde $p < 0,05$ iar coeficientul de determinare (R^2) are valoarea de $0,675$ ceea ce înseamnă că $67,5\%$.

S-a urmărit de asemenea și compararea ratelor non-return ca martor al fertilității *in vivo* cu două metode diferite de conservare a materialului seminal: o metodă de conservare a materialului seminal cu Caprogen 5% (material seminal proaspăt) și o metodă de conservare a materialului seminal cu Tryladil (material seminal congelat). În cazul materialului seminal diluat cu Caprogen 5% valorile ratei non-return au fost mai mari comparativ cu valorile ratei non-return obținute în cazul materialului seminal diluat cu Tryladil.

Mobilitatea spermatozoidelor în funcție de timpul de echilibrare 24 ore vs. 4 ore a fost aproximativ egală: timpul de echilibrare de 24 de ore ($69,29 \pm 2,10\%$), comparativ cu timpul

de echilibrare de 4 ore ($69,11 \pm 2,83\%$). Rezultate ce nu sunt în concordanță cu rezultatele obținute în capitolul XI, unde valorile mobilității spermatozoizilor analizate de IFN Schonow (56,5%) și SQA (64,44%) au fost mai mari pentru timpul de echilibrare de 24 ore, comparativ cu timpul de echilibrare de 4 ore (IFN Schonow: 47,46% și SQA: 46,43%), respectiv 72 de ore (IFN Schonow: 48,08% și SQA: 57,16%).

În urma analizei mobilității materialului seminal recoltat luni, miercuri și vineri, în zilele de vineri s-a înregistrat cea mai mare valoare a mobilității ($69,07 \pm 3,24\%$), valorile din zilele de luni și miercuri fiind aproximativ egale: $68,74 \pm 2,95\%$, respectiv $68,70 \pm 3,03\%$.

În funcție de persoana care a realizat recoltarea materialului seminal (medici veterinari vs. tehnicieni), pe perioada luată în studiu valoarea ratei non-return a fost mai mare pentru grupul reprezentat de către medicul veterinar ($66,12 \pm 4,54\%$) comparativ cu valoarea ratei non-return înregistrată pentru grupul reprezentat de tehnicieni ($64,98 \pm 5,11\%$). Diferențele dintre cele două grupuri pot fi probabil puse pe lipsa de experiență a tehnicienilor sau a recoltării incorecte a materialului seminal.