

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Tanja KLJUN

**VPLIV SPREMEMB V TEMPERATURI OB
SKLADIŠČENJU GLOBOKO ZAMRZNJENEGA
SEMENA BIKOV NA KAKOVOST ODMRZNJENEGA
SEMENA**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2005

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Tanja KLJUN

**VPLIV SPREMEMB V TEMPERATURI OB SKLADIŠČENJU
GLOBOKO ZAMRZNJENEGA SEMENA BIKOV NA KAKOVOST
ODMRZNJENEGA SEMENA**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**THE EFFECT OF TEMPERATURE CHANGES AT DEEP FROZEN
STORED BULLS SEMEN ON QUALITY OF THAWED SEMEN**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2005

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija kmetijstvo - zootehnika na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Diplomsko delo je bilo izdelano na Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko in na Osemenjevalnem centru Preska Kmetijsko gozdarske zbornice Slovenije.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja pri izdelavi diplomske naloge imenovala prof. dr. Andreja Orešnika in za somentorja dr. Tomaža Snoja.

Recenzent: doc. dr. Silvester ŽGUR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Stane KAVČIČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Andrej OREŠNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Silvester ŽGUR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Tomaž SNOJ

Osemenjevalni center Preska, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja Kljun

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Vs

DK UDK 636.2(043.2)=863

KG govedo/biki/sem/skladiščenje/temperatura/kakovost

KK AGRIS L01/5214

AV KLJUN, Tanja

SA OREŠNIK, Andrej (mentor)/SNOJ, Tomaž (somentor)

KZ SI-Domžale, Groblje 3

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

LI 2005

IN VPLIV SPREMEMB V TEMPERATURI OB SKLADIŠČENJU GLOBOKO
ZAMRZNJENEGA SEMENA BIKOV NA KAKOVOST ODMRZNJENEGA
SEMENA

TD Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)

OP VII, 44 str., 9 pregl., 2 sl., 23 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Štirim bikom črnobelega pasme, ki so bili stari od 30 do 33 mesecev, smo isti dan z umetno vagino odvzeli dva ejakulata. Delež progresivno gibljivih semenčic v svežih in v ejakulatih po razredčitvi je bil od 70 do 75 %. Seme smo globoko zamrznili v 0,5 ml slamicah. V dozi semena je bilo po bikih 40,8; 35,6; 43,2 in 41,6 x 10⁶ semenčic. V kriogeno posodo s semenom smo nalili 7 cm tekočega dušika. Petnajsti dan poskusa v kriogeni posodi ni bilo več dušika. Prvi dan poskusa je bila temperatura na dnu posode – 194,7 °C, 14. dan – 180,0 °C in 15. dan – 150,0 °C, 20. dan se je dvignila nad – 100 °C (na – 77,3 °C). Vsak dan poskusa smo iz kriogene posode odvzeli in odtajali po 5 slamic semena vsakega bika. Po odtajanju in po 24-tih urah skladiščenja semena pri 4 °C smo v semenu izmerili delež progresivno gibljivih semenčic. Nivo tekočega dušika in zviševanje temperature v kriogeni posodi do 18. dne poskusa (- 133,0 °C) nista vplivala na izmerjeni delež progresivno gibljivih semenčic ne po odtajanju in ne 24 ur po tem. V izmerjenih vrednostih deležev progresivno gibljivih semenčic po odtajanju in po 24. urah hranjenja pri 4 °C v vzorcih semena štirih bikov med biki do 18. dne poskusa ni bilo statistično značilnih razlik. Semenu bika 1 je delež progresivno gibljivih semenčic po odtajanju padel pod 50 % 19. dan poskusa, pri semenu bikov 3 in 4 20. dan in pri semenu bika 2 21. dan. Delež progresivno gibljivih semenčic, izmerjen v semenu istih slamic po 24 urah, je padel pri vseh bikih pod 40 % en dan kasneje.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs

DC UDC 636.2(043.2)=863

CX cattle/bulls/semen/storing/temperature/quality

CC AGRIS L01/5214

AU KLJUN, Tanja

AA OREŠNIK, Andrej (supervisor) /SNOJ, Tomaž (co-supervisor)

PP SI-Domžale, Groblje 3

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department

PY 2005

TI THE EFFECT OF TEMPERATURE CHANGES AT DEEP FROZEN
STORED BULLS SEMEN ON THE QUALITY OF THAWED SEMEN

DT Graduation Thesis (Higher professional studies)

NO VII, 44 p., 9 tab., 2 fig., 23 ref.

LA sl

AL sl/en

AB With artificial vagina two sets of ejaculates were taken from four Black and White bulls, aged from 30 to 33 months. The share of spermatozoa progressive motion in fresh and diluted ejaculates was 70 to 75 %. The semen was frozen in 0.5ml straws. In the first set of straws there was 40.8×10^6 spermatozoa from the first bull, 35.6×10^6 from the second bull, 43.2×10^6 and 41.6×10^6 from the third and fourth bull respectively. 7cm of liquid nitrogen was added to the cryogenic container with semen. On the 15th day of the test all the liquid nitrogen evaporated. On the first day of the test the temperature at the bottom of the container was -194 °C. On the 14th day the temperature was -180 °C and on the 15th day it was -150 °C. On the 20th day of the test the temperature was over -100 °C (-77.3 °C). We took 5 frozen straws of semen of each bull from the cryogenic container every day of the test. After the semen was thawed and refrigerated at 4 °C for 24h, the share of spermatozoa progressive motion was measured. The level of liquid nitrogen and the rise of temperature in cryogenic container did not have any influence on the share of spermatozoa progressive motion immediately after thawing and after refrigerating straws for 24h until the 18th day of the test. The measures of thawed straws and the ones refrigerated for 24h did not show statistical difference between bulls until the 18th day of the test. In the semen of the first bull the share of spermatozoa progressive motion fell under 50 % after thawing already on the 19th day of the test, of the second and third bull that happened on the 20th day and of the fourth bull on the 21st day of the test. The share of spermatozoa progressive motion in the same straws fell under 40 % after they were refrigerated for 24 hours in all bulls one day later.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA UMETNEGA OSEMENJEVANJA PRI GOVEDU	3
2.2 ZGODOVINA GLOBOKEGA ZAMRZOVANJA SEMENA	4
2.2.1 Metoda globokega zamrzovanja in shranjevanja semena v steklene ampule	4
2.2.2 Metoda globokega zamrzovanja in shranjevanja semena v suhem ledu	4
2.2.3 Metoda globokega zamrzovanja in shranjevanja semena v plastičnih slamicah	6
2.3 UMETNO OSEMENJEVANJE KRAV IN TELIC V SLOVENIJI	6
2.3.1 Statistični podatki o umetnem osemenjevanju krav in telic v Sloveniji	6
2.4 POSTOPEK PRIDOBITVE SEMENA	8
2.5 OCENE KAKOVOSTI SVEŽEGA SEMENA	9
2.5.1 Makroskopski pregled semena	9
2.5.2 Mikroskopski pregled semena	9
2.5.3 Supravitalno barvanje bikovih semenčic	10
2.6 RAZREDČEVANJE SEMENA	10
2.7 KRIOGENA POSODA	11
2.7.1 Znaki, ki nakazujejo, da kriogena posoda ni več uporabna	12
2.8 POSTOPEK TAJANJA GLOBOKO ZAMRZNJENEGA SEMENA	12
2.9 TAJANJE SLAMIC Z GLOBOKO ZAMRZNJENIM BIKOVIM SEMENOM NA TERENU, PRI POSTOPKU UMETNEGA OSEMENJEVANJA KRAV IN TELIC	14
3 MATERIAL IN METODE DELA	16
3.1 BIKI	16
3.1.1 Bik 1	16

3.1.2	Bik 2	16
3.1.3	Bik 3	17
3.1.4	Bik 4	17
3.2	RAZREDČEVALEC	17
3.3	KRIOGENA POSODA	18
3.4	TEKOČI DUŠIK	19
3.5	OCENE KAKOVOSTI SVEŽEGA SEMENA	19
3.6	IZVEDBA POSKUSA	20
3.7	ODTAJANJE IN OCENA KAKOVOSTI ODTAJANEGA SEMENA	21
3.8	STATISTIČNA ANALIZA	21
4	REZULTATI	23
4.1	TEMPERATURA V KRIOGENI POSODI	23
4.2	KAKOVOST SVEŽEGA SEMENA	25
4.3	PROGRESIVNA GIBLJIVOST SEMENČIC PO ODTAJANJU	27
4.4	OSTALA OPAZOVANJA	29
4.5	STATISTIČNA ANALIZA IZMERJENIH VREDNOSTI V POSKUSU	29
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	35
5.1	RAZPRAVA	35
5.2	SKLEPI	38
6	POVZETEK	39
7	VIRI	42
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Uspeh osemenitev (non return (NR) na 90 dni) po pasmah bikov v ljubljanski regiji od 1.1.2004 do 1.10.2004 (Poročilo o...,2004)	7
Preglednica 2: Prikaz nivoja dušika in temperature v kriogeni posodi po dnevih pri poskusu, ki je bil izveden brez semena in poskusu s semenom v kanistrah	23
Preglednica 3: Lastnosti svežega semena	26
Preglednica 4: Povprečje progresivne gibljivosti semenčic (%) v dozah semena po odtajanju pri posameznih bikih tekom poskusa	28
Preglednica 5: Deleži progresivno gibljivih semenčic v semenu posameznih bikov po odmrznitvi v različnih časovnih intervalih	30
Preglednica 6: Deleži progresivno gibljivih semenčic v semenu posameznih bikov 24 ur po odtajanju v različnih časovnih intervalih	31
Preglednica 7: Delež progresivno gibljivih semenčic bikov po časovnih intervalih zaporednih meritev	32
Preglednica 8: Delež progresivno gibljivih semenčic v odtajanih dozah semena bikov po časovnih intervalih zaporednih meritev	32
Preglednica 9: Primerjava deležev progresivno gibljivih semenčic bikov po odmrznitvi in 24 ur po tem	33

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Plošča suhega ledu, v katero so nakapljali razredčeno bikovo seme	5
Slika 2: Odvzem semena	8

1 UVOD

Po postopku razredčevanja in globokega zamrzovanja semena bikov, doze semena v osemenjevalnih centrih hranijo v kriogenih posodah, ki so napolnjene s tekočim dušikom. Temperatura v posodah je stalno okrog $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tudi ob pravilnem ravnanju s posodami in semenom v njih dušik postopno izhlapeva. Nivo tekočega dušika v posodi redno kontrolirajo in dušik po potrebi dodajajo. Globoko zamrznjene doze semena posameznih bikov (po eno dozo vsake serije) je potrebno po predpisanem postopku odtajati in preveriti kakovost semena z oceno deleža progresivno gibljivih semenčic. Po Pravilniku o pogojih oploditvene sposobnosti semena domačih živali (2005) mora biti v vzorcu najmanj 50 % progresivno gibljivih semenčic takoj po odtajanju in najmanj 40 % progresivno gibljivih semenčic 24 ur kasneje. Seme ustrezne kakovosti je pripravljeno za umetno osemenjevanje.

Osemenjevalci prihajajo v osemenjevalne centre po seme, ki ga potem hranijo v svojih terenskih kriogenih posodah. V praksi se dogaja, da dušik iz posod pospešeno hlapi, osemenjevalec pa zamudi s potrebnim dodajanjem tekočega dušika. Dogaja se tudi, da dušik iz posode po nesreči izteče. Zaradi tega se v posodi temperatura zviša, kar neugodno vpliva na kakovost semena in s tem na oploditveno sposobnost semenčic.

Kakovost svežega semena bikov, ki smo ga uporabili v poskusu za pripravo diplomske naloge, smo ocenili s predpisanimi postopki. Izmerili smo volumen ejakulatov, koncentracijo semenčic v ejakulatu, valovanje, delež progresivno gibljivih semenčic in delež vitalnih semenčic. V nadaljevanju smo preverili kako se v kriogeni posodi spreminja temperatura v odvisnosti od nivoja tekočega dušika v njej in spremljali spremembe v kakovosti po standardnih postopkih ocenjevanja globoko zamrznjenega semena po odtajanju, ki so se dogajale tekom zviševanja temperature v kriogeni posodi, ko v posodo nismo dodajali tekočega dušika.

Ugotoviti želimo, pri kateri temperaturi v kriogeni posodi seme ni več uporabno za umetno osemenjevanje in koliko časa traja obdobje, v katerem brez dolivanja ves tekoči dušik izhlapi in kdaj se temperatura v posodi dvigne do kritične vrednosti. Preverili smo ali lastnosti svežega semena in gibljivost semenčic po razredčitvi svežega semena posameznega bika

vplivajo na dogajanja ob zviševanju temperature zaradi zniževanja nivoja tekočega dušika v kriogeni posodi in na kakovost globoko zamrznjenega semena po odtajanju.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA UMETNEGA OSEMENJEVANJA PRI GOVEDU

Začetki umetnega osemenjevanja naj bi segali v 14. stoletje, ko je neki arabski poglavar umetno osemnil kobilu. V klobčič dlak je ujel seme znamenitega žrebca in ga prenesel v rodila svoje kobile, ki mu je žrebila zeleno žrebe (Pavšič, 1963b).

Leta 1780 (sto let po Leuwenhoekovem odkritju semenčic) je italijanski znanstvenik Lazaro Spallanzani najprej umetno oplodi žabja jajčeca, kasneje je uspešno osemnil tudi psico (Močnik, 1975).

Za Spallanzanijem sta Francoza Dumas in Prévost odkrila pravi pomen semenčic pri oploditvi. Ponovila sta Spallanzanijev poskus na žabjih jajčecih in opazovala, kako semenčice prodirajo skozi sluz, ki obdaja ikre. Ugotovila sta, da je oploditvena sposobnost semenčic močno odvisna od njihove gibljivosti. Ruski veterinar Ilija Ivanovič Ivanov je leta 1900 začel umetno osemenjati kobile, govedo, ovce, perutnino in insekte. Raziskoval je razredčevanje in transport semena in se zavzemal za praktično uporabo umetnega osemenjevanja. Pri svojem delu je vedno bolj izpopolnjeval tehniko odzemanja semena, njegovo razredčevanje in konzerviranje, predvsem pa globlje prodiral v bistvo reprodukcijskih procesov (Pavšič, 1963b).

Po izdelavi umetne vagine (leta 1931), jajčnega razredčevalca in kasneje po odkritju tehnike zamrzovanja semena, se je umetno osemenjevanje začelo hitro širiti po vsem svetu (Močnik, 1975).

V Sloveniji je z umetnim osemenjevanjem začel prof. dr. Marjan Pavšič. Poskusno so prvih sto govejih plemenic osemnili na področju Logatca že leta 1942 in 1943. Tam je bila prva osemenjevalna postaja v Sloveniji. Umetno osemenjevanje se je v zadnjih 50. letih zelo razširilo, saj poleg genetskega napredka v reji živali omogoča tudi kontrolo in izkoreninjenje kužnih bolezni, ki se prenašajo pri naravnem pripustu (Ambrožič, 2000).

2.2 ZGODOVINA GLOBOKEGA ZAMRZOVANJA SEMENA

Raziskovalci v mnogih deželah so iskali reagent, ki bi semenčicam omogočil preživetje v razmerah kot so zamrzovanje in odtajanje ob velikih temperaturnih spremembah. Razvoj in uspeh globokega zamrzovanja sta bila pogojena z odkritjem pozitivnih učinkov glicerola, dodanega semenu. Angleški znanstvenik Polge je leta 1949 (cit. po Foote, 2002) razredčenemu petelinjemu semenu dodal glicerol. Ugotovil je, da glicerol ščiti celično membrano in semenčici omogoča preživetje ob velikem temperaturnem nihanju pri zamrzovanju in odtajanju.

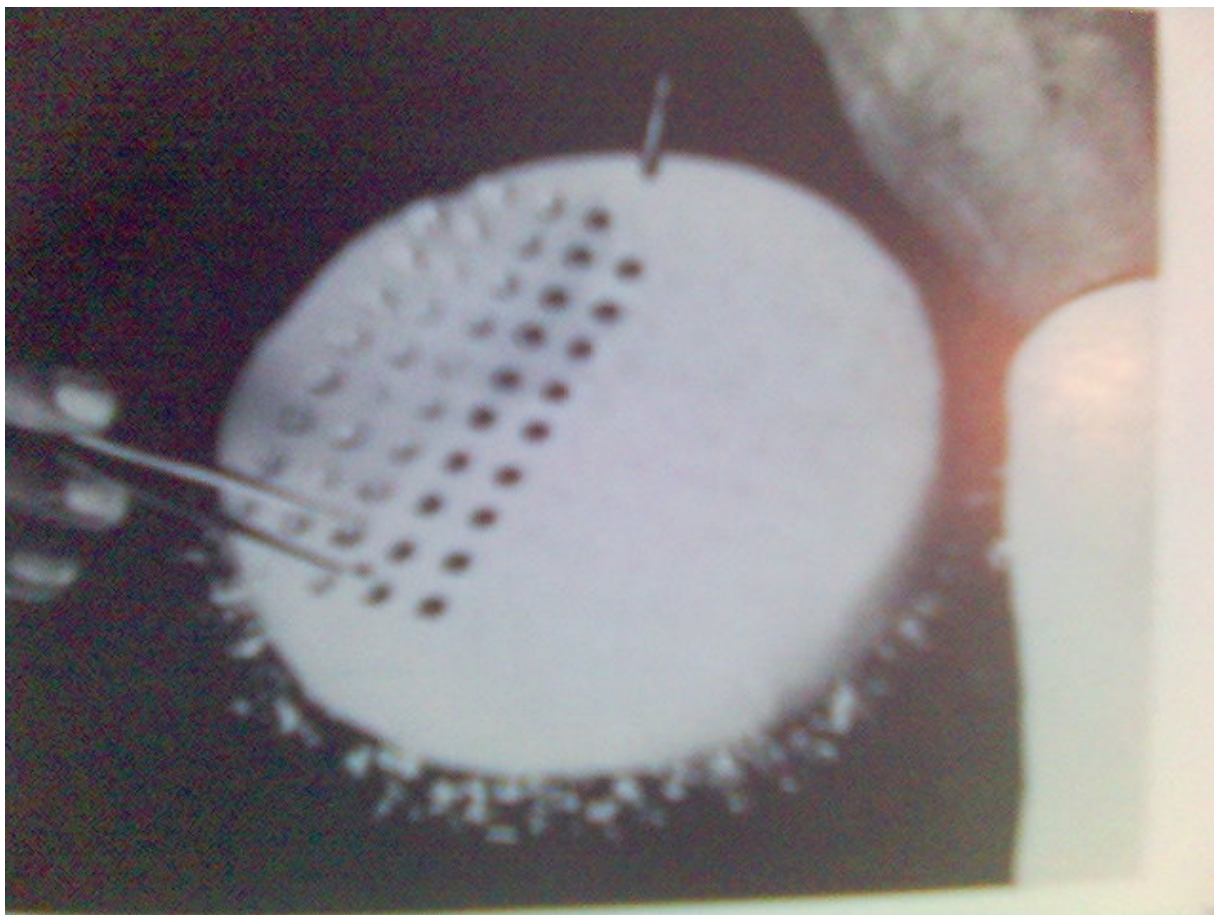
2.2.1 Metoda globokega zamrzovanja in shranjevanja semena v steklene ampule

Prvo shranjevanje globoko zamrznjenega semena so uporabljali s steklenimi ampulami z volumnom 1ml. Svežemu semenu so dodali polovico vsega (za določen ejakulat namenjenega) razredčevalca, ki je bil segret na 25-30 °C in ni vseboval glicerola. Razredčeno seme so dali za 2 uri v hladilnik na 5 °C. Po dveh urah so dodali še preostanek razredčevalca z glicerolom, ohlajenega na 5 °C. Do konca razredčeno seme je 6 ur počivalo v hladilniku (potekla je ekvilibracija – izmenjava snovi preko celične membrane). Sledilo je polnjenje razredčenega semena v ampule. Napolnjene ampule je bilo potrebno dobro zapreti. Zaprte ampule so naložili na žičnato mrežo, ki je bila pritrjena 4 cm nad nivojem tekočega dušika. Zamrzovanje semena je potekalo v hlapih tekočega dušika. Ampule je bilo potrebno obračati, da je seme zamrznilo enakomerno, po celotni prostornini ampule. Metoda zamrzovanja semena v ampule je bila v uporabi le kratek čas, saj steklene ampule niso bile odporne na nihanje temperature (Paufler in sod., 1974).

2.2.2 Metoda globokega zamrzovanja semena v suhem ledu

Metodo globokega zamrzovanja v suhem ledu je leta 1964 uvedel raziskovalec Nagose. Semenu je dodal segret razredčevalca, ki ni vseboval glicerola. Razredčeno seme je za 2-6 ur postavil v hladilnik, na 5 °C. V tem času je potekla ekvilibracija. Suhi led (ogljikov dioksid) je bil narejen v obliki plošče. V to ploščo so s kovinsko matrico naredili luknjice. V luknjice so vstavili pilulo, v katero so nakapljali razredčeno seme. Razredčenemu semenu so neposredno

pred polnjenjem dodali glicerol ohlajen na 2 °C. Razredčeno seme v pilulah se v nekaj minutah ohladi na -79 °C, na temperaturo suhega ledu. Po 5. minutah lahko ploščo suhega ledu s semenom potopimo in shranimo pilule semena v tekočem dušiku na -196 °C. To metodo je izpodrinila metoda shranjevanja semena v plastičnih slamicah (Paufler in sod., 1974).



Slika1: Plošča suhega ledu, v katero so nakapljali razredčeno bikovo seme (Paufler in sod., 1974).

2.2.3 Metoda globokega zamrzovanja in shranjevanja semena v plastičnih slamicah

Danski znanstvenik Sørensen je veliko razmišljal o bolj enostavni metodi shranjevanja semena, kot je shranjevanje v suhem ledu. Leta 1956 je na rojstnem dnevu svoje hčere opazoval otroke, ki so srkali pijačo s celofanastimi slamicami. Porodila se mu je ideja, da bi seme napolnil v slamice, ga globoko zamrznil in shranil v tekočem dušiku. Leta 1964 je Francoz Cassou posodobil Sørensenovo slamico in začel proizvajati komercialne slamice za osemenjevanje. Izdelal je tudi aplikator za osemenjevanje s slamicami. Ta metoda je do danes ostala v praksi. Slamice se polnijo z avtomatsko polnilko semena, ki slamice tudi zapira in nanje natisne vse pomembne podatke o biku. Slamice z razredčenim semenom se nato za nekaj ur razporedi v hladilnik na 4 °C. Takrat poteče ekvilibracija. Ob pomoči računalniško krmiljene skrinje za globoko zamrzovanje se slamice postopno zamrzne in potopi v tekoči dušik. Seme v slamicah, ki je potopljeno v tekoči dušik je shranjeno na -196 °C in nima omejenega roka uporabe (Foote, 2002).

2.3 UMETNO OSEMENJEVANJE KRAV IN TELIC V SLOVENIJI

2.3.1 Statistični podatki o umetnem osemenjevanju krav in telic v Sloveniji

V letu 2004 je bilo v Sloveniji 182.106 prvih osemenitev. Leta 2004 je pri nas osemenjevalo 250 osemenjevalcev. Indeks osemenitev (IO) je razmerje med številom vseh osemenitev in številom prvih osemenitev. V letu 2004 je ta indeks v povprečju znašal 2,10 doze semena.

V Sloveniji redijo na vseh treh osemenjevalnih centrih (Preska, Ptuj, Murska Sobota) v povprečju 20 plemenskih bikov rjave pasme, 55 plemenskih bikov lisaste pasme, 16 plemenskih bikov črnobelega pasme in povprečno 7 bikov mesnih pasem (limousin, belgijsko beloplavo govedo, charolais). Uspešnost osemenitev ocenjujejo s podatkom o deležu plemenic, ki do 90. dne po osemenitvi niso bile ponovno osemenjene (non return 90).

Preglednica 1: Uspeh osemenitev (non-return (NR) na 90 dni) po pasmah bikov v ljubljanski regiji od 1.1.2004 do 30.10.2004 (Poročilo o delu Osemenjevalnega centra Preska v letu 2004, 2005).

pasma	NR v %
rjava	69,1
lisasta	69,2
črno-bela	59,8
mond beliar	66,6
rdeče cikasta	79,6
mesne	69,5
skupaj	67,5

2.4 POSTOPEK PRIDOBITVE SEMENA

Pri odvzemu semena bik dajalec semena skoči na drugega bika, ki stoji fiksiran v stojnici. Seme se odvzema v segreto umetno vagino, ki ima na koncu epruveto, v katero steče ejakulat. Epruveta se takoj označi z imenom bika in uro skoka. V dnevni protokol odvzema semena se zabeleži zaporedna številka skoka v letu, ime, rodovniška številka bika, pasma, ura odvzema, dnevni skok, količina, koncentracija, valovanje in gibanje semenčic v odstotkih. Seme mora ustrezati Pravilniku o pogojih oploditvene sposobnosti semena domačih živali (2005).



Slika 2: Odvzem semena (arhiv Osemenjevalnega centra Preska)

2.5 OCENE KAKOVOSTI SVEŽEGA SEMENA

Takoj, ko pride epruvetka z ejakulatom v laboratorij, laborant izvede makroskopski pregled semena.

2.5.1 Makroskopski pregled semena

Makroskopski pregled zajema:

- volumen, ki naj znaša najmanj 2 ml,
- barva naj bo slonokoščena, rumenkasta ali mlečna,
- konzistenca kot mleko,
- vonj je vrstno specifičen,
- pH: 6,5 – 6,9

pH vpliva na presnovo v moški spolni celici in s tem vpliva na ohranitev oploditvene sposobnosti semenčice (Lake in Ravie, 1979).

Makroskopskemu pregledu sledi mikroskopski pregled semena.

2.5.2 Mikroskopski pregled semena

Po Pravilniku o pogojih oploditvene sposobnosti semena domačih živali (2005) je kakovost semena primerna če je:

- progresivna gibljivost semenčic najmanj 70 %,
- gostota: 0,6 milijona semenčic v mm^3 ,
- valovanje: dobro,
- delež mrtvih semenčic: do 20 %,
- delež patoloških semenčic: do 20 %.

2.5.3 Supravitalno barvanje bikovih semenčic

Za supravitalno barvanje bikovih spolnih celic potrebujemo sveže nativno seme, eosin in nigrosin. Po navodilih Pavšiča (1963a) eno kapljo semena zmešamo z dvema kapljama 5 % raztopine eosina in dodamo večjo kapljo 10 % vodne raztopine nigrosina. Vse skupaj premešamo. Iz te mešanice naredimo razmaz, podobno kot s krvjo. Žive semenčice so neobarvane, mrtve pa so rdeče z rjavkasto škrlatnim ozadjem. Semenčice, ki imajo pol pobarvano glavo štejemo k rdečim. Pomembno je, da so seme, barva in vsa steklovina enake temperature, sicer se pojavijo artefakti. Supravitalno barvanje nam služi za morfološko oceno in za oceno deleža nezrelih semenčic v ejakulatu.

2.6 RAZREDČEVANJE SEMENA

Nativno seme ustrezne kakovosti 10 minut po odvzemu razredčimo v razmerju 1:1 razredči se s komerciano izdelanim razredčevalcem za razredčevanje bikovega semena. Razredčevalec mora biti segret na 29 °C. V naslednjih 80. minutah razredčenemu semenu še dvakrat ali trikrat dodamo na sobno temperaturo segret razredčevalec (v razmerju 1:1), dokler ne dosežemo končne razredčitve. Končno razredčitev semena določimo na podlagi volumna in števila semenčic v ejakulatu, v 0,5 ml slamici pa mora biti najmanj 40 milijonov semenčic, od tega najmanj 20 milijonov progresivno gibljivih (Snoj, 2004).

Najmanj 90 minut po odvzemu seme še enkrat pregledamo. Kakovost razredčenega semena mora ustrezati Pravilniku o pogojih oploditvene sposobnosti semena domačih živali (2005), drugače seme zavržemo.

Seme z uporabo polnilke za seme polnimo v slamice z volumnom 0,5 ml. Slamica predstavlja dozo za osemenjevanje. V eni slamici mora biti po zahtevah Osemenjevalnega centra Preska minimalno 40 milijonov progresivno gibljivih semenčic. Polnjenje slamic poteka pri sobni temperaturi. Na vsaki slamici mora biti natisnjeno ime bika, pasma, rodovniška in življenjska številka plemenjaka, serija proizvodnje semena (dan v letu), kraj in registrska številka osemenjevalnega centra, kjer je bilo seme proizvedeno. Seme v slamicah nato zavijemo v termo izolacijsko tkanino in položimo v hladilno skrinjo, ohlajeno na 4 °C. Temperatura

semena se mora postopno zniževati s sobne na temperaturo skrinje. Seme mora biti izpostavljeno temperaturi 4 °C najmanj tri ure. V tem času poteče promet snovi med celico in razredčevalcem na molekularnem nivoju (čas ekvilibracije), kar semenčicam omogoči preživetje ob zamrzovanju (Snoj, 2004).

Pomembna je sestava razredčevalca in njegov vpliv na obnašanje celic v procesu hlajenja in zamrzovanja (Sukhato in sod., 2001).

Sledi globoko zamrzovanje. Slamice s semenom naložimo v za to pripravljene posode (gobeje) in potopimo v tekoči dušik. Po določenih pravilnika mora zamrznjeno seme čakati 30 dni v karanteni. Če se v tem času pri živali dajalki semena ne pojavi kužna bolezen ali sum na kužno bolezen, je seme z zdravstvenega stališča primerno za uporabo. V času karantene je treba preveriti tudi kakovost semena (Snoj, 2004).

2.7 KRIOGENA POSODA

Danes so na trgu dostopne kriogene posode različnih proizvajalcev. Kriogene posode se med seboj razlikujejo po velikosti in prostornini, številu kanistrov, materialu iz katerega so kanistri narejeni (plastika, kovina), številu nivojev za gobeje, obliki in barvi emajla. Pri osemenjevalcih v Sloveniji največkrat srečamo kontejnerje francoskega proizvajalca Air Liquide in ameriškega proizvajalca Taylor-Wharton.

Kriogena posoda je narejena iz aluminijaste notranje in zunanje posode. Posoda je na notranji strani izolirana z večplastnim izolacijskim materialom, prav tako pa je tudi vakuumsko izolirana (Navodila za uporabo kriogenih posod).

V posodi je nameščenih največkrat šest plastičnih ali kovinskih kanistrov, ki jih lahko dvignemo in zatakemo na vrat kontejnerja. V vsak kanister lahko vstavimo gobelet, v katerem hranimo doze semena. Kontejner pokriva pokrov, ki preprečuje hitro izhlapevanje dušika (The GT range, 2003).

Znano je, da večje kriogene posode zadržujejo nizko temperaturo dalj časa. V Avstraliji so primerjali kako vpliva temperatura okolja na prostornino (volumen posode) in temperaturo

(v posodi). Raziskava je pokazala, da so večji kontejnerji manj občutljivi na različne (skrajne) zunanje temperature, kot kontejnerji z manjšo prostornino. Večji kontejnerji se namreč počasneje segrevajo in s tem omogočajo optimalne pogoje za seme dalj časa (Effect of ambient temperature..., 2005).

2.7.1 Znaki, ki nakazujejo, da kriogena posoda ni več uporabna

Če pride do mehanske poškodbe in se posoda popolnoma zasneži, pomeni, da ni več vakuumske izolacije med stenami posode in da tekoči dušik hitro izhlapeva. Če so v posodi shranjeni biološki preparati, jih je potrebno nemudoma preseliti v drugo posodo. Če pa se pojavijo sledi ledu oziroma snega le na nekaterih manjših mestih, je potrebno preveriti porabo tekočega dušika v posodi v naslednjih dneh in preveriti, če posoda ni mehansko poškodovana. V primeru močnejših in hitrih poškodb posode oziroma hitrega poslabšanja lastnosti posode ne uporabljamo več (Navodila za uporabo kriogenih posod).

2.8 POSTOPEK TAJANJA GLOBOKO ZAMRZNJENEGA SEMENA

Seme se odtaja tako, da dozo semena vzamemo iz kriogene posode, v kateri je seme shranjeno v tekočem dušiku. Dozo semena primemo s peanom ali pinceto ter jo takoj potopimo v vodno kopel na 37,5 °C za 15 sekund. Slamico po 15. sekundah vzamemo iz vodne kopeli in jo obrišemo z bombažno krpo ali papirnato brisačo. Odtajana doza semena je primerna za osemenitev ali nadaljnje laboratorijske preiskave (Snoj, 2004).

Pravilna metoda odtajanja je pomembna za ohranitev gibljivosti in oploditvene sposobnosti semenčic. Vse kaže, da odtajanje in procesiranje semena pri temperaturi 37 °C prepreči nastop osmotskega šoka in ohrani celično membrano semenčic celo. Ob 37 °C je membrana celice bolj tekoča, kot pri nižjih temperaturah. To pomeni, da je difuzija intracelularnega glicerola (razredčevalec) pri tej temperaturi hitrejša in bolj učinkovita pri zaščiti celične membrane (Correa in sod., 1996).

Glede na čas odtajanja in temperaturo, pri kateri začnemo seme odtajati, so bili doseženi boljši rezultati pri odtajanju na višji temperaturi za manj časa. Kot primer: gibljivost in preživetvena

spodobnost celic je boljša pri odtajanju na 60 °C za 15 sekund, kot pri 40 °C za 1 minuto (Dhami in sod., 1996).

Na osemenjevalnih centrih v Sloveniji redno preverjajo kakovost (odstotek progresivno gibljivih semenčic po odtajanju) globoko zamrznjenega bikovega semena. Po določitih Pravilnika o pogojih oploditvene sposobnosti semena domačih živali (2005), je potrebno pred izdajo semena po eno dozo vsake serije vsakega bika pregledati na delež progresivno gibljivih semenčic. Analizo opravimo z računalniško obdelavo mikroskopske slike, ki jo omogoča CMA (Cell Motion Analyser). CMA računalniški program nam izračuna odstotek progresivno gibljivih semenčic. Takoj po odtajanju (po zgoraj opisanem postopku) mora biti v vzorcu najmanj 50 % progresivno gibljivih celic. Če rezultat ne ustreza določilom pravilnika, je potrebno pregledati še eno slamico semena. Če je rezultat ponovno neustrezen, celo serijo semena določenega bika zavržemo. Če rezultat po prvi ali drugi meritvi ustreza določilom omenjenega pravilnika, se vzorec odtajanega semena za 24 ur shrani v hladilniku pri temperaturi 4 do 8 °C in ponovno pregleda (Müllerjev rezistenčni test). Da je seme uporabno, mora biti v vzorcu najmanj 40 % progresivno gibljivih semenčic. Če ne ustreza zahtevam pravilnika, odtajamo in pregledamo še eno slamico, ki jo za 24 ur shranimo v hladilniku in ponovno pregledamo. Če ne ustreza določilom pravilnika, seme celotne serije določenega bika zavržemo, če pa ustreza pravilniku, je seme primerno za skladiščenje oziroma za izdajo. Seme skladiščimo v velikih kriogenih posodah. Te posode se nahajajo v posebnem prostoru – skladišču. Poskrbeti je potrebno za evidenco, kje v posodi se seme določenega bika nahaja in za optimalen nivo tekočega dušika v posodi (Snoj, 2004).

2.9 TAJANJE SLAMIC Z GLOBOKO ZAMRZNJENIM BIKOVIM SEMENOM NA TERENU, PRI POSTOPKU UMETNEGA OSEMENJEVANJA KRAV IN TELIC

Pripravimo posodo s toplo vodo (35 do 39 °C), v katero lahko potopimo celo slamico. Temperaturo vode kontroliramo s termometrom. Posodo s slamico z globoko zamrznjenim semenom želenega bika (kanister) dvignemo v vrat kontejnerja tako, da slamice ne segajo iz njega. Če traja postopek pri odvzemu dlje časa, kanister na dovoljeni višini pritrdimo in nato opravimo, kar smo želeli. Izbrano slamico primemo s pinceto in jo vzamemo iz kanistra. Kanister nato takoj, vendar počasi, spustimo nazaj v kontejner. Izbrano slamico nekajkrat rahlo otresemo, tako da je konec s spodnjim dvojnimi čepom obrnjen navzdol. S tem iz praznega dela med vrhom slamice in začetkom čepa odstranimo ostanke tekočega dušika. Otreseno slamico čimprej spustimo v toplo vodo (35 do 39 °C), kjer jo pomikamo sem ter tja, da se seme enakomerno odtaja. Po 13. do 15. sekundah jo vzamemo ven in osušimo s čistim papirjem ali brisačo. Ponovno se prepričamo, da smo res odtajali seme želenega bika (Šketa, 2000).

Globoko zamrznjeno bikovo seme je možno tajati tudi v ledeni vodi. V posodo z vodovodno vodo damo nekaj kosov ledu in počakamo, da se voda ohladi. V ledeno vodo damo slamico, po okoli 6 minutah je pripravljena za uporabo. V ledeni vodi lahko odtajano seme prenesemo tudi v hlev. Ta način je priporočljiv pri zelo nizkih oziroma visokih zunanjih temperaturah, da ne pride do ponovne ohladitve oziroma pregrevanja odtajanega semena (Šketa, 2000).

S prepogostim, še posebej pa previsokim dvigovanjem kanistra s semenom iz kontejnerja se skrajšuje življenjska doba semena pa tudi slamice pogosteje pokajo. Poškodovane slamice in tiste z nečitljivim napisom vrnemo proizvajalcu semena. Odtajano bikovo seme moramo takoj uporabiti. Pred ohladitvijo ga zaščitimo tako, da slamico zavijemo v papirnato brisačo ali damo pod obleko. Zamrznjeno goveje seme je bolj občutljivo na temperaturne spremembe pred odtajanjem kot potem, ko je že odtajano (Šketa, 2000).

V ZDA so izvedli raziskavo v kateri so primerjali učinek temperature na preživitveno sposobnost bikovih semenčic pred in po odtajanju. V prvem poskusu so zamrznjene doze semena izpostavili na 22,5 °C in -18 °C za 1,2,3,4 in 5 minut. V drugem poskusu pa so seme

dali na 20 °C in 5 °C za 3 minute. Na koncu so vse doze semena iz prvega in drugega poskusa dali v vodno kopel na 37 °C. Istočasno so izvedli tudi kontrolni poskus, tako da so dozo zamrznjenega semena takoj dali v vodno kopel na 37 °C. V obeh primerih so ugotovili da je akrosom (celost akrosomalne membrane) bolj občutljiv (prizadet), kot sama gibljivost semenčic. V poskusu so ugotovili, da so razredčeno in globoko zamrznjeno bikovo seme bolj občutljivo na nihanje temperature pred in med odtajanjem, kot po odtajanju (DeJarnette in sod., 2000).

3 MATERIAL IN METODE DE LA

Poskus o vplivu sprememb v temperaturi ob skladiščenju globoko zamrznjenega semena bikov v kriogeni posodi na kakovost odmrznjenega semena smo izvedli na Osemenjevalnem centru Preska, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Cesta v Bonovec 1, 1250 Medvode.

Na osemenjevalnem centru Preska redijo in izkoriščajo v povprečju 40 do 45 plemenjakov, odvisno od programa vključevanja bikov v osemenjevanje in programa izločanja bikov.

Pripravljajo globoko zamrznjeno seme bikov rjave, črnobelega in mesnih pasem. Te bike vsako leto potrjuje Republiška delovna skupina za odbiro plemenskih bikov za posamezne pasme.

3.1 BIKI

Za poskus smo uporabili seme štirih bikov črnobelega pasme.

Biki, ki so bili vključeni v poskus, so potomci bikovskih mater (elitnih krav), ki so bile osemenjene s semenom elitnih bikov (večinoma je seme iz drugih, živalorejsko razvitih držav). Biki so bili približno enako stari, starostna razlika med njimi je manj kot štiri mesece. Na osemenjevalnem centru so do začetka našega poskusa opravili približno isto število skokov. V času izvedbe poskusa so bili v razredu čakajočih bikov.

3.1.1 Bik 1

Bik 1 je bil star 30 mesecev. Je potomec bika ameriške linije. Pri zadnjem merjenju je bil v vihru visok 155 cm in je tehtal 760 kg (Katalog bikov, 2005). Do poskusa je na osemenjevalnem centru opravil 150 skokov. Za osemenjevanje je bilo izdanih 1363 doz njegovega semena (Arhiv podatkov, 2005).

3.1.2 Bik 2

Bik 2 je bil prav tako kot bik 1 star 30 mesecev. Njegov oče prihaja iz ZDA. Ob licenciranju je tehtal 772 kg in je meril v vihru 152 cm (Katalog bikov, 2005). Na osemenjevalnem centru je

do poskusa opravil 150 skokov. Za osemenjevanje je bilo izdanih 866 doz njegovega semena (Arhiv podatkov, 2005).

3.1.3 Bik 3

Bik 3 je bil star 33 mesecev. Je polbrat bika bika 2 po očetu. Na dan licenciranja je tehtal 790 kg in je meril v vihru 152 cm (Katalog bikov, 2005). Na osemenjevalnem centru je do poskusa opravil 179 skokov. V preteklem letu je bilo za osemenjevanje izdanih 1007 doz njegovega semena (Arhiv podatkov, 2005).

3.1.4 Bik 4

Bik 4 je bil star 29 mesecev. Ob licenciranju je tehtal 775 kg in dosegel višino vihra 145 cm (Katalog bikov, 2005). Do poskusa je na osemenjevalnem centru opravil 156 skokov. Za osemenjevanje je bilo izdanih 1059 doz njegovega semena (Arhiv podatkov, 2005).

3.2 RAZREDČEVALEC

Na osemenjevalnem centru uporabljajo komercialni razredčevalec Andromed. Razredčevalec Andromed je proizvod nemškega podjetja Minitub. Ne vsebuje jajčnega rumenjaka in nima dodanih nobenih snovi živalskega izvora. V razredčevalcu so antibiotiki.

V času ekvilibracije (seme v pajetah je v hladilni skrinji na +4 °C) snovi iz razredčevalca prodro v semenčice. Antibiotiki uničijo morebitne bakterije, glicerol pa omogoči intaktnost celične membrane med zamrzovanjem. Razredčevalec na osemenjevalnem centru uporabljajo v skladu z navodili proizvajalca.

3.3 KRIOGENA POSODA

Uporabili smo kriogeno posodo francoskega proizvajalca Air Liquide, model GT7.

Splošni podatki za kriogeno posodo GT 7:

- uporabna prostornina je 7,1 l,
- premer vratu posode je 50 mm,
- teža prazne posode je 7,2 kg,
- teža polne posode je 12,9 kg,
- zunanji premer posode je 308 mm,
- celotna višina posode je 480 mm,
- dnevno izhlapevanje dušika je 0,11 l/dan (podatek je podan pri temperaturi 20 °C in tlaku 1013 mb). Pri enakih pogojih velja, da posoda v mirujočem stanju zadrži ustrezne pogoje 65 dni,
- čas, ko posoda na terenu (dinamično stanje) zadržuje ustrezne pogoje je 41 dni (podana vrednost je odvisna od časa polnjenja),
- največje število kanistrov v posodi je 6,
- uporabljeni so lahko plastični (v našem poskusu) ali kovinski kanistri,
- premer kanistra je 38 mm,
- višina kanistra je 120 mm,
- število nivojev (stopenj) gobeletov v kanistru je 1,
- največje število 0,25 ml slamic je 1560,
- največje število 0,50 ml slamic je 720

(The GT range, Air Liquide).

Posoda mora biti polnjena, vzdrževana in uporabljena po navodilih proizvajalca.

3.4 TEKOČI DUŠIK

Osemenjevalnemu centru Preska tekoči dušik dostavlja podjetje Messer Slovenija. Tekoči dušik pripeljejo z avtocisterno. Po specifikaciji je tekoči dušik 99,999 vol. %. Od nečistoč vsebuje: kisik <2,0 vpm, vlaga <3,0 vpm in ogljikovodiki <0,1 vpm (specifikacija tekočega dušika Messer).

3.5 OCENE KAKOVOSTI SVEŽEGA SEMENA

Ritem odzema semena je bil za vse štiri bika v poskusu enak. Seme smo jim jemali enkrat do dvakrat na teden. Na dan odzema je vsak bik skočil dvakrat, njegova ejakulata pa smo v laboratoriju združili.

Vrednosti za oceno lastnosti svežega semena smo takoj po pregledu ejakulata zapisali v poseben protokol za dnevni odvzem semena.

V dnevni protokol najprej zapišemo **ime bika in njegovo rodovniško številko**, nato **število dnevnih zaporednih skokov**. Kakovost svežega (nativnega) semena podajamo s sledečimi parametri:

-količino semena odčitamo na skali, ki je natisnjena na epruveti. Volumen (količino) semena vedno podajamo v ml,

-koncentracijo semena smo izmerili z laboratorijskim fotospektrometrom,

-valovanje smo ocenili subjektivno, tako da smo vzorec semena opazovali pod mikroskopom (20 x povečava). Stopnja gibljivosti se kaže v valovih, ki so posledica aktivnosti semenčic in nastopajo zaradi masovnega gibanja semenčic.

Valovanje semena smo ocenili po stopnjah:

stopnja 1-brez gibljivosti,

stopnja 2-slaba gibljivost,

stopnja 3-dobra gibljivost brez valovitega gibanja,

stopnja 4-valovito gibanje,

stopnja 5-močno valovito gibanje.

-gibanje izražamo v odstotkih. Ocena je subjektivna in podaja odstotek progresivno gibljivih semenčic.

-končna razredčitev se vedno določa v ml. Končno razredčitev smo izračunali iz gostote in količine ejakulata. V dozi semena smo zagotovili okrog 40 milijonov semenčic.

Preden smo razredčeno seme polnili v slamice, smo ga še enkrat pregledati in še enkrat določili **odstotek progresivno gibljivih semenčic po razredčitvi**.

3.6 IZVEDBA POSKUSA

Štirim bikom črnobelega pasme smo z umetno vagino odvzeli seme. Takoj po tem smo seme pregledali in določili njegovo količino, koncentracijo in delež progresivno gibljivih semenčic nativnega in razredčenega semena. Z metodo supravitalnega barvanja celic smo določili odstotek vitalnih semenčic v ejakulatu vsakega bika.

Seme smo embalirali v 0,5 ml slamice in ga po rutinskem postopku globoko zamrznili. Po 125 slamic semena vsakega bika smo navpično položili v kriogeno posodo GT7 (proizvajalec Air Liquide), ki je bila napolnjena s tekočim dušikom. Dušik je dnevno hlapel in njegov nivo se je nižal. Z merjenjem smo začeli, ko je dušik segal do vrha slamic. Vsakih 24 ur smo izmerili nivo dušika (v cm) in temperaturo na vrhu in na dnu kanistra, v katerem je bilo seme. Vsak dan smo iz kriogene posode vzeli po 5 slamic od vsakega bika, jih po predpisanem postopku odtajali in določili progresivno gibljivost semenčic. Progresivno gibljivost semenčic v vzorcih smo določili takoj po odtajanju in po 24 urah (Millerjev rezistenčni test). Določitev progresivne gibljivosti semenčic smo izvedli z računalniško obdelavo mikroskopske slike, ki jo omogoča računalniški program CMA (Cell Motion Analyser).

Odtajanje doz semena in ocene kakovosti smo ob ponavljanju meritev temperature in merjenja nivoja dušika v posodi ponavljali 22 dni, ko ocene kakovosti semena niso več ustrezale Pravilniku o pogojih oploditvene sposobnosti semena domačih živali (2005) v RS.

3.7 ODTAJANJE IN OCENA KAKOVOSTI ODTAJANEGA SEMENA

Globoko zamrznjeno seme bikov smo odtajali v vodni kopeli, na 37,5 °C. Vsak dan poskusa smo 5 slamic semena vsakega bika eno po eno prijeli s pinceto ali peanom in jo iz kriogene posode takoj dali v vodno kopel. Po 15. sekundah smo odtajano slamico obrisali do suhega in jo na zgornjem delu odrezali (tik nad nivojem semena). Zgoraj odrezani slamici smo odrezali še spodnji del (čep). Seme je izteklo v plastično epruvetko za enkratno uporabo. Na segreto predmetno stekelce (prilagojeno obdelavi s CMA programom) smo kanili kapljico odtajanega semena in jo pokrili s krovnim stekelcem. Preparat smo pogledali pod mikroskopom (200x povečava z negativnim faznim kontrastom). Epruvetko s semenom in ostankom slamic smo dali za 24 ur v hladilnik na 4 °C. Naslednji dan smo epruvetke ponovno segreli na 37,5 °C. V kapljici semena iz epruvetke smo po zgoraj opisani metodi zopet določili progresivno gibljivost semenčic.

Kakovost semena po odmrzovanju smo ocenjevali z računalniškim programom CMA (Cell Motion Analyser), ki je proizvod podjetja MTM, Switzerland. Kamera omogoča da je mikroskopska slika vidna na računalniškem zaslonu. Računalnik poda vrednost za odstotek progresivno gibljivih semenčic.

3.8 STATISTIČNA ANALIZA

Za statistično analizo izmerjenih vrednosti o progresivni gibljivosti semenčic neposredno po odtajanju in po 24-tih urah hranjenja pri 4 °C smo podatke razdelili v štiri skupine:

- obdobje od 1. do 14. dne poskusa, ko je bil v kriogeni posodi nivo tekočega dušika še 0,1 cm.
- obdobje od 15. do 18. dne posode v katerem v kriogeni posodi tekočega dušika ni bilo več.
- obdobje od 1. do 18. dne poskusa; v tem obdobju je bila temperatura pod -130 °C (progresivna gibljivost semenčic v vzorcih semena vseh bikov takoj po odtajanju še nad 50 %).

- obdobje od 19. do 22. dne poskusa; temperatura se dvigne nad $-101\text{ }^{\circ}\text{C}$ (v tem obdobju je pri vseh štirih bikih delež progresivno gibljivih semenčic v odtajanih dozah semena padel pod 50 %. Zadnji dan poskusa v odtajanih dozah semena ni bilo več progresivno gibljivih semenčic).

Za lastnost delež progresivno gibljivih semenčic izmerjeno v dozah semena takoj po odtajanju in 24 ur po tem (od 1. do 18. dne, od 1. do 14. dne, od 15. do 18. dne in od 19. do 22. dne poskusa), smo z analizo variance razlik med aritmetičnimi sredinami za obravnavano lastnost (ANOVA, enosmerna klasifikacija, dvostranska alternativna domneva, F-test; Snedecor in Cochran, 1989), preverili naslednje vplive:

- vpliv živali (bik 1..4);
- vpliv zaporedne meritve (1.-14. dan vs. 15.-18.dan in 1.-18. dan vs. 19.-22. dan);
- vpliv časovnega intervala odtajanja (neposredno po odtajanju vs. 24 ur po tem).

Pri vseh analizah smo upoštevali vpliv kot statistično značilen ($p < 0,05$), kot težnjo ($p < 0,10$) ali kot statistično neznačilen ($p > 0,10$).

4 REZULTATI

4.1 TEMPERATURA V KRIOGENI POSODI

Preglednica 2 prikazuje rezultate meritev nivoja tekočega dušika in temperatur v kriogeni posodi. V posodo smo natočili 7 cm tekočega dušika. To je višina, ki sega do zgornjega roba kanistra s semenom v slamicah. V isti posodi smo najprej merili obe vrednosti brez dodanih doz semena v kanistre in nato z dodanimi dozami semena.

Preglednica 2: Prikaz nivoja dušika in temperature v kriogeni posodi po dnevih pri poskusu, ki je bil izveden brez semena in pri poskusu s semenom v kanistrih

zaporedna meritev (dan)	poskus brez semena		poskus s semenom		
	nivo N ₂ (cm)	T (°C) spodaj	nivo N ₂ (cm)	T (°C) zgoraj	T (°C) spodaj
1	7,0	-186,2	7,0	-191,0	-194,7
2	5,5	-188,5	6,8	-191,0	-194,2
3	4,4	-188,5	6,2	-189,6	-191,0
4	3,7	-188,5	5,5	-189,3	-190,8
5	3,3	-187,8	5,3	-188,4	-190,7
6	2,9	-187,3	5,0	-189,0	-189,4
7	2,0	-188,0	4,7	-188,0	-190,0
8	1,5	-187,3	3,5	-187,2	-189,0
9	1,0	-187,2	3,3	-187,2	-189,1
10	0,1	-185,0	2,8	-187,0	-189,0
11	0,0	-173,8	2,3	-187,0	-189,1
12	0,0	-134,8	1,9	-186,8	-189,0
13	0,0	-106,2	1,2	-185,0	-188,4
14	0,0	-83,2	0,1	-176,3	-180,0
15	0,0	-52,4	0,0	-147,1	-150,0
16	0,0	-29,3	0,0	-141,0	-144,0
17	0,0	-9,2	0,0	-130,2	-131,0
18	0,0	5,3	0,0	-130,0	-133,0
19	0,0	12,5	0,0	-101,1	-103,1
20	0,0	16,7	0,0	-76,1	-77,3
21	0,0	19,2	0,0	-45,3	-45,6
22	0,0	19,8	0,0	-25,0	-25,3

V posodi brez semena se je količina dušika zniževala za 0,4 do 1,5 cm na dan, 11. dan v posodi ni bilo več tekočega dušika. V posodi s semenom v kanistrih se je nivo dušika zniževal počasneje (od 0,2 do 1,1 cm na dan), ves tekoči dušik je izhlapel 15. dan, štiri dni kasneje, kot v posodi brez semena. Verjetno je masa semena v posodi vplivala na izhlapevanje tekočega dušika. V poskusu s semenom v kanistrih smo merili temperature na zgornjem in spodnjem robu kanistra, ki je bil položen na tla posode. Razlike v temperaturah zgoraj in spodaj izmerjene na isti dan tekom poskusa niso bile velike. Na zgornjem robu kanistra so bile do 18. dne poskusa za 0,4 do 3,7 °C nižje, kot na spodnjem robu. Po 18. dnevu poskusa so se razlike zmanjšale do 0,3 °C 22. dan poskusa. Temperatura na dnu posode je bila v poskusu brez semena na začetku – 186,2 °C 10. dan, ko je bilo v posodi še 0,1 cm tekočega dušika pa še vedno – 185,0 °C. Enajsti dan poskusa se je temperatura dvignila za 11,2 °C, 12. dan za 39,0 °C in do 17. dne poskusa, ko se je temperatura dvignila na – 9,2 °C za 20,1 do 30,8 °C na dan. 18. dan poskusa je bila temperatura nad 0 °C (5,3 °C). V poskusu s semenom je bila temperatura na dnu posode prvi dan – 194,7 °C, 14. dan, ko je bilo v posodi še 0,1 cm tekočega dušika, pa še vedno -180,0 °C. Petnajsti dan se je temperatura dvignila za 30,0 °C. Do 18. dne se je temperatura dvigovala počasi, šele po 19. dnevu hitreje. Tudi ob koncu poskusa je bila v posodi temperatura še vedno pod lediščem (- 25,3 °C). Razlike v vrednosti med temperaturami v prazni posodi in v posodi s kanistri in semenom nastanejo verjetno zaradi mase semena, ki zadržuje zviševanje temperature v kanistru.

4.2 KAKOVOST SVEŽEGA SEMENA

Preglednica 3 prikazuje ocene kakovosti vseh ejakulatov. Vsi štirje biki so v poskusu skočili (ejakulirali) dvakrat. Povprečen volumen prvih ejakulatov je bil 3,95 ml (od 2,4 do 5,4 ml) in drugih 5,85 ml (od 4,2 do 8,4 ml). Pri vseh bikih je bil volumen ejakulata večji v drugem skoku. Obratno pa je bilo s koncentracijo semenčic v ejakulatih.. Povprečna koncentracija semenčic v prvem ejakulatu je bila $1,45 \times 10^9/\text{ml}$ (od $1,18$ do $1,71 \times 10^9/\text{ml}$) in v drugem $0,95 \times 10^9/\text{ml}$ (od $0,50$ do $1,25 \times 10^9/\text{ml}$). Bik 4 je imel v obeh ejakulatih primerljiv volumen in primerljivo koncentracijo semenčic. Volumen ejakulata in koncentracija semenčic sta primerljiva s podatki, ki jih navajajo Orešnik in sod. (1984) za bika črnobelega pasme na osemenjevalnem centru Preska v letu 1983. Tega leta je bil povprečen volumen ejakulata 3,80 ml, koncentracija je bila $1,15 \times 10^9/\text{ml}$, povprečno število semenčic v ejakulatu je bilo $4,37 \times 10^9$. Bik 1 je na dan poskusa ejakuliral $18,37 \times 10^9$ semenčic, bik 4 $13,33 \times 10^9$, bik 3 $9,06 \times 10^9$ in bik 2 $5,70 \times 10^9$. Ocena valovanja je bila najslabša (3 in 2) pri biku 2 z najmanjšim skupnim volumnom ejakulatov in z najredkejšim semenom in najboljša pri biku 1 z najboljšima vrednostima. Ta bik je imel tudi največji delež vitalnih semenčic po supravitalnem barvanju (76 %). Najmanjši delež vitalnih semenčic je bil v ejakulatih bika 4 (68 %). Ocene gibljivosti semenčic v svežem in razredčenem semenu (70 in 75 %) opisujejo dobro kakovost semena, ki smo ga uporabili za poskus. V globoko zamrznjeni dozi razredčenega semena je bilo pri biku 1 $40,8 \times 10^6$ semenčic, pri biku 2 $35,6 \times 10^6$, pri biku 3 $43,2 \times 10^6$ in pri biku 4 $41,6 \times 10^6$ semenčic.

Preglednica 3: Lastnosti svežega semena

bik	dnevni skok	količina semena (ml)	Koncen- tracija (x10 ⁹ /ml)	skupno število semenčic v ejakulatu (x 10 ⁹)	valovanje (stopnja gibljivosti)	progresivno gibanje semenčic (%)	končna razredčitev (ml)	progresivno gibanje semenčic (%) po razredčitvi	% vitalnih semenčic pri supra- vitalnem barvanju
bik 1	1	4,6	1,71	7,87	4	75	225	75	76
	2	8,4	1,25	10,50	4	75			
bik 2	1	2,4	1,50	3,60	3	70	80	70	72
	2	4,2	0,50	2,10	2	75			
bik 3	1	3,4	1,40	4,76	4	75	105	75	74
	2	5,0	0,86	4,30	3	75			
bik 4	1	5,4	1,18	6,37	3	70	160	70	68
	2	5,8	1,20	6,96	3	75			

4.3 PROGRESIVNA GIBLJIVOST SEMENČIC PO ODTAJANJU

Tekom poskusa smo vsak dan odtajali po pet slamic od vsakega bika. Izmerili smo progresivno gibljivost semenčic takoj po odtajanju, doze shranili v hladilniku pri 4 °C 24 ur in ponovno izmerili progresivno gibljivost semenčic. Tekom poskusa smo za seme vsakega bika zbrali 220 podatkov (skupaj 880). V preglednici 4 so predstavljene izračunane povprečne vrednosti meritev v semenu iz petih slamic. Kot neuporabno ocenjujemo po določilih Pravilnika o pogojih oploditvene sposobnosti semena domačih živali (2005) seme, pri katerem dva dni zapored delež progresivno gibljivih semenčic neposredno po odtajanju ne doseže 50 % in je po 24 urah na 4 °C pod 40 %.

Pri vseh bikih so se med poskusom že pred 19. dnem poskusa pojavile enkratne meritve z vrednostjo pod 50 %, pri biku 1 15. in 17. dan, pri biku 2 8. in 13. dan, pri biku 3 13. dan in pri biku 4 15. in 18. dan. Naslednji dan so bile vrednosti spet nad 50 %. V tem obdobju pri nobenem biku povprečne vrednosti za delež progresivno gibljivih semenčic niso padle pod 50 %.

Pri biku 1 je bilo seme ocenjeno kot neuporabno 19. dan poskusa, 20. dan pri bikih 3 in 4 in 21. dan poskusa pri biku 2. Temperatura na zgornjem robu kanistra je bila 19. dan poskusa -101,1 °C, 20. dan -76,1 °C in 21. dan -45,3 °C. Ko se je temperatura dvignila na -45,6 °C (21. dan) so bili vsi rezultati takoj po odtajanju in 24 ur za tem pri vseh bikih pod mejno vrednostjo. V kontejnerju od 15. dne naprej ni bilo več tekočega dušika.

4.4 OSTALA OPAZOVANJA

Tekom poskusa smo opazovali slamicice semena, ki smo jih odtajali. Opazili smo, da se je pri temperaturi $-77,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ na slamicah pojavila obloga iz drobnih belih kristalčkov. Pri temperaturi $-45,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ je bilo na slamicah teh kristalčkov manj. Naslednji dan na slamicah ni bilo več nobene obloge. Nekaj doz semena na 21. in 22. zaporedni dan (temperatura na dnu kanistra je bila med $-77,3$ in $-45,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) smo ponovno potopili v tekoči dušik ter še enkrat preverili delež progresivno gibljivih semenčic. Rezultati so pokazali, da je kakovost semena ostala nespremenjena – seme je bilo neuporabno.

4.5 STATISTIČNA ANALIZA IZMERJENIH VREDNOSTI V POSKUSU

V statistično analizo smo vključili izmerjene vrednosti za izmerjeno progresivno gibljivost semenčic v odtajanih dozah semena štirih bikov od prvega do 18. dne poskusa. Do 18. dne poskusa je bilo v odtajanem semenu vseh bikov nad 50 % progresivno gibljivih semenčic. Seme je bilo do tega dne še uporabno za osemenjevanje. Zanimalo nas je, ali v tem obdobju obstajajo razlike v progresivni gibljivosti semenčic v dozah po odtajanju med biki. V izmerjenih vrednostih deležev progresivno gibljivih semenčic po odmrznitvi in po 24-tih urah hranjenja pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ v semenu štirih bikov med biki do 18. dne poskusa statistično značilnih razlik nismo ugotovili (preglednici 5 in 6).

Do 14. dne poskusa je bil v kriogeni posodi še tekoči dušik in temperatura na dnu posode pod $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$, po tem se je temperatura v posodi dvigovala, 18. dan je bila $-130,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. V preglednicah 5 in 6 so predstavljeni izračuni, ki dokazujejo, da tudi v treh obdobjih poskusa (od 1. do 14. dan, 15. do 18. dan in 19. do 22. dan) med biki v deležih progresivno gibljivih semenčic takoj po odtajanju in po 24-tih urah hranjenja pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ nismo ugotovili statistično značilnih razlik.

Preglednica 5: Deleži progresivno gibljivih semenčic v semenu posameznih bikov po odmrznitvi v različnih časovnih intervalih

Lastnost		Bik				Vpliv živali
		1	2	3	4	F-vrednost P-vrednost
Delež progresivno gibljivih semenčic po odtajanju – od 1.–14. dne (n = 70) (%)	Povprečje	53,5	52,3	53,8	53,7	0,95 0,4154
	SD	5,0	8,5	4,7	5,5	
	KV	9,4	16,2	8,7	10,2	
	SE	0,6	1,0	0,6	0,7	
Delež progresivno gibljivih semenčic po odtajanju – od 15.–18. dne (n = 20) (%)	Povprečje	50,1	54,3	53,5	50,2	1,56 0,2050
	SD	7,8	7,0	6,6	9,4	
	KV	15,6	12,9	12,4	18,7	
	SE	1,7	1,6	1,5	2,1	
Delež progresivno gibljivih semenčic po odtajanju – skupaj od 1.–18. dne (n = 90) (%)	Povprečje	52,7	52,7	53,7	53,0	0,45 0,7151
	SD	5,9	8,2	5,1	6,6	
	KV	11,2	15,5	9,6	12,6	
	SE	0,6	0,9	0,5	0,7	
Delež progresivno gibljivih semenčic po odtajanju – skupaj od 19.–22. dne (n = 20) (%)	Povprečje	26,9	33,5	28,0	28,1	0,34 0,7988
	SD	21,9	24,8	22,4	21,6	
	KV	81,5	74,1	80,2	77,0	
	SE	4,9	5,5	5,0	4,8	

Preglednica 6: Deleži progresivno gibljivih semenčic v semenu posameznih bikov 24 ur po odtajanju v različnih časovnih intervalih

Lastnost		Bik				Vpliv živali
		1	2	3	4	F-vrednost P-vrednost
Delež progresivno gibljivih semenčic – 24 h po odtajanju – od 1.–14. dne (n = 70) (%)	Povprečje	46,9	46,6	48,3	49,0	1,64 0,1812
	SD	4,7	9,9	6,4	7,2	
	KV	10,1	21,2	13,3	14,6	
	SE	0,6	1,2	0,8	0,9	
Delež progresivno gibljivih semenčic – 24 h po odtajanju – od 15.–18. dne (n = 20) (%)	Povprečje	46,6	51,2	46,6	47,7	1,40 0,2486
	SD	7,2	5,5	11,2	8,2	
	KV	15,5	10,7	24,0	17,1	
	SE	1,6	1,2	2,5	1,8	
Delež progresivno gibljivih semenčic – 24 h po odtajanju – od 1. do 18. dne (n = 90) (%)	Povprečje	46,9	47,7	47,9	48,7	0,91 0,4384
	SD	5,3	9,2	7,7	7,4	
	KV	11,4	19,4	16,0	15,1	
	SE	0,6	1,0	0,8	0,8	
Delež progresivno gibljivih semenčic – 24 h po odmrznitvi – od 19. do 22. dne (n = 20) (%)	Povprečje	20,3	25,4	21,9	22,4	0,15 0,9273
	SD	22,3	26,6	23,3	24,9	
	KV	110,1	105,0	106,7	111,0	
	SE	5,0	6,0	5,2	5,6	

S statistično primerjavo podatkov iz meritev, opravljenih v obdobjih od 1. do 14. dne in od 15. do 18. dne, smo ugotovili, da razlike med biki v progresivni gibljivosti semenčic takoj po odtajanju in 24 ur po tem med obdobjema niso statistično značilne (preglednica 7).

Preglednica 7: Delež progresivno gibljivih semenčic bikov po časovnih intervalih zaporednih meritev

Lastnost		Časovni interval		Vpliv časovnega intervala
		1.–14. dan (n = 280)	15.–18. dan (n = 80)	F-vrednost p-vrednost
Delež progresivno gibljivih semenčic po odtajanju (%)	Povprečje	53,3	52,0	2,45 0,1180
	SD	6,1	7,9	
	KV	11,5	15,1	
	SE	0,4	0,9	
Delež progresivno gibljivih semenčic 24 ur po odtajanju (%)	Povprečje	47,7	48,0	0,09 0,7611
	SD	7,3	8,3	
	KV	15,3	17,4	
	SE	0,4	0,9	

Temperatura na dnu posode je 19. dan dosegla – 103,1 °C, 20. dan – 77,3 °C, 21. dan – 45,6 °C in 22. dan – 25,3 °C. V tem obdobju so se vrednosti za progresivno gibljivost semenčic po odtajanju spustile pod 50 %.

Preglednica 8: Delež progresivno gibljivih semenčic v odtajanih dozah semena bikov po časovnih intervalih zaporednih meritev

Lastnost		Časovni interval		Vpliv časovnega intervala
		1.–18. dan (n = 360)	19.–22. dan (n = 80)	F -vrednost p-vrednost
Delež progresivne gibljivosti semenčic po odtajanju (%)	Povprečje	53,0	29,1	297,43 < 0,0001
	SD	6,6	22,4	
	KV	12,4	77,1	
	SE	0,4	2,5	
Delež progresivne gibljivosti semenčic 24 ur po odtajanju (%)	Povprečje	47,8	22,5	280,05 < 0,0001
	SD	7,5	23,9	
	KV	15,8	106,6	
	SE	0,4	2,7	

Iz analize podatkov, ki je predstavljena v preglednici 8 je razvidno, da so razlike v progresivni gibljivosti semenčic po odtajanju in 24 ur po tem med obdobjema 1. – 18. dan in 19. – 22. dan poskusa statistično visoko značilne. Kakovost odtajanega semena bikov, ocenjena z deležem progresivno gibljivih semenčic se je v povprečju poslabšala v obdobju po 18. dnevu poskusa. Pri biku 1 se je to zgodilo 19. dan, 21. dan pri biku 2, pri bikih 2 in 3 pa 20. dan.

Enaindvajseti dan poskusa je bilo v sveže odtajanem semenu pri posameznih bikih še 14 – 22 % progresivno gibljivih semenčic, po 24-tih urah v tem semenu ni bilo več gibljivih semenčic. Dvaindvajseti dan v semenu nobenega bika takoj po odtajanju ni bilo več gibljivih semenčic (preglednica 9).

Preglednica 9: Primerjava deležev progresivno gibljivih semenčic bikov po odmrznitvi in 24 ur po tem

Lastnost		Meritev		Vpliv meritve
		Po odtajanju	24 ur po tem	F-vrednost p-vrednost
Delež progresivno gibljivih semenčic (%) od 1. do 14. dne (n = 280)	Povprečje	53,3	47,7	96,39 < 0,0001
	SD	6,1	7,3	
	KV	11,5	15,3	
	SE	0,4	0,4	
Delež progresivno gibljivih semenčic (%) – od 15. do 18. dne (n = 80)	Povprečje	52,0	48,0	9,76 0,0021
	SD	7,9	8,3	
	KV	15,1	17,4	
	SE	0,9	0,9	
Delež progresivno gibljivih semenčic (%) skupaj od 1. do 18. dne (n = 360)	Povprečje	53,0	47,8	99,01 < 0,0001
	SD	6,5	7,5	
	KV	12,4	15,8	
	SE	0,3	0,4	

Delež progresivno gibljivih semenčic je bil v odtajanem semenu neposredno po odtajanju statistično značilno večji kot v istih dozah semena po 24. urah hranjenja pri 4 °C. V povprečju se je v 24 urah zmanjšal za 5,2 % (relativno za 9,8 %), v prvih 14. dneh za 5,6 % (10,5 %) in od 15. do 18. dne za 4,0 % (7,7 %). Sklepamo, da nivo dušika in temperatura v kriogeni posodi do 18. dne poskusa nista vplivala na preživitveno sposobnost semenčic v obdobju, ko je bilo seme po odtajanju hranjeno 24 ur pri temperaturi 4 °C.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V kriogeni posodi s semenom v kanistrih, v katero nismo dolivali tekočega dušika, se je temperatura počasi dvigovala. Šele po tem, ko v posodi ni bilo več tekočega dušika, se je le-ta dvigovala hitreje. Do 14. dne poskusa je bil v kriogeni posodi še tekoči dušik in temperatura na dnu posode pod $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$, nato se je temperatura dvigovala hitreje, 18. dan je bila zabeležena temperatura $-130,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 19. dan $-103,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20. dan $-77,3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 21. dan $-45,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 22. dan $-25,3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Razlike v izmerjenih deležih progresivno gibljivih semenčic v odtajanih dozah semena takoj po odtajanju in po 24-tih urah hranjenja pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ med posameznimi biki v vseh analiziranih obdobjih (od 1. do 18. dne, od 1. do 14. dne, od 15. do 18. dne in od 19. do 22. dne poskusa) niso bile statistično značilne.

Delež progresivno gibljivih semenčic je bil v odtajanem semenu neposredno po odtajanju statistično značilno večji ($53,0\%$) kot v istih dozah semena po 24-tih urah hranjenja pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($47,8\%$). V povprečju se je v 24-tih urah zmanjšal za $5,2\%$, v prvih 14-tih dneh za $5,6\%$ in od 15. do 18. dne poskusa za $4,0\%$. Sklepamo, da nivo dušika in temperatura v kriogeni posodi do 18. dne poskusa nista vplivala na preživitveno sposobnost semenčic takoj po odtajanju in ne po 24-tih urah hranjenja pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tudi lastnosti semena posameznega bika na preživitveno sposobnost semenčic v tem obdobju verjetno niso vplivale.

Kakovost odtajanega semena, ocenjena z deležem progresivno gibljivih semenčic se je poslabšala v obdobju po 18. dnevu poskusa, ko se je temperatura v kriogeni posodi zvišala nad $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$, pet dni po tem, ko v posodi ni bilo več tekočega dušika. V obdobju od 19. do 22. dne poskusa je bil povprečni delež progresivno gibljivih semenčic po odtajanju $29,1\%$ in 24 ur po odtajanju $22,5\%$.

Pri semenu posameznih bikov pa smo ugotovili, da se je vrednost za progresivno gibljivost semenčic znižala pod 50% pri biku 1 že 19. dan, pri bikih 3 in 4 dan kasneje (20. dan) in pri

biku 2 šele 21. dan. Pri vseh štirih bikih je delež progresivno gibljivih semenčic, izmerjen v semenu istih slamic po 24-tih urah, padel pod 40 % en dan kasneje. Kljub temu, da v deležu progresivno gibljivih semenčic po odtajanju med biki nismo ugotovili statistično značilnih razlik, bi iz te ugotovitve lahko sklepali, da lastnosti semena posameznega bika vplivajo na preživitveno sposobnost semenčic v postopku globokega zamrzovanja in odtajanja semena. Zanimivo je, da je imel bik 1 največji volumen in gostoto ejakulatov s skupno $18,37 \times 10^9$ semenčic in bik 2 najmanjši volumen in gostoto ejakulatov s skupno $5,70 \times 10^9$ semenčic. V razredčeni dozi semena bika 1 je bilo $40,8 \times 10^6$ semenčic in pri biku 2 manj – $35,6 \times 10^6$ semenčic. Te razlike in njihov vpliv na preživitveno sposobnost semenčic bi verjetno lahko proučevali s poglobljeno statistično analizo podatkov iz opravljenega poskusa in z dodatnimi raziskavami.

Na podlagi rezultatov poskusa ne moremo z gotovostjo trditi, da pride do kritične temperature vedno po petih do sedmih dneh od popolne izgube dušika iz kriogene posode. Poskus smo izvajali z novo kriogeno posodo, v laboratorijskih (in vitro) pogojih, na sobni temperaturi (22 °C). Posoda dnevno ni bila odprta več kot 5-7 minut (merjenje nivoja dušika in temperature in odvzemanje posameznih slamic semena). V posodi je bilo v štirih kanistrih skupaj 500 doz semena. Glede na poskus, ki smo ga izvedli s kriogeno posodo, v katero nismo dodali semena, lahko sklepamo, da količina globoko zamrznjenega semena v njej vpliva na spremembe v temperaturi. Zamrznjeno seme v posodi, upočasni dvigovanje temperature v kriogeni posodi. V praksi se kriogena posoda navadno nahaja v različnih razmerah, ki lahko spreminjajo intenzivnost izhlapevanja dušika in spremembe v temperaturi. Zanesljivo pa lahko sklepamo, da ostanejo temperature v kriogeni posodi dan ali dva, morda celo dlje, po tem, ko v posodi zmanjka tekočega dušika, še vedno tako nizke, da omogočajo preživetev semenčic oziroma delež progresivno gibljivih semenčic po odtajanju nad 50 %. Osemenjevalec ima zato dovolj časa, da potem, ko mu zaradi različnih vzrokov v posodi zmanjka tekočega dušika, dušik v posodo dolije in s tem zagotovi ustrezno kakovost semena za osemenjevanje.

Opazili smo, da so se ob kritičnih pogojih za kakovost (20. zaporedni meritveni dan, ko je bila temperatura na dnu kanistra $-77,3$ °C) na slamicah semena pojavili drobni beli kristalčki. Takrat postane kakovost semena vprašljiva. Verjetno je, da ob pojavu ledenih kristalčkov na slamicah še vedno obstaja možnost, da takoj dolijemo dušik in ohranimo zahtevano kakovost

semena. Ko se temperatura v kriogeni posodi dvigne nad $-77,3$ °C, ledeni kristalčki skoraj izginijo, škoda na semenu pa je nepopravljiva. Zanesljivo pa lahko sklepamo, da je progresivna gibljivost semenčic po odtajanju nad kritično mejo takrat, ko je na dnu kanistra temperatura pod -100 °C in ko na slamnicah ni ledenih kristalčkov. Ta temperatura se vzdržuje v kriogeni posodi (odvisno od lastnosti posode in postopkov ravnanja z njo) še nekaj dni po tem, ko nivo tekočega dušika v njej pade na 0.

Ob opravljeni raziskavi moramo upoštevati še dejstvo, da rezultati meritev progresivne gibljivosti semenčic ne opisujejo tudi oploditvene sposobnosti semenčic. Za seme, ki je bilo v naših meritvah (in vitro) še ustrezno, ne moremo trditi, da je tudi oploditveno sposobno. Testirali smo le progresivno gibljivost semenčic, ki je predpogoj za oploditveno sposobnost. Ob zvišanih temperaturah v kriogeni posodi (nad -190 °C) lahko prihaja v semenčicah do sprememb, ki zmanjšajo njihovo oploditveno sposobnost. Da bi dokazali oploditveno sposobnost semena hranjenega pri višjih temperaturah, bi morali s takim semenom osemeniti goveje plemenice in spremljati rezultate uspešnosti osemenitev.

5.2 SKLEPI

1. V kriogeno posodo smo natočili toliko tekočega dušika, da je pokrival kanistre s semenom (nivo 7,0 cm). Dušik iz posode, v kateri ni bilo kanistrov s semenom v slamicah, je izhlapeval hitreje, kot iz posode v kateri so bili kanistri s semenom.
2. Dokler je bil v posodi s semenom v kanistrah še prisoten tekoči dušik (nivo 0,1 cm) so bile na dnu in na vrhu kanistra temperature pod $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Ko je dušik iz posode izhlapeval, se je temperatura v šestih dneh (od $23,0$ do $39,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ na dan) zvišala na $-76,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ na vrhu in $77,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ na dnu kanistra.
4. V izmerjenih deležih progresivno gibljivih semenčic po odtajanju in po 24. urah hranjenja pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ v semenu štirih bikov v analiziranih obdobjih (od 1. do 14. dne, od 15. do 18. dne in od 19. do 22. dne poskusa) med biki nismo ugotovili statistično značilnih razlik.
5. Nivo tekočega dušika in zviševanje temperature v kriogeni posodi do 18. dne poskusa, ko v posodi že 4 dni ni bilo več tekočega dušika in je bila temperatura na dnu posode $-133,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, nista vplivala na izmerjeni delež progresivno gibljivih semenčic v semenu ne po odtajanju in ne 24 ur po tem.
6. Kakovost odtajanega semena bikov, ocenjena z deležem progresivno gibljivih semenčic, se je poslabšala v obdobju po 18. dnevu poskusa, pet (5) dni po tem, ko v kriogeni posodi ni bilo več tekočega dušika.
7. Pri biku 1 se je delež progresivno gibljivih semenčic po odtajanju zmanjšal na vrednost pod 50 % 19. dan poskusa, 20. dan poskusa pri bikih 3 in 4 in 21. dan poskusa pri biku 2.
8. Če v kriogeni posodi zmanjka tekočega dušika, ima osemenjevalec nekaj dni časa, da tekoči dušik dolije in s tem obdrži predpisano kakovost semena za osemenjevanje, če se v tem obdobju na slamicah niso pojavili ledeni kristalčki.

6 POVZETEK

Po postopkih odvzema, razredčevanja in globokega zamrzovanja semena bikov hranijo v osemenjevalnih centrih doze semena v slamicah v kriogenih posodah, ki so napolnjene s tekočim dušikom. Nizka temperatura (okrog $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$) zagotavlja preživitveno in oploditveno sposobnost semenčic po odtajanju. V kriogeni posodi se temperatura spreminja v odvisnosti od nivoja tekočega dušika v njej. Zviševanje temperature v posodi negativno vpliva na preživitveno sposobnost semenčic. To je hipoteza, ki smo jo v diplomski nalogi preverjali.

Z analizami v opravljenem poskusu smo ugotavljali, pri kateri temperaturi v kriogeni posodi seme po odtajanju ne ustreza več kriteriju kakovosti za umetno osemenitev, to je 50 % progresivno gibljivih semenčic neposredno po odtajanju in 40 % po 24-tih urah hranjenja pri temperaturi $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po standardnem postopku smo štirim bikom isti dan odvzeli seme (dva ejakulata) in ocenili njegovo kakovost, ga razredčili in globoko zamrznili. Za razredčitev smo uporabili komercialni razredčevalec Andromed (Minitub, Nemčija). Seme smo razredčili tako, da je bilo v vsaki dozi (plastične slamice z volumnom 0,5 ml) okrog 40×10^6 semenčic. V kriogeno posodo smo nalili 7 cm tekočega dušika tako, da je dušik pokrival vrh kanistra s semenom in ga po izhlapevanju nismo dodajali. Vsak dan smo potem merili nivo tekočega dušika v posodi in temperaturo na dnu in vrhu kanistra. Od zamrznjenih doz vsakega bika smo vsak dan poskusa vzeli iz kanistrov po pet (5) doz (slamic, 0,5 ml) semena in v odtajanem semenu ter v istem semenu, potem ko je bilo 24 ur hranjeno pri temperaturi $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, izmerili delež progresivno gibljivih semenčic z računalniškim programom CMA (Cell Motion Analyser).

Seme bikov, ki smo ga uporabili v poskusu je bilo dobre kakovosti. Volumen prvega ejakulata posameznega bika je bil manjši, kot volumen drugega ejakulata, v prvem ejakulatu je bila večja koncentracija semenčic, kot v drugem. Najmanjši volumen obeh ejakulatov skupaj je imel bik 2 (6,4 ml) in največjega bik 1 (13,0 ml). Povprečna koncentracija semenčic je bila najmanjša v ejakulatih bika 2 ($1,00 \times 10^9/\text{ml}$) in največja v ejakulatih bika 1 ($1,48 \times 10^9/\text{ml}$). Ocena valovanja je bila najboljša pri biku 1 (4 v obeh ejakulatih) in najslabša pri biku 2 (3 in 2). Ta ocena je povezana z gostoto semena. Po razredčitvi je bil delež progresivno gibljivih semenčic v semenu bika 1 boljše (75 %) kot v semenu bika 2 (70 %). Tudi delež vitalnih

semenčic, ugotovljen s supravitalnim barvanjem, je bil pri biku 1 največji (76 %). Ostala dva bika sta po ocenah semena boljša od bika 2 in slabša od bika 1. Izjema je le najmanjši delež vitalnih semenčic po supravitalnem barvanju, ki je bil pri biku 4 najmanjši (68 %). Kljub tem razlikam med biki je seme vseh štirih bikov, ki smo ga uporabili v poskusu, ustrezalo določilom Pravilnika o pogojih oploditvene sposobnosti semena domačih živali (2005).

V prazni kriogeni posodi, v katero smo natočili do nivoja 7 cm tekoči dušik, se je nivo dušika zniževal od 0,4 do 1,5 cm na dan. Enajsti dan poskusa v posodi ni bilo več dušika. Temperaturo smo vsak dan merili na dnu posode. Prvi dan smo izmerili v posodi – 186,2 °C in 10. dan – 185 °C. Po tem se je temperatura postopno zviševala in 18. dan presegla ledišče. V nadaljevanju poskusa smo v isto kriogeno posodo natočili do nivoja 7 cm tekoči dušik in vložili kanistre s semenom v slamicah. Dušik je segal do zgornjega roba kanistra. Nivo dušika se je zniževal v povprečju za 0,2 do 1,2 cm na dan. Petnajsti dan poskusa v posodi ni bilo več dušika. Temperatura, merjena na dnu posode se je dvigovala počasneje, kot v posodi brez semena. Štirinajsti dan je bilo v posodi še vedno – 180 °C. Do 22. dne poskusa temperatura v posodi ni dosegla ledišča.

V izmerjenih vrednostih deležev progresivno gibljivih semenčic v vzorcih po odtajanju in po 24-tih urah hranjenja pri 4 °C v semenu štirih bikov do 18. dne poskusa med biki ni bilo statistično značilnih razlik. Ko smo primerjali progresivno gibljivost semenčic v odtajanem semenu med obdobjema 1. do 14. dan in 15. do 18. dan prav tako nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Delež progresivno gibljivih semenčic je bil v odtajanem semenu neposredno po odtajanju, statistično značilno večji, kot v istih dozah semena po 24-tih urah hranjenja pri temperaturi 4 °C. V povprečju se je do 18. dne v 24 urah zmanjševal za 5,2 %, v prvih 14. dneh za 5,6 % in od 15. do 18. dne za 4,0 %. Sklepamo, da nivo tekočega dušika in zviševanje temperature v posodi do 18. dne poskusa, ko v posodi že štiri dni ni bilo več tekočega dušika in je bila temperatura na dnu posode -133,0 °C, nista vplivala na izmerjeni delež.

Delež progresivno gibljivih semenčic je bil v odtajanem semenu neposredno po odtajanju statistično značilno večji kot v istih dozah semena po 24-tih urah hranjenja pri temperaturi 4 °C. V povprečju se je do 18. dne v 24 urah zmanjševal za 5,2 %, v prvih 14. dneh za 5,6 % in progresivno gibljivih semenčic ne po odtajanju in ne 24 ur po tem.

V semenu, ki smo ga tekom poskusa vsak dan pregledovali, se je delež progresivno gibljivih semenčic zmanjšal pod kritično mejo (50 %) pri biku 1 že 19. dan poskusa pri temperaturi 101,1 °C, pri bikih 3 in 4 20. dan poskusa pri temperaturi – 76,1 °C in pri biku 2 21. dan poskusa pri temperaturi – 45,3 °C. Verjetno je, da lastnosti semena posameznega bika vplivajo na preživitveno sposobnost semenčic v postopku globokega zamrzovanja. Ta hipoteza zahteva poglobljene statistične analize podatkov iz opravljenega poskusa in dodatne raziskave.

Pri temperaturi – 77,3 °C na dnu kanistra so se na slamicah s semenom pojavili drobni beli ledeni kristalčki. Primerjava dobljenih rezultatov meritev progresivne gibljivosti semenčic s pojavom teh kristalčkov omogoča sklep, da je pojav teh kristalčkov na slamicah znak, da seme v slamicah ne ustreza več kriterijem semena, ki je uporabno za umetno osemenjevanje.

Pri oceni vrednosti rezultatov raziskave moramo upoštevati dejstvo, da smo proučevali vplive sprememb v temperaturi v kriogeni posodi na progresivno gibljivost semenčic. Ta je povezana z oploditveno sposobnostjo semenčic. Vendar pa lahko poviševanje temperature ob skladiščenju prizadene tudi oploditveno sposobnost gibljivih semenčic. Če bi hoteli preveriti to hipotezo, bi morali opraviti usmerjen poskus z osemenjevanjem krav s semenom, ki je bilo izpostavljeno višjim temperaturam v kriogeni posodi in je še obdržalo progresivno gibljivost semenčic.

7 VIRI

Ambrožič I. 2000. Umetno osemenjevanje živali.V: Priročnik za umetno osemenjevanje govedi. Ambrožič I. (ur.). Ljubljana, Veterinarski zavod Slovenije: 4-5

Arhiv podatkov 2005. Preska, KGZS Zavod Ljubljana, Osemenjevalni center Preska

Correa J.R., Rodriguez M.C., Patterson D.J., Zavos P.M. 1996. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*, 46: 413-420

DeJarnette J.M., Barnes D.A., Marshall C.E. 2000. Effects of pre-and post-thaw thermal insult on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. *Theriogenology*, 53: 1225-1238

Dhami A. J., Sahni K.L., Mohan G., Jani V.R. 1996. Effect of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. *Theriogenology*, 46: 109-120

Effect of ambient temperature and container on temperature of extended equine semen. The Goulburn Vally Equine Hospital.
http://www.gverquine.com.au/container_study.htm (30. mar. 2005)

Foote R.H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, 80, Electronic Supplement 2.
<http://www.asas.org/symposia/esupp2/Footehist.pdf> (30. mar. 2005)

Katalog bikov rjave, lisaste, črno-bele, cikaste in mesnih pasem za osemenjevanje v Sloveniji za leto 2005. 2005. Ljubljana, Govedorejska služba Slovenije: 200 str.

Lake P.E., Ravie O. 1979. Effect on fertility of storing fowl semen for 24 h at 5 degrees C in fluids on different pH. Society for Reproduction and Fertility
<http://www.reproduction-online.org/cgi/conect/abstract/57/1/149> (30. mar. 2005)

Močnik J. 1975. Uvod.V: Razvoj osemenjevanja pri govedu v Pomurju. Murska Sobota, Živinorejsko veterinarski zavod za Pomurje: 1-2

Navodila za uporabo kriogenih posod. Preddvor, SCAN: 3 str.

Orešnik A., Grabljevec A., Bergant J., Kranjc M., Šalehar A.1984. Proizvodnja semena bikov na osemenjevalnem centru Preska in na osemenjevalnem centru Ptuj v letu 1983. Znanost in praksa v govedoreji, 8. zvezek: 317-325

Paufler S.K., Bader H., Bonfert A., Froote R.H., Salamon S., Vasterling H.W. 1974. Die künstliche Besamung beim Rind. V: Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch. Band 1. Hannover, Verlag M.&H. Schaper: 58-72

Pavšič M.1963a. Metode, ki jih uporabljamo za pregled semena.V: Fiziologija reprodukcije domačih živali. Ljubljana, Univerzitetna založba, Biotehniška fakulteta: 132-133

Pavšič M.1963b. Reprodukcijska domačih živali. V: Fiziologija reprodukcije domačih živali. Ljubljana, Univerzitetna založba, Biotehniška fakulteta: 1-2

Poročilo o delu osemenjevalnega centra Preska v letu 2004. 2005. Preska, Osemenjevalni center: 51 str.

Pravilnik o pogojih oploditvene sposobnosti semena domačih živali. Ur.l. RS št. 91-3891/05

Snedecor G.W., Cochran W.G. 1989. Statistical methods. Eight edition. Iowa, Iowa State University Press: 530 str.

Snoj T. 2004."Jemanje in procesiranje bikovega semena". Preska, KGZS Zavod Ljubljana,
Osemenjevalni center Preska (osebni vir)

Specifikacija. 2004. Messer

Sukhato P., Thongsodseang S., Utha A., Songsasen N. 2001. Effects of colling and warming
conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa.
Animal reproduction science, 67: 69-77

Šketa J. 2000. Postopek pri osemenjevanju, evidenca in poročanje.V: Priročnik za umetno
osemenjevanje govedi. Ambrožič I. (ur.). Ljubljana, Veterinarski zavod Slovenije: 60-65

The GT range. 2003. Air Liquide

ZAHVALA

Za idejo in trud pri izvedbi poskusa se iskreno zahvaljujem dr. Tomažu Snoju.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Andreju Orešniku, ki mi je kot mentor pomagal s strokovnimi nasveti, vodenjem in konceptom diplomske naloge.

Zahvaljujem se osebju osemenjevalnega centra Preska za material, trud, nasvete in potrpljenje pri izvedbi poskusa in zbiranju podatkov za diplomsko nalogo.

Zahvaljujem se g. Lojzetu Logarju za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Zahvaljujem se dr. Nataši Siard za pomoč pri urejanju in pregledu diplomske naloge.

Hvaležna sem svojim staršem, ki so mi omogočili študij.

Hvala vsem mojim prijateljem, ki so mi tekom študija stali ob strani.