

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Cuvinte cheie: videomorfometrie, aria, lungimea, lăţimea, perimetrul, elipticitatea, elongaţia, rugozitatea şi regularitatea

Creşterea animalelor este una dintre cele mai vechi ocupaţii umane, iar creşterea ovinelor a fost practică foarte de timpuriu în istoria dezvoltării umane, şi a început cu domesticirea strămoşilor ovinelor actuale. Astfel, cele mai vechi urme arheologice legate de domesticirea ovinelor au fost găsite în Irak, ele datează din mileniul al VII-lea î.Hr. şi demonstrează importanţa şi rolul acestei specii în dezvoltarea fiinţei umane moderne.

Lucrarea prezintă, intitulată CERCETĂRI VIDEO-MORFOMETRICE ASUPRA SPERMATOZOIZILOR DE BERBEC, respectă normele metodologice în vigoare şi conţine două părţi majore: I parte, reprezentată de cercetări din literatura de specialitate conţine un număr de patru capitole intitulate: IMPORTANŢA, LINIILE DIRECTOARE ŞI PERSPECTIVA CREŞTERII OVINELOR LA NIVEL MONDIAL, REPRODUCEREA LA BERBEC (*OVIS ARIES*), TEHNICI DE REPRODUCERE ASISTATĂ LA OVINE ŞI EVALUAREA SPERMEI PENTRU INSEMINAREA ARTIFICIALĂ.

Partea a II-a, constă în cercetarea personală şi conţine patru capitole: SCOPUL DE CERCETĂRILOR, LOCAŢIA EXPERIMENTALĂ, MATERIALUL BIOLOGIC ŞI SCHEMA DE LUCRU, REZULTATE PRIVIND EXAMENUL MACROSCOPIC AL SPERMEI, REZULTATE PRIVIND EXAMENUL MICROSCOPIC AL SPERMEI ŞI REZULTATE PRIVIND EXAMENUL MORFOMETRIC AL SPERMEI.

Teza de doctorat se termină cu concluzii şi recomandări şi o listă de surse bibliografice.

Studiul a fost realizat pe I.C.D.C.O.C. Palas Constanţa (Institutul de cercetare şi dezvoltare pentru ovine şi caprine de reproducţie), România şi în Laboratorul de Reproducţie Animală, Facultatea de Zootehnie, Universitatea de Ştiinţe Agronomice şi Medicină Veterinară, Bucureşti. Toate procedurile de lucru şi de îngrijire a animalelor utilizate în studiu au fost efectuate într-un mod stipulat în protocoalele de lucru, fără a afecta mediul şi bunăstarea animalelor.

Un total de 20 Merino berbeci (*Ovis aries*) cu vârsta între 2-6 ani au fost utilizaţi în studiu. Berbecii sunt o parte dintr-un efectiv de cercetare stabilit şi menţinut la ferma I.C.D.C.O.C. Palas Constanţa. Berbecii au fost menţinuţi în condiţii uniforme nutriţionale şi

pentru a evita diferențele legate de energia partiționată spre creșterea lânii între berbeci, toate animalele au fost tunse aproximativ cu trei luni înainte de debutul intervalului de colectare a materialului seminal.

Animalele utilizate în acest studiu provin din aceeași populație de bază. Toți berbecii au fost menținuți conform practicilor de etică aprobate. Toți berbecii au fost împărțiți în trei grupuri experimentale, în funcție de vârsta lor: 6 masculi tineri (mai mici de trei ani), 9 adulți (3-4 ani) și 5 masculi bătrâni (de peste patru ani).

Berbecii studiați au fost din rasa Merinos de Palas, una dintre rasele românești native.

În capitolul I sunt descrise, pe baza literaturii de specialitate, **IMPORTANȚA, LINIILE DIRECTOARE ȘI PERSPECTIVA MONDIALĂ DE CREȘTERE A OVINELOR**. Sunt prezentate aspecte privind răspândirea efectivelor de ovine pe tot globul, unele date despre producția agricolă globală în domeniul ovinelor, efectivul de ovine global, cuantificat la peste 1 miliard de capete, cu 19 % în Asia și Africa, precum și date despre consumul de alimente și agricultură specifică ovinelor. A fost prezentat Top-ul celor 10 țări crescătoare de ovine, evoluția populației de ovine din întreaga lume, exprimat în mii capete, distribuția procentuală de ovine pe continente, date despre producția de lapte și carne de oaie și tendințele mondiale în creșterea oilor.

Capitolul al II-lea, numit **REPRODUCEREA LA (OVIS ARIES)** prezentate aspecte ale reproducerii la ovine, particularitățile anatomice ale testiculelor, penisului și particularitățile fiziologice genitale la berbec, s-a descris pe larg procesul de spermatogeneză. S-au detaliat mecanismele de ejaculare a spermei, reflexele sexuale la berbec, colectarea materialului seminal și acțiunea factorilor de mediu asupra producției spermatice. Factorii care pot afecta calitatea spermei sunt considerați: temperatura, lumina, presiunea osmotică, flora microbiană, nutriția și atacul chimic. Sunt explicate morfologia spermatozoizilor și reglarea hormonală a spermatogenezei.

În capitolul III, intitulat **TEHNICI DE REPRODUCERE ASISTATĂ LA OVINE**, a fost prezentat potențialul tehnicilor de reproducere asistată de a ajuta crescătorii de ovine pentru a optimiza producția și eficiența reproducerii turmelor lor. Aspecte legate de aplicarea unor tehnici de reproducere asistată, cum ar fi inseminările artificiale (AI) și multipla ovulația și transferul de embrioni (MOET) sunt explicate și, de asemenea, se oferă argumente care permit fermierilor să producă berbecuți, oi și carne de miel la un preț de cost eficient. Tehnicile de reproducere

asistată la ovine (TRA), ca inseminarea artificială (AI) și producția de embrioni in vitro și transferul de embrioni (IVEP) pot apoi contribui în mod semnificativ, dacă sunt aplicate în mod corespunzător, pentru a optimiza și a asigura producția animalieră eficientă (Byrne et al., 2012). În subcapitolul 3.1 există date despre inseminarea artificială la oi-avantajele și dezavantajele, urmată de prezentarea MOET în subcapitolul 3.2., și, de asemenea, în subcapitolul 3.3. despre sexarea spermei prin ADN.

CAPITOLUL IV prezintă foarte detaliat EVALUAREA SPERMEI PENTRU INSEMINAREA ARTIFICIALĂ. Sunt prezentate cele două metode de recoltare de sperma, metoda vaginei artificiale AV și metoda electroejaculării EEJ și de asemenea, posibilitatea de a recoltare de sperma de la nivel epididimal. Se continuă cu evaluarea spermei prin examene macroscopice, microscopice și morfometrice și de asemenea, se prezintă posibilitatea de CRIOCONSERVARE a materialului seminal. Capitolul IV se încheie cu cercetări anterioare privind factorii care afectează calitatea spermei.

Partea a II-a, cercetările originale, proprii, debutează cu explicații privind SCOPUL CERCETĂRILOR, LOCATIA EXPERIMENTALE, MATERIALUL BIOLOGIC ȘI PROTOCOLUL DE LUCRU, toate acestea în CAPITOLUL AL V-LEA. Au fost incluse date și fotografii despre materialul biologic iar protocolul de lucru a fost detaliat.

CAPITOLUL al VI-lea, numit REZULTATE PRIVIND EXAMENUL MACROSCOPIC AL SPERMEI oferă rezultate originale detaliate despre caracteristicile materialului seminal evaluat prin examen macroscopic. Examenul macroscopic a fost făcut pe material seminal brut, cele mai multe dintre caracteristici fiind evaluate în paharul colector. Evaluarea macroscopic a constatat în evaluarea următorilor parametri: volumul ejaculatului, culoarea și mirosul spermei, consistența materialului seminal și pH-ul, precum și mișcare în valuri a spermei.

Capitolul al VII-lea, intitulat REZULTATE PRIVIND EXAMENUL MICROSCOPIC AL SPERMEI include, de asemenea, rezultatele originale și comparații cu alte cercetări în domeniu. Examenul microscopic acoperă următoarele caracteristici: densitatea spermei; concentrația spermei în spermatozoizi; mobilitatea spermatozoizilor și examenul morfologic al spermei, inclusiv procentul de spermatozoizi vii, normali și anormali.

Capitolul VIII, intitulat REZULTATE PRIVIND EXAMENUL MORFOMETRIC AL SPERMEI, reprezintă partea principală a prezentei cercetări. A fost reprezentat de cercetări video-morfometrice asupra materialului seminal la cei 20 berbeci studiați. S-au efectuat

determinări morfometrice cu ajutorul sistemului ISAS CASA, compus din ISAS software, UB203i microscop cu contrast de faza cu epi-fluorescență, aparat de fotografiat și computer.

Cu ajutorul ISAS v1, în studiul nostru, caracteristicile morfometrice ale spermatozoizilor au fost efectuate pe frotiurile colorate. Datele au fost înregistrate la Facultatea de ZOOTEHNIE, U.A.S.V.M. București. ISASv1 morfometrie a dat următorii parametri morfometrici: dimensiunile capului spermatozoidului sau parametri primari (aria, lungimea, lățimea și perimetrul), dimensiunile de formă sau parametri derivați (elipticitatea, elongația, rugozitatea, regularitatea). Parametrii morfometrici mășurați sunt prezentați în tabele și grafice și datele au fost prelucrate statistic

CAPITOLUL IX, CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI, încheie teza de doctorat.

Toți parametrii morfologici și morfometrici ai spermei obținuți pe parcursul studiului au prezentat variații considerabile (amplitudinea variației pentru fiecare caracteristică a fost inclusă).

Valorile volumului ejaculatului au variat între 1.4096 ± 0.081753 mL și 1.8224 ± 0.067367 mL. Valoarea cea mai scăzută a volumului ejaculatului a fost înregistrat la grupul de berbeci mai în vârstă de 4 ani (1.59312 ± 0.022755348 mL), în același timp, cea mai mare valoare a fost înregistrată la grupul de berbeci de 3-4 ani, ($1.729688889 \pm 0.026386997$ mL). Există diferențe semnificative pentru volumul ejaculatului între probele berbecilor mai tineri față de berbecii mai bătrâni, dar diferențe foarte semnificative între categoria, berbecilor de 3-4 ani față de categoria celor mai mult de 3 ani. În funcție de metoda de recoltare, valorile medii ale volumului ejaculatului au fost mai mari în cazul ejaculatelor obținute prin metoda vaginului artificial comparativ cu metoda electro-ejacularii. Au fost înregistrate diferențe foarte semnificative între probele obținute prin cele două metode de recoltare, vagina artificială și electroejaculare.

Culoarea materialului seminal a fost normală, albă spre galben, în toate ejaculatele analizate. În strânsă corelație cu culoarea, a fost mirosul de spermă, în toate cazurile un miros de proteine, miros de ou proaspăt.

Consistența materialului seminal a înregistrat valori care au variat de la 3.32 la 3.72, pe o scară de la 0 la 5. Valorile medii ale consistenței materialului seminal în funcție de vârsta berbecilor a fost cea mai mare la berbecii adulți, urmate de berbeci mai tineri, sub 3 ani, valoarea cea mai scăzută fiind înregistrată la berbecii bătrâni. Valoarea medie a consistenței materialului seminal în funcție de metoda de recoltare a relevat faptul că consistența materialului seminal a

fost mai mare în cazul folosirii vaginului artificial și mai mică în cazul utilizării electroejaculatorului. Valoarea cea mai scăzută a pH-ului materialului seminal a fost 6.8488 ± 0.012715 și cea mai înaltă, 7.1672 ± 0.028528 . Valoarea cea mai scăzută a acestui parametru a fost înregistrată în adulți berbeci. Valorile mai mari au fost înregistrate în categoria de berbeci mai în vârstă, și rams cel mai tânăr în studiul a înregistrat valoarea de 7.098267 ± 0.010749 . Au fost înregistrate diferențe mici între valorile obținute de la ejaculatele obținute prin cele două tehnici de recoltare de spermă.

Mișcarea în valuri a materialului seminal în funcție de vârsta berbecilor a variat între 3.6 ± 0.048639 în categoria de berbeci mai bătrâni și 0.052118 ± 3.648889 la categoria de berbeci adulți. Putem concluziona observând superioritatea rezultatelor obținute prin metoda de colectare cu vagina artificială, față de metoda de recoltare cu electroejaculatorul.

Valorile motilității spermei au variat între $80.6 \pm 1.235584\%$ și $90.4 \pm 0.369685\%$. Cea mai mare valoare a motilitatea spermei a fost înregistrată în rams 3-4 ani, între timp, o valoare mai mică de motilitatea spermei a fost înregistrat în categoria de berbeci mai vechi. Diferența dintre metodele două colecție reprezintă doar 0.59%, în favoarea metodei de vagin artificial.

Valorile medii ale concentrației materialului seminal au variat între $1.1224 \pm 0.029128 \times 10^9$ spermatozoizi/mL și $2.8412 \pm 0.029031 \times 10^9$ spermatozoizi/mL. Cea mai mare valoare a concentrației spermei a fost înregistrată în categoria berbecilor de 3-4 ani. Concentrația materialului seminal în celule spermatice a fost $2.1178 \pm 0.0033516 \times 10^9$ spermatozoizi/mL pentru metoda de recoltare AV și $2.102828 \pm 0.057555 \times 10^9$ spermatozoizi/mL pentru metoda EEJ. Diferențe semnificative au fost obținute pentru concentrația spermei între probe diferite în funcție de vârsta berbecilor.

Valoarea maximă înregistrată a celulelelor spermatice normal morfologic, a variat între $91.96 \pm 0.329039\%$ și $85.44\% \pm 0.583324$, cu cea mai mare valoare a acestui parametru înregistrată în categoria berbecilor adulți. Ținând cont de tehnica de recoltare, valorile celulelor spermatice morfologice normal erau mai mari în cazul metodei EEJ, comparativ cu metoda AV, chiar dacă cele două valori nu diferă în mod semnificativ.

Cea mai mare valoare medie a celulelelor spermatice anormal morfologice a fost $14.96 \pm 0.717589\%$, iar valoarea $8.04 \pm 0.329039\%$ a fost cea mai mică. În funcție de vârsta berbecilor, acest parametru a înregistrat valoarea cea mai scăzută în cazul berbecilor de 3-4 ani. S-au numărat mai multe celulele spermatice anormale în cazul AV decât în cazul EEJ.

Valorile medii ale lungimii capului spermatozoizilor au variat între $7.4276 \pm 0.029537 \mu\text{m}$ și $7.9064 \pm 0.016237 \mu\text{m}$. Valoarea cea mai scăzută a fost înregistrată în cazul categoriei berbecilor mai mari de patru ani, urmată de categoria berbecilor adulți. Diferențe semnificative au fost obținute pentru lungimea capului spermatozoidului între probele berbecilor mai tineri față de berbecii mai bătrâni și, de asemenea, între berbeci de 3-4 ani și berbecii mai bătrâni. Nu au existat diferențe între berbecii de 3-4 ani și cei mai tineri de trei ani. A fost observată superioritatea lungimii capului spermatozoizilor în favoarea metodei de recoltare prin electroejaculare, față de metoda de recoltare prin vagina artificială. Nu s-au fost înregistrat diferențe între datele obținute prin gruparea probelor în funcție de metoda de recoltare, metoda AV și metoda EEJ.

Cea mai scăzută valoare medie a lățimii capului spermatozoizilor a fost înregistrat la categoria berbecilor mai tineri, $4.3078 \pm 0.009706 \mu\text{m}$, urmată de categoria berbecilor mai bătrâni, cu o valoare medie de $4.51232 \pm 0.004808 \mu\text{m}$. Valoarea medie cea mai mare a fost calculată la berbecii adulți de 3-4 ani, ca $4.609556 \pm 0.007886 \mu\text{m}$. Diferențe semnificative au fost obținute pentru lățimea capului spermatozoidului între probele de sperma în funcție de vârsta berbecilor, dar nu au fost înregistrate diferențe între metodele de recoltare.

Superioritatea berbecilor adulți cu privire la suprafața capului spermatozoidului față de tineri și, de asemenea, față de bătrâni se observă prin diferențe semnificative. Valoarea medie a suprafeței capului spermatozoizilor a fost mai mare în cazul în care s-a folosit metoda electroejaculării, decât cea raportată în cazul în care s-a folosit metoda de recoltare cu vagina artificială.

Valorile perimetrului capului spermatozoidului au variat între $17.04829 \pm 0.065817 \mu\text{m}$ și $19.26479 \pm 0.031957 \mu\text{m}$. Cea mai mare valoare medie a perimetrului capului spermatozoizilor a fost înregistrată la categoria berbecilor adulți, urmată de categoria berbecilor mai mari de 4 ani. Analizând valorile perimetrului capului spermatozoizilor în funcție de metoda de recoltare, se poate observa că valorile raportate la măsurarea perimetrului capului spermatozoizilor prin metoda de electroejaculare au fost mai mari decât cele obținute prin metoda vaginei artificiale. S-ar putea concluziona că valorile înregistrate privind elipticitatea capului au variat de la 1.635451 ± 0.00757 la 1.817234 ± 0.008555 . Elipticitatea capului spermatozoizilor a înregistrat valori diferite la cele trei categorii de vârstă, cu diferențe semnificative. Valorile mai mari ale elipticității indică faptul că spermatozoizii berbecilor tineri sunt mai subțiri. Spermatozoizii cu

capete mai eliptice înoată mai repede. Valorile medii ale elipticității capului spermatozoizilor în funcție de metoda de recoltare a materialului seminal a înregistrat diferențe mici între valorile înregistrate.

Indicele elongației capului spermatozoidului a variat pe tot parcursul studiului curent între 0.240967 ± 0.002164 și 0.289929 ± 0.002122 . Astfel, se poate concluziona că cea mai mare valoare a indicelui elongației capului spermatozoidului a fost înregistrat la categoria celor mai tineri berbei. Cu cât indicele elongației capului spermatozoidului este mai aproape de la zero, capul spermatozoidului este mai rotund. Valoarea medie a indicelui elongației capului spermatozoidului în cazul utilizării vaginei artificiale a fost 0.259293 ± 0.00092 și valoarea medie a indicelui elongației capului spermatozoidului în caz de utilizare a electroejaculării a fost 0.257642 ± 0.001452 , diferența reprezintă doar 1%, această valoare nu a adus diferențe semnificative între metoda AV și metoda EEJ.

Valorile medii ale rugozității capului spermatozoidului au variat între 1.267035 ± 0.001221 și 1.448358 ± 0.001012 . Utilizarea metodei vaginei artificiale a dat celule spermatice cu o valoare mai mică a indicelui de rugozitate decât utilizarea electroejaculării.

Valoarea acestui indice fiind mai mică, capetele spermatozoizilor sunt mai amorfe sau neregulate.

Regularitatea capului spermatozoidului variază de la 0.743154 ± 0.000006 la 0.788751 ± 0.0000826 . Având în vedere vârsta berbecilor, studiul relevă faptul că cea mai mare valoare a regularității capului a fost înregistrat la categoria de vârstă mai tânără. Având drept criteriu metoda de recoltare, în cazul metodei electroejaculării, valorile înregistrate sunt superioare față de cele obținute în cazul utilizării metodei vaginei artificiale. Diferențe semnificative au fost obținute la regularitatea capului spermatozoidului între probele de sperma în funcție de vârsta berbecilor.

Evaluarea microscopică a arătat că majoritatea parametrilor nu diferă semnificativ între sperma obținută de la diferite vârste, cu excepția volumului ejaculatului, între berbeci adulți și celelalte două categorii, și, de asemenea, între metodele de recoltare. Evaluarea macroscopică a arătat că majoritatea parametrilor nu diferă semnificativ între sperma obținută de la diferite vârste, cu excepția concentrației spermei. Analiza morfometrică indică diferențe semnificative între categoriile de vârstă pentru lățimea, suprafața, perimetrul capului spermatozoidului și indicele de elipticitate, elongație și regularitate. Lipsa de diferențe semnificative a indicat că alți

factori pot afecta diferența observată între cele două metode de recoltare. Rezultatele obținute pentru această parte a studiului subliniază în continuare posibilitatea cercetărilor pentru a corela trăsăturile morfometrice ale spermei de berbec cu rata de concepție a femelelor pentru a determina dacă trăsăturile morfometrice sunt necesare a fi incluse în testele de calitate pentru spermă.

În general, parametrii morfometrici măsurați pe ejaculate proaspete de berbec în acest studiu sunt în concordanță cu cei găsiți de mai mulți alți cercetători pentru lungimea capului, - suprafață, - perimetru, elipticitate, elongație, rugozitate și regularitate (Martí et al., 2011; Maroto-Morales et al., 2012; Yániz et al., 2012, Boshoff, 2014).