

**ZESZYTY NAUKOWE  
UNIWERSYTETU PRZYRODNICZEGO  
WE WROCŁAWIU**

**NR 593**

**BIOLOGIA I HODOWLA ZWIERZĄT**

**BIOLOGY AND ANIMAL BREEDING**

**LXVIII**



**ZESZYTY NAUKOWE  
UNIwersytetu PRZYRODNICZEGO  
WE WROCŁAWIU**

**NR 593**

**BIOLOGIA I HODOWLA ZWIERZĄT**

**BIOLOGY AND ANIMAL BREEDING**

**LXVIII**



**WROCŁAW 2013**

*Redaktor merytoryczny*  
dr hab. inż. Krystyn Chudoba, prof. nadzw.

*Redaktor statystyczny*  
dr Roman Dąbrowski

*Redakcja*  
Justyna Murdza

*Korekta:*  
Justyna Murdza  
Elżbieta Winiarska-Grabosz

*Łamanie*  
Halina Sebzda

*Projekt okładki*  
Grażyna Kwiatkowska

Covered by: Agro, Ulrich's Database, Copernicus Index, EBSCOhost, Zoological Record

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław 2013

Print edition is an original (reference) edition

ISSN 1897-208X  
ISSN 1897-8223

**WYDAWNICTWO UNIwersYTETU PRZYRODNICZEGO WE WROCLAWIU**  
**Redaktor Naczelny – prof. dr hab. inż. Andrzej Kotecki**  
**ul. Sopotcka 23, 50-344 Wrocław, tel./fax 71 328-12-77**  
**e-mail: [wyd@up.wroc.pl](mailto:wyd@up.wroc.pl)**

---

Nakład 100 + 16 egz. Ark. druk. 3,0. Ark. wyd. 3,0  
Druk i oprawa: Drukarnia PRINT Sp. j.  
Z. Przyborowski, H. Ambroży  
ul. Wykładowa 62, 51-520 Wrocław

## SPIS TREŚCI

Słowo wstępne .....	7
1. J. Akińcza, P. Gajewczyk – Wpływ dodatku paszy mineralno-witaminowej na użytkowość rozplodową loch w fermie przemysłowej .....	9
2. M. Kulawik, S. Godynicki – Rozwój brodawek liściastych na języku królika ( <i>Oryctolagus cuniculus f. domestica</i> ).....	15
3. J. Śpiewak, E. Jagła, M. Dobrowolski, O. Łowicka, H. Geringer de Oedenberg – Analiza parametrów morfometrycznych i masy ciała przy urodzeniu źrebiąt czystej krwi arabskiej z SK Michałów w latach 1995–2009 .....	27
4. Z. Zaik – Kriokonserwacja nasienia bernikli kanadyjskich ( <i>Branta canadensis</i> L.)	33

## CONTENTS

Introduction.....	8
1. J. Akińcza, P. Gajewczyk – Influence of mineral-vitamin fodder addition on sows reproductive performance in industrial farm .....	9
2. M. Kulawik, S. Godynicki – Morphogenesis of foliate papillae on the rabbit tongue ( <i>Oryctolagus cuniculus f. domestica</i> ).....	15
3. J. Śpiewak, E. Jagła, M. Dobrowolski, O. Łowicka, H. Geringer de Oedenberg – Morphometric parameters analysis of arabian foals born in Michałów stud in 1995–2009 .....	27
4. Z. Zaik – Cryopreservation of Canada goose ( <i>Branta canadensis</i> L.) semen .....	33

**Szanowni Czytelnicy,**

Oddajemy do Waszych rąk kolejny zeszyt LXVIII/2013 *Biologia i Hodowla Zwierząt*, publikowany w serii *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu*. Zeszyt ten, tak jak poprzednie, poświęcony jest szerokiej tematyce przyrodniczej.

Zamieszczone prace uzyskały pozytywną recenzję naukową wydaną przez uznane autorytety w każdej z dziedzin.

Czasopismo naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu jest kwartalnikiem. Podstawową formą wydawniczą czasopisma jest tradycyjna forma drukowana, lecz jest ono także widoczne w Internecie, a jego upowszechnianie wspierają światowe instytucje indeksujące takie jak: *Index Copernicus*, *EBSCO*, *CAB*. Obecnie w rankingu Komitetu Badań Naukowych polskich czasopism naukowych czasopismo zostało wyceńnione na 5 pkt.

Zachęcamy Państwa do współpracy z naszą serią oraz do jej upowszechniania w szerokim środowisku naukowym i zawodowym.

Z poważaniem,

Wydawnictwo

**Dear Readers,**

It is our great pleasure to present you the latest issue of the Scientific Journal of Wrocław University of Environmental and Life Sciences: LXVIII/2013 Biology and Animal Breeding. Like the previous issues, it contains publications on a wide range of topics from the field of natural sciences.

All published papers received positive non-anonymous reviews of relevant scientific authorities.

The Scientific Journal of Wrocław University of Environmental and Life Sciences is a quarterly. Our journal is available not only in a printed format, but also on the Internet and it may be accessed via such database services as *Index Copernicus*, *EBSCO*, *CAB*. In recognition of our achievements, we have been granted 5 points in the scientific journal ranking of the State Committee for Scientific Research.

We kindly invite you to cooperate with us and we would like to encourage you to promote our journal among the members of your scientific and professional community.

With best regards,

Publishing House Team



**Jerzy Akińcza, Paweł Gajewczyk**

**WPŁYW DODATKU PASZY MINERALNO-WITAMINOWEJ  
NA UŻYTKOWOŚĆ ROZPŁODOWĄ LOCH  
W FERMIE PRZEMYSŁOWEJ**

**INFLUENCE OF MINERAL-VITAMIN FODDER ADDITION  
ON SOWS REPRODUCTIVE PERFORMANCE  
IN INDUSTRIAL FARM**

*Zakład Hodowli Trzody Chlewnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
Department of Pigs Breeding, Wrocław University of Environmental and Life Sciences*

W pracy podjęto próbę ustalenia wpływu dodatku mieszanki uzupełniającej do paszy, w warunkach fermowych, na wskaźniki użytkowości rozplodowej loch i odchów prosiąt. Badaniem objęto 60 loch wieloródek mieszańców (wbp × pbz), z czego 30 stanowiło grupę kontrolną, a 30 doświadczalną. Każda locha z grupy doświadczalnej, po odsadzeniu prosiąt i 10 dni po pokryciu, otrzymywała dziennie po 100 g mieszanki uzupełniającej wymieszanej z paszą pełnoporcjową. Mieszanke podawano lochom w celu poprawy wskaźników związanych z rozrodem. Zwierzęta były pod kontrolą do potwierdzenia skuteczności pokrycia w następnym cyklu rozplodowym. Odnotowano fakt, że lochy doświadczalne urodziły i odchowały więcej prosiąt w miocie, a różnice potwierdzono statystycznie przy  $p \leq 0,05$ . Pasza uzupełniająca mogła mieć wpływ na przebieg niskiej ciąży, bowiem u loch doświadczalnych nie odnotowano przy urodzeniu prosiąt zmumifikowanych. W miotach zwierząt objętych doświadczeniem stwierdzono mniej przypadków rodzenia się prosiąt martwych w porównaniu z miotami loch z grupy kontrolnej. Testowana pasza uzupełniająca prawdopodobnie poprawia gospodarkę mineralną i wpływa pozytywnie na przebieg przemiany materii u tych zwierząt.

SŁOWA KLUCZOWE: lochy, mieszanka uzupełniająca, użytkowość rozplodowa

## WSTĘP

Ważnym wskaźnikiem, decydującym o opłacalności produkcji trzody chlewnej, jest użytkowość rozplodowa loch, na którą znaczący wpływ mają warunki środowiskowe (dobrostan), z żywieniem na pierwszym miejscu. Większość ferm nie przywiązuje wagi do przygotowania loszek przeznaczanych w stadzie na przyszłe matki i wybiera loszki do remontu stada z tuczu. Tuczniaki charakteryzują się inną specyfiką żywienia i utrzymania niż loszki i knurki hodowlane, przeznaczone do remontu stada. Nieodpowiednie przygotowanie loszki do remontu stada skutkuje obniżeniem jej wartości rozplodowej, a po pewnym czasie całego stada, na co zwrócono uwagę w badaniach przeprowadzonych przez Beltranana i wsp. (1994), Kotowskiego i Kotowską (1998), Gajewczyka (2001), Borowiecką de Martin (2002) oraz Zięcika (2004).

Tradycyjnie przyjmuje się, że loszka przygotowana do rozrodu powinna być w wieku około 230 dni, o masie ciała 120–130 kg, mieć grubość słoniny grzbietowej w granicach 18 mm i być inseminowana w 2. lub 3. rui (Borowiecka de Martin 2002, Zięcik 2004). W praktyce, w wielu przypadkach, wzorzec loszki remontowej przedstawiony powyżej nie jest brany pod uwagę.

Przeprowadzone wcześniej badania Gajewczyka (2001) potwierdziły wpływ żywienia mineralnego i sposób utrzymania loszek remontowych w fermie przemysłowej na wyniki w rozrodzie. Lochy, które odchowywano z wykorzystaniem wybiegów i paszy wzbogaconej o 50% związkami mineralnymi, w porównaniu z polskimi normami żywienia świń (1993), pozostawały w stadzie podstawowym najdłużej i charakteryzowały się największą plennością gospodarczą. W obiektach pozbawionych wybiegów, a nie prowadzących odchowu loszek remontowych, popełnia się błędy, które objawiają się między innymi nieregularnością występowania rui bądź jej brakiem i gorszym zagnieżdżaniem się zarodków w ścianie macicy (Fuchs 1988).

Większość badań przeprowadzonych w dużych fermach w kraju i za granicą dowiodła, że u świń w intensywnym systemie chowu należy zwracać uwagę nie tylko na prawidłowy bilans energetyczno-białkowy, ale również na podaż łatwo przyswajalnych makro- i mikroelementów w paszy (Bonomi i wsp. 1983, Burnell i wsp. 1989).

Podjęcie badań zmierzających do ustalenia wpływu mieszanki uzupełniającej w warunkach fermy, w której do rozrodu wybierane są na bieżąco loszki z tuczu, było jak najbardziej uzasadnione.

## MATERIAŁ I METODY

Do przeprowadzenia badania wykorzystano mieszankę paszową uzupełniającą, składającą się głównie z węgla wapnia, fosforanu dwuwapniowego, chlorku sodu i produktów pochodzenia owocowego (preparat błonnikowy jabłkowy). Kilogram mieszanki zawierał: Ca – 250 g, P – 20 g, Na – 23,5 g, Zn – 3000 mg (aminokwasowy chelat cynku), Fe – 2400 mg (aminokwasowy chelat żelaza),  $\beta$ -karoten – 2000 mg, witamina E – 1500 mg (DL-alfa-tokferol), mangan – 1500 mg (aminokwasowy chelat manganu), miedź – 500 mg (aminokwasowy chelat miedzi), kwas foliowy – 150 mg, witamina A – 360 000 IU (octan retinolu), selen – 15 mg (selenin sodu). Mieszankę podawano lochom w celu poprawy wskaźników związanych z rozrodem (przyspieszenia wystąpienia rui, poprawy skuteczności krycia, zwiększenia liczebności miotu).

Badaniem objęto 60 loch wieloródek mieszańców (wbp × pbz), z czego 30 stanowiło grupę kontrolną, a 30 doświadczalną. Każda locha z grupy doświadczalnej, po odsadzeniu prosiąt i 10 dni po pokryciu, otrzymywała dziennie po 100 g mieszanki uzupełniającej wymieszanej z paszą pełnoporcjową. Po karmieniu sprawdzano stan koryta w celu ustalenia ewentualnych niedojadów. Lochy były pod kontrolą do potwierdzenia skuteczności pokrycia w następnym cyklu rozplodowym.

W porodówkach odnotowywano liczbę urodzonych prosiąt w miocie, zarówno żywych, martwych, jak i zmumifikowanych. W dniu urodzenia prosięta zważono i czynność tę powtórzono przy odsadzeniu w 28. dniu życia. Zebrano dane o liczbie odchowanych prosiąt w miocie do 28. dnia życia, odnotowano upadki prosiąt z podaniem ich przyczyn, a także wyliczono skuteczność krycia na początku tworzenia grupy technologicznej i po zakończeniu cyklu rozplodowego loch objętych doświadczeniem.

Zebrany materiał liczbowy opracowano statystycznie przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji, korzystając z programu Statistica (Ruszczyk 1987).

## WYNIKI I OMÓWIENIE

Z obserwacji wynika, że średni czas pobierania przez lochę paszy z dodatkiem mieszanki uzupełniającej wyniósł 20 dni (średnio 6 dni od odsadzenia prosiąt i 14 dni po pokryciu). Po odsadzeniu prosiąt lochy kierowane były do budynku krycia. Każda z nich była traktowana indywidualnie. Lochy doświadczalne znalazły się w 2 grupach technologicznych. Do grupy kontrolnej wybrano losowo 30 loch, które nie otrzymywały dodatku paszowego. Z przeprowadzanych badań okresowych stada w fermie (Korniewicz i wsp. 2011, Kamiński 2011) wynika, że interwał czasowy pomiędzy odsadzeniem prosiąt od lochy a jej pokryciem wynosi od 5 do 7 dni (czas odpoczynku). Lochy otrzymujące dodatek paszy uzupełniającej w dziennej dawce pokarmowej w ilości 100 g wykazywały ruję o jeden dzień wcześniej w porównaniu z grupą kontrolną.

Mieszanka uzupełniająca wymieszana z paszą pełnoporcjową typu PL była chętnie pobierana przez lochy – obsługa nie odnotowała żadnych niedojadów. Wszystkie lochy z tej grupy się oprosiły. W tabeli 1 przedstawiono wyniki doświadczenia.

Liczba urodzonych i odchowanych prosiąt w miocie w grupie doświadczalnej była wyższa, a różnicę pomiędzy średnimi wartościami tych cech potwierdzono statystycznie przy  $p \leq 0,05$  (tab. 1). Wszystkie lochy otrzymujące dodatek paszowy zostały skutecznie pokryte. Niski poziom upadków prosiąt, od urodzenia do odsadzenia w 4. tygodniu ich życia, można przypisać bardzo dobrze prowadzonej profilaktyce i prewencji w fermie. Straty prosiąt były związane przede wszystkim z pojawieniem się w miotach, u pojedynczych prosiąt, biegunek na różnym tle i to w obu grupach, z tym że w grupie doświadczalnej prosiąt z biegunką było znacznie mniej w porównaniu z ich rówieśnikami pochodzących od loch z grupy kontrolnej.

W grupie doświadczalnej nie odnotowano prosiąt zmumifikowanych w miotach przy urodzeniu, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej. Mniejszą liczbę martwych prosiąt w miocie odnotowano również w grupie doświadczalnej. W porównaniu z grupą kontrolną lochy z grupy doświadczalnej, po odsadzeniu prosiąt, wykazywały wcześniej o 1 dzień ruję, a wskaźnik skuteczności pokryć był bardzo dobry i wyniósł 96,67% (tab. 1). Badania przeprowadzone przez Korniewicza i wsp. (2011) oraz Kamińskiego (2011)

wykazały, że skuteczność oproszeń w fermie, w której testowano dodatek mieszanki uzupełniającej, kształtowała się w zależności od grupy technologicznej loch w przedziale 86–91% (wyniki uzyskane na populacji 542 loch).

Tabela 1  
Table 1

Wskaźniki użytkowości rozplodowej loch i odchovu prosiąt  
Reproductive performance of sows and results of piglets rearing

Lp. No.	Wyszczególnienie Specification	Jednostki Units	Grupy – Groups	
			Kontrolna Control	Doświadczalna Experimental
1.	Liczba loch Number of sows	szt./head	30	30
2.	Skuteczność krycia Conception rate	%	91,02	100
3.	Liczba urodzonych prosiąt w miocie Litter size at birth	szt./head	10,55 <sup>a</sup> ± 3,13	10,93 <sup>b</sup> ± 2,87
	a) martwych stillbirth		1,40 ± 1,91	0,90 ± 1,21
	b) zmumifikowanych mummified		0,17 ± 0,61	–
4.	Masa miotu w dniu urodzenia Litter weight at birth	kg	15,21 ± 3,78	15,79 ± 4,83
5.	Masa miotu w dniu odsadzenia Litter weight at weaning	kg	61,04 ± 15,99	69,09 ± 19,12
6.	Liczba odsadzonych prosiąt z miotu Litter size at weaning	szt./head	8,63 <sup>a</sup> ± 2,07	9,66 <sup>b</sup> ± 2,38
7.	Upadki prosiąt od urodzenia do 28. dnia odchovu Piglet mortality at weaning to 28th days of life	szt./% head/%	0,35/3,90	0,37/3,69
8.	Okres jałowienia Opening period	dni/days	6,41	5,40
9.	Skuteczność krycia w następnym cyklu rozplodowym Conception rate in follow reproduc- tive cycle	%	91,38	96,67

a, b – różnice statystycznie istotne przy  $p \leq 0,05$

a, b – significant differences with  $p \leq 0.05$

Podsumowując, można stwierdzić, że uzyskane wyniki badań przemawiają za stosowaniem tej paszowej mieszanki uzupełniającej jako dodatku do pasz treściwych pełnoporcjowych dla loch utrzymywanych w fermach z nastawieniem na intensywną produkcję prosiąt. Są one zbliżone lub pokrywają się z wynikami prezentowanymi przez innych autorów (Beltranana i wsp. 1994, Bonomi i wsp. 1983, Borowiecka de Martin 2002, Burnell i wsp. 1989, Fuchs 1988, Gajewczyk 2001, Zięcik 2004), którzy doszli do wniosku, że problemy z rozrodem mogą mieć podłoże związane głównie z gospodarką mineralną u loch wykorzystywanych do produkcji prosiąt w fermach wielkostadnych. Szczególną uwagę zwraca się na dostępność w paszy oraz łatwość przyswajania makro- i mikroelementów (Beltranana i wsp. 1994, Bonomi i wsp. 1983, Zięcik 2004). Wykazano,

że testowana mieszanka paszowa dla loch ma dobrany do ich potrzeb zestaw składników w przyswajalnej postaci. Fakt ten, a także wyniki badań innych autorów (Borowiecka de Martin 2002, Korniewicz i wsp. 2011) przemawiają za uaktualnieniem norm żywienia sów w Polsce, przede wszystkim w przypadku ferm wielkostadnych (Gajewczyk 2001, Zięcik 2004).

## WNIOSKI

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Lochy doświadczalne otrzymujące dodatek paszy mineralno-witaminowej rodziły i odchowywały więcej prosiąt w miocie. Różnice pomiędzy średnimi wartościami w liczbie urodzonych i odchowanych prosiąt w miocie były potwierdzone statystycznie ( $p \leq 0,05$ ).

2. Pasza uzupełniająca mogła mieć wpływ na przebieg niskiej ciąży, bowiem u loch doświadczalnych nie stwierdzono przy urodzeniu prosiąt zмумifikowanych.

3. W miotach loch objętych doświadczeniem odnotowano mniej przypadków rodzenia się prosiąt martwych w porównaniu z miotami loch z grupy kontrolnej.

4. Za rozpropagowaniem testowanej paszy uzupełniającej w żywieniu loch w warunkach fermowych przemawia uzyskany wysoki wskaźnik skuteczności krycia.

5. Testowana pasza uzupełniająca prawdopodobnie poprawia gospodarkę mineralną i wpływa pozytywnie na przebieg przemiany materii u loch.

6. Żywienie loch paszą pełnoporcjową, uzupełnioną mieszanką doświadczalną, od odsadzenia prosiąt i w pierwszych 14 dniach po pokryciu, poprawiło efekty produkcyjne stada podstawowego loch w fermie przemysłowej.

## PIŚMIENNICTWO

- Beltranana E., Aherne F.X., Foxcroft G.R., Kirkwood R.N., 1994. Effects of pre- and postpubertal feeding on production traits at first and second estrus. *J. Anim. Sci.*, 69: 886–893.
- Bonomi A., Quarantelli A., Sabbioni A., Superchi P., Bianco P., 1983. Contenuto in elementi minerali dei mangimi per suini in fase di svezzamento. *Suinicol.*, 24, 12: 43–50.
- Borowiecka de Martin E., 2002. Technika wspomagania rozrodu sów. Zastosowanie osiągnięć naukowych z zakresu genetyki, rozrodu i żywienia w nowoczesnej produkcji sów. Materiały konf., 3–4 lipca, ATR Bydgoszcz: 55–62.
- Burnell T.W., Cromwell G.L., Stahly T.S., 1989. Bioavailability of phosphorus in meat and bone meal for pigs. *J. Anim. Sci.*, 67, 2: 38–41.
- Fuchs B., 1988. Wpływ różnych modeli żywieniowych w czasie odchowu loszek hodowlanych na ich wskaźniki reprodukcyjne i fizjologiczne podczas rozplodu. *Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu*, 71: 1–75.
- Gajewczyk P., 2001. Wpływ różnych sposobów odchowu loszek w fermie przemysłowej na rozwój ich układu rozrodczego, użytkowość rozplodową oraz niektóre parametry krwi i kości. *Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu*, 411, Rozprawy CLXXXI.
- Kamiński K., 2011. Analiza zależności między kolejnością cyklu reprodukcyjnego loch a wynikami produkcji prosiąt. Maszynopis pracy magisterskiej, UP we Wrocławiu.

- Korniewicz D., Gajewczyk P., Dobrzański Z., Korniewicz A., 2011. Efekty produkcyjne loch żywionych mieszankami pełnoporcjowymi z obniżonym poziomem białka i dodatkiem konserwantu wieloskładnikowego. Zesz. Nauk. UP we Wrocławiu. Biologia i Hodowla Zwierząt LXII, Nr 580: 267–283.
- Kotowski K., Kotowska E., 1998. Wybrane czynniki niezakaźne warunkujące wykorzystanie potencjału rozrodczego loch. Przegl. Hod., 2, 66, 17–21.
- Normy żywienia świń. Wartość pokarmowa pasz. 1993. Omnitech Press, Warszawa.
- Ruszczyk Z., 1978. Doświadczalnictwo zootechniczne. PWRiL, Warszawa.
- Zięcik A. J., 2004. Zastosowanie osiągnięć badań podstawowych we współczesnej biotechnice rozrodu świń. Prace i Mat. Zoot., Zesz. Specj., 15, 47–51.

## **INFLUENCE OF MINERAL-VITAMIN FODDER ADDITION ON SOWS REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN INDUSTRIAL FARM**

### **S u m m a r y**

The paper presents an attempt of establishing of an influence of supplementing mixture addition to the fodder in farm conditions on the indices of sows reproductive performance and piglets rearing. The study included 60 multiparous crossbred (LPW × PL) sows, 30 of them constitutes the control group and 30 the experimental one. Each sows from the experimental group, after piglets weaning and 10 days after mating, obtained 100 g of supplementing mixture per day mixed with complete fodder. The mixture was given to the sows in order to improve reproduction – related indices. The sows were controlled until the confirmation of mating effectiveness in the subsequent reproduction cycle. It was noted that the experimental sows born and reared higher number of piglets in a litter, and the differences were confirmed statistically at  $p \leq 0.05$ . The supplementing fodder would have affected the course of low pregnancy, since no mummified piglets were noted in the experimental sows. Lower number of still piglets born was noted in the experimental litters compared to the litter of control group sows. Tested supplementing fodder probably improves mineral balance and positively affects sows metabolism.

KEY WORDS: sows, supplementing fodder, reproductive performance

Mirosława Kulawik<sup>1</sup>, Szymon Godynicki<sup>2</sup>

**ROZWÓJ BRODAWEK LIŚCIASTYCH NA JĘZYKU KRÓLIKA  
(*ORYCTOLAGUS CUNICULUS F. DOMESTICA*)**

**MORPHOGENESIS OF FOLIATE PAPILLAE ON THE RABBIT  
TONGUE (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS F. DOMESTICA*)**

<sup>1</sup> Zakład Anatomii Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
*Department of Animal Anatomy, Poznań University of Life Sciences*

<sup>2</sup> Zakład Histologii i Embriologii Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
*Department of Histology and Embryology of Animals, Poznań University  
of Life Sciences*

W niniejszej pracy zbadano morfogenezę brodawek liściastych na języku królika *Oryctolagus cuniculus f. domestica*. Pierwsze oznaki formowania się zawiązków brodawek liściastych wykazano w 22. dniu rozwoju prenatalnego królika. Składały się one z równoległych pasm nabłonkowych pierwszorzędowych. Zrąb łącznotkankowy tych zawiązków uformowany był z fałdów o nieciągłej strukturze. W 26. dniu rozwoju prenatalnego dodatkowo obserwowano pasma nabłonkowe drugorzędowe. Fałdy zrębu łącznotkankowego były ciągłe. Począwszy od 1. dnia życia postnatalnego królika zrąb łącznotkankowy każdego liścia brodawki liściastej był uformowany z trzech fałdów – jednego środkowego i dwóch bocznych, które umiejscowione były pomiędzy pasmami nabłonkowymi. Poszczególne liście brodawek rozmieszczone były równolegle do siebie i oddzielone wyraźnymi rowkami. Rozwijające się brodawki składały się z 15–21 liści brodawki liściastej.

SŁOWA KLUCZOWE: brodawki liściaste, rozwój, LM, SEM

---

Badania wykonano w ramach grantu numer 5P06D01719, finansowanego przez KBN.

---

Do cytowania – For citation: Kulawik M., Godynicki S., 2013. Rozwój brodawek liściastych na języku królika (*Oryctolagus cuniculus f. domestica*). Zesz. Nauk. UP Wroc., Biol. Hod. Zwierz., LXVIII, 593: 15–25.

## WSTĘP

Królik domowy *Oryctolagus cuniculus f. domestica* jest popularnym zwierzęciem laboratoryjnym, jak również hodowlanym, dostarczającym mięsa i skór. Ponadto zwierzęta te są często utrzymywane w warunkach domowych, podobnie jak pies i kot, stanowiąc na równi z nimi coraz częstszych pacjentów lecznic weterynaryjnych. Dlatego potrzebna jest już nie tylko ogólna znajomość budowy struktur anatomicznych tego gatunku, lecz również bardziej szczegółowa. W literaturze naukowej znaleźć można opis brodawek językowych u dorosłych królików. Kulawik i Godynicki (2006, 2007a,b) opisali strukturę wszystkich trzech typów brodawek smakowych, tj.: grzybowatych, okolonych i liściastych, występujących na języku około 6-miesięcznych królików. Kobayashi (1992) zbadał zrąb łącznotkankowy brodawek liściastych. Natomiast Ojima i wsp. (1997) opisali mikrounacznienie brodawek na języku dorosłego osobnika.

Dotychczasowe badania wykazały dużą zmienność w rozmieszczeniu i budowie brodawek językowych u różnych gatunków zwierząt. Cechy brodawek zależą nie tylko od gatunku, ale również od siedliska zwierząt, ich diety i zwyczajów żywieniowych (Iwasaki 2002, Kumar, Bate 2004, Okada, Schraufnagel 2005, Emura i wsp. 2006, Shao i wsp. 2011). Informacje dotyczące typów brodawek językowych, ich rozmieszczenia i struktury są cenne, gdyż mogą być wykorzystane w taksonomii (Iwasaki 2002, Emura i wsp. 2001, 2006).

Literatura naukowa prezentuje również wyniki badań morfogenezy różnych typów brodawek językowych u ssaków, np. chomika (Whitehead, Kachele 1994), myszy (Iwasaki i wsp. 1996), szczura (Iwasaki i wsp. 1997) i czerwonej kozy Sokoto (Igbokwe, Okolie 2009). Opisano również rozwój brodawek liściastych u szczura (State i wsp. 1974), świnki morskiej (Hamed i wsp. 1980) i myszy (Toprak, Ilmaz 2007). W czasie rozwoju języka kręgowców zmienia się ukształtowanie jego błony śluzowej, co związane jest z formowaniem się brodawek językowych. Środowisko życia różnych gatunków zwierząt zapewnia dostęp do różnorodnego pokarmu, a tym samym do różnorodnych doznań smakowych. W życiu prenatalnym pochodzą one z wód płodowych, po urodzeniu jest to u ssaków siara i mleko, a następnie pokarm stały. Odbieranie doznań smakowych związane jest z pojawieniem się kubków smakowych, których duża koncentracja znajduje się w nabłonku brodawek smakowych. Natomiast powstanie struktur smakowych (brodawek i kubków smakowych) podlega rozwojowi ich unerwienia (Ahpın i wsp. 1989, Nakashima i wsp. 1990, Whitehead, Kachele 1994).

Celem niniejszych badań było uzupełnienie brakującej wiedzy na temat rozwoju brodawek liściastych u królika w okresie pre- i postnatalnym. Powodem podjętych badań było również porównanie uzyskanych wyników z wynikami przedstawionymi w literaturze naukowej u innych ssaków laboratoryjnych, hodowlanych i dziko żyjących.

## MATERIAŁ I METODY

Do badań posłużyły 123 języki królików domowych, rasy kalifornijskiej (*Oryctolagus cuniculus f. domestica*), obu płci. Pobrano od zwierząt będących w 15. (E15), 18. (E18), 20. (E20), 22. (E22) i 26. (E26) dniu rozwoju prenatalnego oraz od królików będących



w 1. (P1), 15. (P15) i 30. (P30) dniu życia postnatalnego. Badania prowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej; zgoda numer 4/2000.

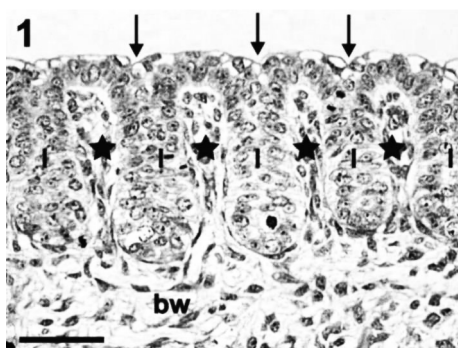
Próbki języków przeznaczone do badań w mikroskopie świetlnym (LM) utrwalono w 10% zubożonej formalinie, odwodniono w etanolu o stopniowo rosnącym stężeniu (30–100%), zatopiono w paraflocie® i krojono za pomocą mikrotomu rotacyjnego Leica RM 2055 na skrawki o grubości od 3 do 5  $\mu\text{m}$ , w płaszczyźnie strzałkowej, poprzecznej i grzbietowej. W badaniach zastosowano barwienie Masson-Goldner i HE. Preparaty obserwowano przez mikroskop świetlny Jenaval (Carl Zeiss Jena).

Próbki do badań w mikroskopie elektronowym skaningowym (SEM) utrwalono w roztworze Karnowskiego, odwodniono w etanolu, wysuszono w punkcie krytycznym i napyłono złotem. W celu zbadania zrębu łącznotkankowego rozwijających się brodawek liściastych część próbek po utrwaleniu zanurzono w 10% roztworze NaOH na 14 dni. Następnie próbki odwodniono, wysuszono w punkcie krytycznym i napyłono złotem. Materiał badawczy obserwowano przez mikroskop elektronowy skaningowy Hitachi S-4200 i LEO 435VP.

## WYNIKI

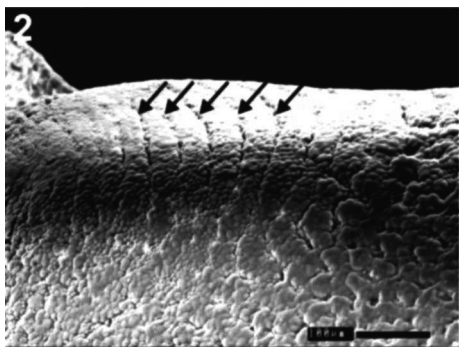
Pierwsze zawiązki brodawek liściastych wykazano w E22 na grzbietowo bocznej stronie tylnej części trzonu języka. W miejscu rozwijających się brodawek obserwowano wówczas pierwszorzędowe pasma nabłonkowe, wrastające do położonej głębiej tkanki łącznej. Błazka właściwa błony śluzowej tworzyła fałdy, układające się między pasmami nabłonkowymi. Zawiązki brodawek liściastych pokrywał nabłonek dwuwarstwowy, a na jego powierzchni znajdowały się płytkie zagłębienia (fot. 1). Obserwacje prowadzone za pomocą SEM potwierdziły ich obecność. Układały się one równolegle w stosunku do siebie. Między zagłębieniami znajdowały się nieznaczne wzniesienia (fot. 2). Po usunięciu nabłonka za pomocą roztworu NaOH wykazano, że w miejscach formowania się brodawek liściastych znajdowały się fałdy łącznotkankowe o nieciągłej strukturze. Fałdy te oddzielone były od siebie rynienkowatymi, równoległymi zagłębieniami (fot. 3).

W E26, w niektórych miejscach, pasma nabłonkowe pierwszorzędowe wydłużyły się w kierunku mięśni języka. Zaobserwowano też pojawienie się pasm nabłonkowych drugorzędowych, które wrastały w obszar tkanki łącznej położonej między dwoma sąsiednimi pasmami nabłonkowymi pierwszorzędowymi. Nabłonek pokrywający zawiązki brodawek liściastych składał się z 3–4 warstw komórek. Na powierzchni formujących się brodawek nadal obserwowano płytkie zagłębienia (fot. 4). Obserwacje powierzchni języka wykazały, podobnie jak w poprzednim badanym okresie, obecność płytkich równoległych zagłębień, które oddzielały sąsiadujące ze sobą wzniesienia (fot. 5). Zrąb łącznotkankowy zawiązków brodawek liściastych utworzony był z wyraźnych fałdów, między którymi rozpoznano rynienkowate zagłębienia. Na ich dnie wykazano obecność dołków powstałych po usunięciu pasm nabłonkowych pierwszorzędowych, wrastających miejscami głębiej (fot. 6).



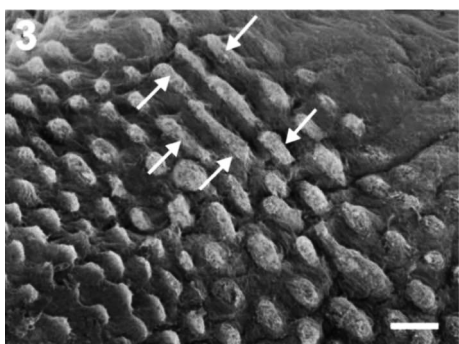
Fot 1. Przekrój poprzeczny zawiązka brodawki liściastej w E22: strzałki – zagłębienia na powierzchni zawiązka, I – pasma nabłonkowe pierwszorzędowe, gwiazdki – fałdy zrębu łącznotkankowego, bw – blaszka właściwa błony śluzowej; skala = 50  $\mu$ m

Phot. 1. Transverse section of the rudiment of foliate papilla at E22: arrows – depressions on the surface of the rudiment, I – primary epithelial stricks, stars – folds of connective tissue core, bw – lamina propria of the mucosae; scale bar = 50  $\mu$ m



Fot. 2. Powierzchnia zawiązka brodawki liściastej w E22: strzałki – równoległe zagłębienia; skala = 100  $\mu$ m

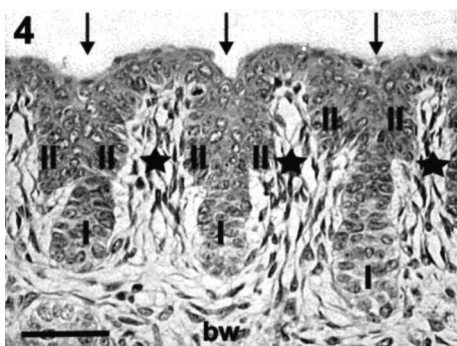
Phot. 2. The surface of the rudiment of foliate papilla at E22: arrows – parallel depressions; scale bar = 100  $\mu$ m



Fot. 3. Zrąb łącznotkankowy zawiązka brodawki liściastej w E22: strzałki – nieciągłe fałdy; skala = 30  $\mu$ m

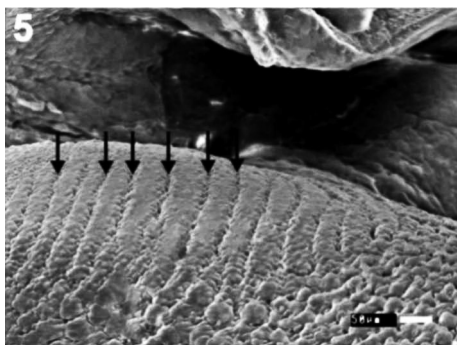
Phot. 3. Connective tissue core of the rudiment of foliate papilla at E22: arrows – broken folds; scale bar = 30  $\mu$ m

U noworodków (P1) zanotowano dalsze zmiany w obrębie rozwijających się brodawek liściastych. Koniec bliższych pasm nabłonkowych pierwszorzędowych był częściowo rozszczepiony. Powstała w ten sposób szczelina nie miała jednak kontaktu z powierzchnią języka. W nabłonku rozszczepionych pasm obserwowano kubki smakowe. Nabłonek pokrywający brodawki liściaste składał się z 4–5 warstw komórek. Pasma nabłonkowe drugorzędowe były wyraźniejsze niż w poprzednim badanym okresie rozwoju. W każdym formującym się liściu brodawki liściastej występowały dwa pasma nabłonkowe drugorzędowe. Pasma te dzieliły zrąb łącznotkankowy każdego liścia brodawki na jeden fałd środkowy i dwa fałdy boczne. Fałd środkowy znajdował się między dwoma pasmami



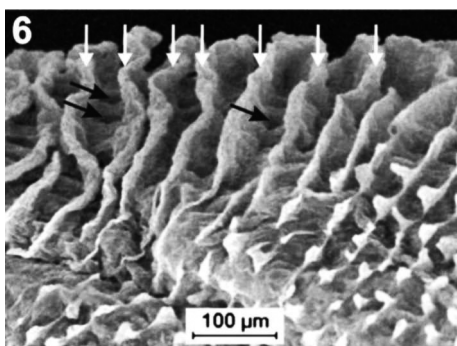
Fot. 4. Przekrój poprzeczny zawiązka brodawki liściastej w E26: strzałki – zagłębienia na powierzchni zawiązka, I – pasma nabłonkowe pierwszorzędowe, II – pasma nabłonkowe drugorzędowe, gwiazdki – fałdy zrębu łącznotkankowego, bw – blaszka właściwa błony śluzowej; skala = 50  $\mu\text{m}$

Phot. 4. Transverse section of the rudiment of foliate papilla at E26: arrows – depressions on the surface of the rudiment, I – primary epithelial streaks, II – secondary epithelial streaks, stars – folds of connective tissue core, bw – lamina propria of the mucosae; scale bar = 50  $\mu\text{m}$



Fot. 5. Powierzchnia zawiązka brodawki liściastej w E26: strzałki – równoległe zagłębienia; skala = 50  $\mu\text{m}$

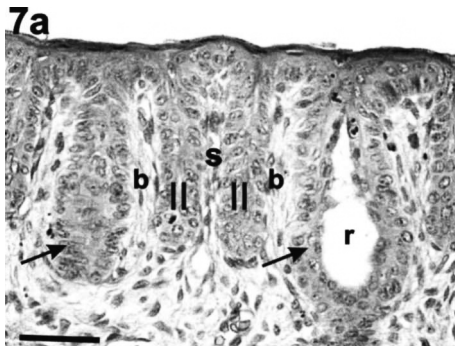
Phot. 5. The surface of the rudiment of foliate papilla at E26: arrows – parallel depressions; scale bar = 50  $\mu\text{m}$



Fot. 6. Zręb łącznotkankowy zawiązka brodawki liściastej w E26: białe strzałki – fałdy zrębu łącznotkankowego, czarne strzałki – dołki na dnie rynienkowatych zagłębień; skala = 100  $\mu\text{m}$

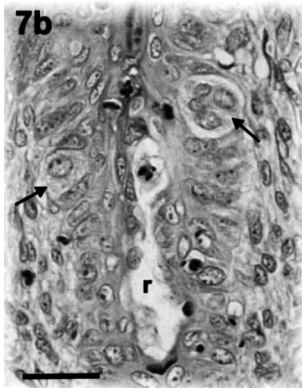
Phot. 6. Connective tissue core of the rudiment of foliate papilla at E26: white stars – folds of connective tissue core, black stars – the holes at the bottom of depressions like a gutter; scale bar = 100  $\mu\text{m}$

nabłonkowymi drugorzędowymi. Natomiast każdy fałd boczny zlokalizowany był między pasmem nabłonkowym pierwszorzędowym a pasmem nabłonkowym drugorzędowym (fot. 7a,b). Po usunięciu nabłonka wykazano równoległy układ fałdów i rynienkowatych zagłębień. Na dnie zagłębień usytuowanych między fałdami bocznymi znajdowały się dołki (fot. 8). Obserwacje powierzchni rozwijających się brodawek liściastych wykazały, że poszczególne liście tych brodawek oddzielone były od siebie wyraźniejszymi niż w E26 rowkami. Jednak stopień rozwoju rowków w obrębie jednej brodawki był zróżnicowany: niektóre rowki były dobrze widoczne, natomiast inne były nadal płytkie. Na powierzchni nabłonka widoczne były złuszczone komórki (fot. 9).



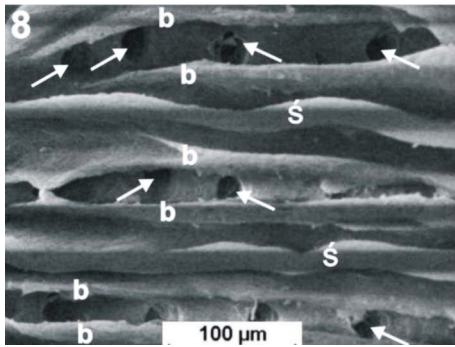
Fot. 7a. Przekrój poprzeczny brodawki liściastej w P1: strzałki – pasma nabłonkowe pierwszorzędowe, r – rozwijający się rowek brodawki, II – pasma nabłonkowe drugorzędowe, b – fałdy boczne, s – fałd środkowy; skala = 200  $\mu$ m

Phot. 7a. Transverse section of the foliate papilla at P1: arrows – primary epithelial stricks, r – developing of furrow of papilla, II – secondary epithelial stricks, b – lateral folds, s – medial fold; skale bar = 200  $\mu$ m



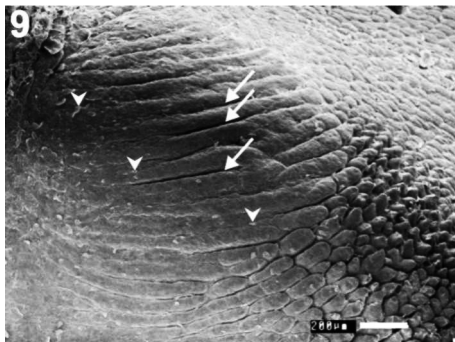
Fot. 7b. Przekrój poprzeczny pasma nabłonkowego pierwszorzędowego brodawki liściastej w P1: r – rozwijający się rowek brodawki, strzałki wskazują kubki smakowe; skala = 100  $\mu$ m

Phot. 7b. Transverse section of the primary epithelial strick of the foliate papilla at P1: r – developing of furrow of papilla, arrows indicate taste buds; skale bar = 100  $\mu$ m



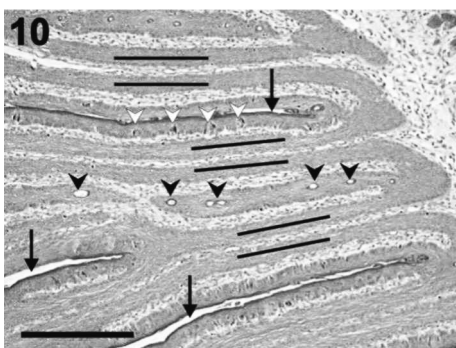
Fot. 8. Zrąb łącznotkankowy brodawki liściastej w P1: b – fałdy boczne, ś – fałdy środkowe, strzałki – dołki na dnie rynienkowatych zagłębień; skala = 100  $\mu$ m

Phot. 8. Connective tissue core of foliate papilla at P1: b – lateral folds, ś – medial folds, arrows – the holes at the bottom of the depressions like a gutter; scale bar = 100  $\mu$ m



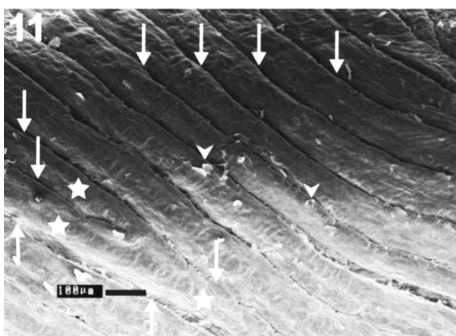
Fot. 9. Powierzchnia zawiązka brodawki liściastej w P1: strzałki – rozwijające się rowki brodawki liściastej, grotty – złuszczające się komórki nabłonkowe; skala = 200  $\mu$ m

Phot. 9. The surface of the rudiment of foliate papilla at P1: arrows – developing furrows of foliate papilla, arrowheads – exfoliating the epithelial cells; scale bar = 200  $\mu$ m



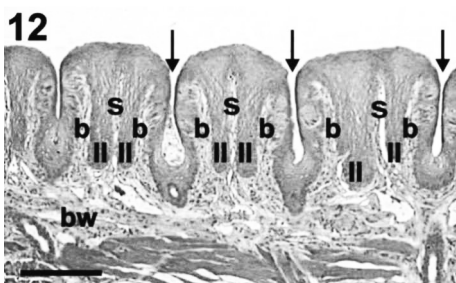
Fot. 10. Przekrój grzbietowy brodawki liściastej w P15: strzałki – rowki brodawki, czarne strzałki – ujścia gruczołów na dnie rowków brodawki, białe strzałki – kubki smakowe, linie – pasma nabłonkowe drugorzędowe; skala = 200  $\mu\text{m}$

Phot. 10. Dorsal section of the foliate papilla at P15: arrows – furrows of the papilla, black arrowheads – openings of glands at the bottom of the furrows of papilla, white arrowheads – taste buds, lines – secondary epithelial stricks; skala bar = 200  $\mu\text{m}$



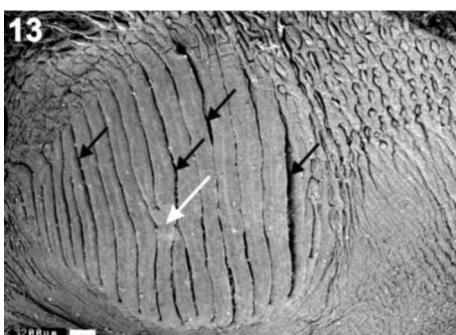
Fot. 11. Powierzchnia brodawki liściastej w P15: strzałki – rowki brodawki, gwiazdki – liście brodawki, groty – złuszczone komórki nabłonkowe; skala = 100  $\mu\text{m}$

Phot. 11. The surface of the foliate papilla at P15: arrows – furrows of papilla, stars – folia of papilla, arrowheads – exfoliating the epithelial cells; scale bar = 100  $\mu\text{m}$



Fot. 12. Przekrój poprzeczny brodawki liściastej w P30: strzałki – rowki brodawki, II – pasma nabłonkowe drugorzędowe, b – fałdy boczne, s – fałdy środkowe, bw – błaszka właściwa błony śluzowej; skala = 200  $\mu\text{m}$

Fig. 12. Transverse section of the foliate papilla at P30: arrows – furrows of papilla, II – secondary epithelial stricks, b – lateral folds, s – medial folds, bw – lamina propria of the mucosae; scale bar = 200  $\mu\text{m}$



Fot. 13. Powierzchnia brodawki liściastej w P30: czarne strzałki – rowki brodawki, biała strzałka – miejsce gdzie liście brodawki są połączone; skala = 200  $\mu\text{m}$

Phot. 13. The surface of the foliate papilla at P30: black arrows – furrows of papilla, white arrow – place where the folia of papillae are connected; scale bar = 200  $\mu\text{m}$

W P15 stwierdzono, że pierwszorzędowe pasma nabłonkowe uległy całkowitemu rozszczepieniu, tworząc rowki brodavek liściastych, na dnie których obserwowano ujścia gruczołów. Nabłonek pokrywający brodawki liściaste był wielowarstwowy, płaski nierogowaciejący. W nabłonku od strony rowków obserwowano kubki smakowe (fot. 10). Badania prowadzone za pomocą SEM wykazały wyraźne liście brodavek liściastych, oddzielonych od siebie dobrze uformowanymi rowkami. Niektóre liście dzieliły się na dwa wtórne. Na ich powierzchni stwierdzono złuszczające się komórki nabłonkowe (fot. 11). CTC brodavek liściastych złożony był z fałdów i rynienkowatych zagłębień, podobnie jak to wykazano w P1.

W P30 brodawki liściaste były podobne do tych, jakie obserwowano w P15. Liście i rowki brodavek liściastych układały się naprzemiennie. W niektórych miejscach obserwowano rozdział jednego liścia brodawki na dwa wtórne (fot. 12). Zanotowano również sytuację połączenia się dwóch liści brodawki w jeden, a następnie ponowne jego rozdzielanie (fot. 13).

Przeprowadzone badania wykazały także, iż rozwijające się brodawki liściaste utworzone były ze zmiennej liczby liści brodawki, których zanotowano od 15 do 21.

## OMÓWIENIE

Brodawki liściaste królika położone są w tylnej części trzonu języka, na jego grzbietowo-bocznej stronie, podobnie jak u innych gatunków zwierząt, np. u dużej myszy Vesper (Utiyama i wsp. 1995), nutrii (Emura i wsp. 2001), jenota i lisa (Emura i wsp. 2006). Literatura naukowa informuje, że jednak nie u wszystkich gatunków na języku znajdują się brodawki liściaste; nie zaobserwowano ich u przeżuwaczy, np. u czerwonej kozy Sokoto (Igbokwe, Okolie 2009). Brak ich również u wiewiórecznika pospolitego (Kobayashi i wsp. 2004), oposa (Krause, Cutts 1982) i hipopotama nilowego (Yoshimura i wsp. 2009). Niektóre gatunki zwierząt, na przykład opos i wiewiórecznik pospolity, mają struktury będące wytworami błony śluzowej języka, które przypominają brodawki liściaste, lecz nimi nie są. Struktury te występują na języku, w miejscach w których u innych gatunków zwierząt znajdują się brodawki liściaste (Krause, Cutts 1982, Kobayashi i wsp. 2004).

Rozwój brodavek liściastych na języku królika, podobnie jak innych brodavek smakowych, tj. grzybowatych i okolonych, zostaje zapoczątkowany wcześniej niż rozwój brodavek nitkowatych, będących brodawkami mechanicznymi (Kulawik, Godynicki 2009a,b). Czucie smaku jest bowiem możliwe już w okresie życia płodowego, kiedy na języku znajdują się kubki smakowe płodowe, reagujące na bodźce smakowe pochodzące z płynu owodniowego (Fujimoto i wsp. 1993).

Kobayashi (1992), badając CTC brodavek liściastych u dorosłego królika, wskazał w swojej pracy, że każda brodawka liściasta zwierzęcia utworzona była z 15 liści brodawki. Natomiast w niniejszych badaniach, obejmujących większą pod względem liczby zwierząt grupę, odnotowano, że rozwijające się brodawki liściaste składały się z 15–21 liści brodawki liściastej. Badania innych autorów wykazały, że istnieją różnice gatunkowe, jeśli chodzi o liczbę liści w brodawce liściastej. Yoshimura i wsp. (2009) podali, że u hipopotama nilowego jest ich 7–8, natomiast u myszy ustalono 4–6 (Toprak, Ilmaz

2007). Możliwe, że na liczbę liści w brodawce wpływ ma również rasa. Tego typu założenie wymaga jednak przeprowadzenia dalszych badań.

Brodawki liściaste królika w E30 są dobrze rozwinięte, podobnie jak u dorosłych osobników (Kobayashi 1992, Silva i wsp. 2002, Kulawik i Godynicki 2006). Usunięcie nabłonka z ich powierzchni pozwoliło zaobserwować charakterystyczną dla tego gatunku konstrukcję CTC, złożoną z dwóch fałdów bocznych i jednego środkowego, które oddzielone były od siebie rynienkowatymi zagłębieniami. Jednak należy pamiętać, że proces tworzenia się CTC był długotrwały, gdyż rozpoczął się już w E22. Pierwszą jego postacią były wówczas fałdy o nieciągłej strukturze, które w miarę rozwoju pasm nabłonkowych drugorzędowych, wrastających do tkanki łącznej, różnicowały się na fałdy boczne i fałd środkowy. Takiej regularnej struktury CTC, powtarzającej się w każdym liściu brodawki, nie obserwowano u innych badanych gatunków zwierząt. Dla porównania – u hipopotama nilowego CTC grzebieniastych liści brodawek liściastych miał na powierzchni liczne pręcikowate wyrostki (Yoshimura i wsp. 2009).

Formowanie się rowków brodawek liściastych opierało się na rozszczepianiu się pasm nabłonkowych pierwszorzędowych. Zmiany takie obserwowano również u innych gatunków, np. u szczura (State i wsp. 1974) i świnki morskiej (Hamed i wsp. 1980). W niniejszej pracy wykazano, że w procesie tym początkowo obserwowano nieznaczne zagłębienia na powierzchni zawiązków. Natomiast od P1 widoczne było rozszczepianie się pasm nabłonkowych pierwszorzędowych na ich końcu bliższym. Hamed i wsp. (1980) odnotowali, że proces formowania się rowków jest jednokierunkowy – tylko od powierzchni rozwijających się brodawek. Fujimoto i wsp. (1993) sugerowali, że rowki powstają poprzez połączenie się sąsiadujących ze sobą przewodów wyprowadzających gruczołów, co jest dyskusyjne i nie odpowiada wynikom badań własnych.

## WNIOSKI

1. Brodawki liściaste rozwijają się od E22 z pasm nabłonkowych pierwszorzędowych.
2. Nabłonek pokrywający rozwijające się brodawki liściaste od E22 do P30 zmienia się z 1–2-warstwowego w nabłonek wielowarstwowy płaski nierogowaciejący.
3. Rowki brodawek liściastych powstają w procesie rozszczepiania się pasm nabłonkowych pierwszorzędowych.
4. CTC brodawek liściastych rozwija się od E22 z fałdów o nieciągłej strukturze. Od P1 tworzą go trzy fałdy: jeden środkowy i dwa boczne, oddzielone rynienkowatymi zagłębieniami.

## PIŚMIENNICTWO

- Ahpin P., Ellis S., Arnott C., Kaufman H., 1989. Prenatal development and innervation of the circumvallate papilla in the mouse. *J. Anat.*, 162: 33–42.
- Emura S.T., Okumura H.C., Shoumura S., 2006. Morphology of the lingual papillae in the raccoon dog and fox. *Okajimas Folia Anat. Jpn.*, 83: 73–76.

- Emura S., Tamada A., Hayakawa D., Chen H., Shoumura S., 2001. SEM study on the dorsal lingua surface of the nutria, *Myocastor Coypus*. Kaibog. Zasshi., 76: 233–238.
- Fujimoto S., Yamamoto K., Yoshizuka M., Yokoyama M., 1993. Pre- and postnatal development of rabbit foliate papillae with special reference to foliate gutter formation and taste bud and serous gland differentiation. Microsc. Res. Technique., 26: 120–132.
- Hamed M.S., Serafy A.K., El-Eishi I.H., 1980. Histological and histochemical study on the development of foliate papillae in guinea pigs. Acta Anat., 106: 101–107.
- Igbokwe C.O., Okolie C., 2009. The morphological observations of some lingual papillae in the prenatal and prepuberal stages of red Sokoto goats (*Capra hircus*). Int. J. Morphol., 27 (1): 145–150.
- Iwasaki S., 2002. Evolution of the structure and function of the vertebrate tongue. J. Anat., 201: 1–13.
- Iwasaki S., Yoshizawa H., Kawahara I., 1996. Study by scanning electron microscopy of the morphogenesis of three types of the lingual papillae in the mouse. Acta Anat., 157: 41–52.
- Iwasaki S., Yoshizawa H., Kawahara I., 1997. Study by scanning electron microscopy of the morphogenesis of three types of lingual papillae in the rat. Anat. Record., 247: 528–541.
- Kobayashi K., 1992. Stereo Architecture of the interface of the epithelial cell layer and connective tissue core of the foliate papilla in the rabbit tongue. Acta Anat., 143: 109–117.
- Kobayashi K., Kumakura M., Yoshimura K., Takahashi M., Zeng J.H., Kageyama I., Kobayashi K., Hama N., 2004. Comparative morphological studies on the stereo structure of the lingual papillae of selected primates using scanning electron microscopy. Ann. Anat., 186: 525–530.
- Krause W.J., Cutts J.H., 1982. Morphological observations on the papillae of the opossum tongue. Acta Anat., 13: 159–168.
- Kulawik M., Godynicki S., 2006. Foliate papillae on the tongue in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus f. domestica*). Electron. J. Pol. Agric. Univ., Veterinary Medicine., 9, 3.
- Kulawik M., Godynicki S., 2007a. Fungiform papillae of the tongue in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Pol. J. Vet. Sci., 10: 25–27.
- Kulawik M., Godynicki S., 2007b. Vallate papillae in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus f. domestica*). Pol. J. Vet. Sci., 10: 47–50.
- Kulawik M., Godynicki S., 2009a. Development of the posterior serous lingual glands (von Ebner's glands) in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Acta Sci. Pol. Med. Vet., 8 (4): 5–14.
- Kulawik M., Godynicki S., 2009b. Development of the tongue in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus f. domestica*) and the order of formation of lingual papillae in pre- and postnatal life. Acta Sci. Pol. Med. Vet., 8 (4): 15–26.
- Kumar S., Bate L.A., 2004. Scanning electron microscopy of the tongue papillae in the pig (*Sus scrofa*). Microsc. Res. Tech., 63: 253–258.
- Nakashima T., Toyoshima K., Shimamura A., Yamada N., 1990. Morphological changes of taste buds and fungiform papillae following long-term neurectomy. Brain Res., 533: 321–323.
- Ojima K., Takahashi T., Matsumoto S., Takeda M., Saiki C.H., Mitsuhashi F., 1997. Angioarchitectural structure of the fungiform papillae on rabbit tongue anterodorsal surface. Ann. Anat., 179: 329–333.
- Okada S., Schraufnagel D.E., 2005. Scanning elektron microscopic structure of the lingual papillae of the common opossum (*Didelphis marsupialis*). Microsc. Microanal., 11: 319–332.
- Shao B., Long R., Ding Y., Wang J., Ding L., Wang H., 2011. Morphological adaptation of yak (*Bos grunniens*) tongue to the foraging environment of the Qinghai-Tibetan Plateau. J. Anim. Sci., 88: 2594–2603.
- Silva M.C.P., Watanabe I., Kronka. M.C., 2002. Three-dimensional architecture of the connective tissue core and surface structures of the lingua papillae in the rabbit. Histol. Histopathol., 17: 455–461.



- State F.A., El-Eishi H.I., Naga I.A., 1974. The development of taste buds in the foliate papillae of the albino rat. *Acta Anat.*, 89: 452–460.
- Toprak B., Ilmaz Y., 2007. Investigations on postnatal development of the foliate papillae of the tongue by the light and scanning electron microscopy in the white laboratory mice. *Revue Med. Vet.*, 158 (10): 479–482.
- Utiyama C., Watanabe L., König B. jr., Koga L.Y., Semprini M., Tedesco R.C., 1995. Scanning electron microscopic study of the dorsal surface of the tongue of *Calomys callosus* mouse. *Ann. Anat.*, 177: 569–572.
- Whitehead M.C., Kachele D.L., 1994. Development of fungiform papillae, taste buds, and their innervation in the hamster. *J. Comp. Neurol.*, 340: 515–530.
- Yoshimura K., Hama N., Shindo J., Kobayashi K., Kageyama I., 2009. Light and scanning electron microscopic study on the tongue and lingual papillae of the common hippopotamus, *Hippopotamus amphibious amphibious*. *Anat. Rec.*, 292: 921–934.

## MORPHOGENESIS OF FOLIATE PAPILLAE ON THE RABBIT TONGUE (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS F. DOMESTICA*)

### Summary

In this study was undertaken to examine the morphogenesis of foliate papillae on the rabbit tongue, *Oryctolagus cuniculus f. domestica*. The first symptoms of formation of the rudiments of foliate papillae were observed at day 22 of prenatal development of the rabbit. They were consisted of some parallel primary epithelial streaks. The connective tissue core was formed by broken folds. At day 26 of prenatal development study showed the secondary epithelial streaks. The Folds of connective tissue were unbroken. Starting from day 1 of postnatal life of the rabbit, the connective tissue core of each folium of foliate papillae was formed by three folds – one central fold and two lateral folds. These folds were arranged between epithelial streaks. The individual folia of foliate papillae were arranged parallel to one another and separated by clear furrows. Developing papillae composed from 15 to 21 folia of the foliate papillae.

KEY WORDS: foliate papillae, development, LM, SEM



**Justyna Śpiewak, Ewelina Jagła, Maciej Dobrowolski,  
Olga Łowicka, Henryk Geringer de Oedenberg**

**ANALIZA PARAMETRÓW MORFOMETRYCZNYCH I MASY  
CIAŁA PRZY URODZENIU ŻREBIĄT CZYSTEJ KRWI  
ARABSKIEJ Z SK MICHAŁÓW W LATACH 1995–2009**

**MORPHOMETRIC PARAMETERS ANALYSIS OF ARABIAN  
FOALS BORN IN MICHAŁÓW STUD IN 1995–2009**

*Zakład Hodowli Koni i Jeździectwa, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
Department of Horse Breeding and Horse Riding, Wrocław University of Environmental  
and Life Sciences*

Konie czystej krwi arabskiej, podobnie jak inne rasy, podlegają stałym wpływom selekcyjnym, co przy specyficznych warunkach środowiskowych daje różne efekty fenotypowe, w tym również pokrojowe. Kłaczki w porównaniu z samicami innych udomowionych gatunków zwierząt odznaczają się mniejszą wydajnością reprodukcyjną (Engelken 1999, Wieczorek 2001, Kosiniak-Kamysz, Wierzbowski 2004). Kilka czynników wykazuje wpływ na poziom reprodukcyjności. Jest nim wiek, gdyż wraz z jego wzrostem współczynnik reprodukcyjności maleje, a wzrasta współczynnik strat źrebiąt (Sanderson i Allen 1987, Morris i Allen 2002, Allen i wsp. 2007, Hearn i wsp. 1993, Bosh i wsp. 2009, Bruck i wsp. 1993).

Celem niniejszej pracy było określenie, w jaki sposób takie czynniki reprodukcyjne jak wiek kłaczki, długość trwania ciąży i płeć źrebięcia mają wpływ na wymiary i masę ciała źrebiąt czystej krwi arabskiej przy urodzeniu.

SŁOWA KLUCZOWE: Stadnina Michałów, pomiary morfometryczne, źrebięta rasy arabskiej

## **MATERIAŁ I METODY**

Badaniami objęto 1067 źrebiąt czystej krwi arabskiej urodzonych w Stadninie Koni Michałów w latach 1995–2009. Z dokumentacji hodowlanej prowadzonej przez stadnię zostały pozyskane informacje odnośnie źrebiąt, takie jak: masa ciała źrebięcia po urodze-

---

Do cytowania – For citation: Śpiewak J., Jagła E., Dobrowolski M., Łowicka O., Geringer de Oedenberg H., 2013. Analiza parametrów morfometrycznych i masy ciała przy urodzeniu źrebiąt czystej krwi arabskiej z SK Michałów w latach 1995–2009. Zesz. Nauk. UP Wroc., Biol. Hod. Zwierz., LXVIII, 593: 27–31.

niu, wysokość w kłębie, obwód klatki piersiowej i obwód nadpęcia. Obliczono indeksy kościistości i obwodu klatki piersiowej (masywności) (Walkowicz i Jodkowska 2001).

Dane zostały poddane analizie statystycznej w programie Statistica 10.0. Do określenia wpływu długości ciąży, płci źrebięcia oraz wieku klaczy na uzyskane pomiary i indeksy biometryczne posłużono się jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA), zaś istotności różnic pomiędzy grupami określono testem Duncana.

Pod względem czasu trwania ciąży zostały podzielone na pięć podgrup: bardzo krótka (<314 dni), krótka (314–327 dni), normalna (328–338 dni), długa (339–348 dni) oraz bardzo długa (>348 dni). Dodatkowo klacze zostały podzielone na grupy wiekowe według następującego schematu: 3–6 lat (grupa I), 7–10 lat (grupa II), 11–15 lat (grupa III) i >15 roku życia (grupa IV) w momencie krycia.

## WYNIKI I OMÓWIENIE

W wyniku przeprowadzonych analiz odnotowano, że zarówno długość ciąży, jak i wiek klaczy wpływają znacząco na wskaźniki morfometryczne i masę ciała źrebiąt (tab. 1). Masa ciała źrebiąt klaczy najmłodszych po urodzeniu była istotnie niższa w porównaniu ze źrebiętami klaczy pozostałych grup. Podobne wyniki badań uzyskał Hintz i wsp. (1979) u rasy xx, wskazując, że klacze poniżej 7. roku życia rodzą źrebięta statystycznie istotnie lżejsze w porównaniu ze źrebiętami klaczy starszych.

Wysokość w kłębie źrebiąt klaczy najstarszych była istotnie wyższa w porównaniu ze źrebiętami klaczy pozostałych grup, przy czym źrebięta klaczy najmłodszych były również wysoko istotnie mniejsze w porównaniu ze źrebiętami klaczy grup II i III.

Obwód klatki piersiowej źrebiąt klaczy grup I i IV był wysoko istotnie niższy w porównaniu z jej obwodem źrebiąt grup II i III.

Obwód nadpęcia był z kolei wysoko istotnie większy u źrebiąt klaczy grupy IV w porównaniu ze źrebiętami klaczy grup I i II. Ogólnie obwody nadpęcia były większe w sposób istotny lub wysoko istotny u źrebiąt klaczy grup I–IV. Konsekwencją wymiarów był istotnie niższy indeks obwodu klatki piersiowej źrebiąt klaczy grupy IV w porównaniu ze źrebiętami klaczy grup I, II i III. Nie stwierdzono natomiast różnic istotnych w indeksach kościistości źrebiąt klaczy z rozpatrywanych grup.

Stwierdzono istotny i wysoko istotny wpływ długości trwania ciąży na masę ciała po urodzeniu oraz wskaźniki morfometryczne źrebiąt czystej krwi arabskiej. Wysoko istotnie lżejsze rodziły się źrebięta z ciąż bardzo długich w porównaniu z pozostałymi grupami. Istotnie i wysoko istotnie niższe w kłębie rodziły się źrebięta z ciąż bardzo krótkich w porównaniu ze źrebiętami z ciąż o normalnej długości, długich i bardzo długich. Z kolei obwód klatki piersiowej wysoko istotnie większy stwierdzono u źrebiąt z ciąż bardzo krótkich w porównaniu ze źrebiętami z ciąż pozostałych grup. Obwód nadpęcia natomiast był istotnie i wysoko istotnie większy u źrebiąt z ciąż krótkich, normalnych i długich w porównaniu ze źrebiętami z ciąż bardzo krótkich i bardzo długich. Konsekwencją różnic w wymiarach był wysoko istotnie większy indeks klatki piersiowej źrebiąt z ciąż bardzo krótkich w porównaniu z pozostałymi grupami. Wysoko istotnie i istotnie większe indeksy kościistości stwierdzono u źrebiąt z ciąż krótkich i normalnych w porównaniu z ciążami bardzo długimi.

Tabela1  
Table 1

Parametry morfometryczne źrebiąt czystej krwi arabskiej z SK Michałów urodzonych w latach 1995–2009  
Analysis of morphometric parameters and body indexes of pure arabian horses borned in Michałów Stud in 1995–2009

	Liczba (N) Number	Masa ciała (kg) Body weight		Wysokość w kłębie (cm) Height at withers		Obwód klatki piersiowej (cm) Chest circumference		Obwód nadpięcia (cm) Cannon circumference		Indeks obwodu klatki piersiowej (%) Chest circumference index		Indeks kościistości Borinim (%) Borinim index	
		X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
Grupa wiekowa klaczy – Mare age category													
I (3–6 lat/years)	447	42,07 <sup>A</sup>	18,05	95,79 <sup>Aa</sup>	4,53	82,60 <sup>A</sup>	4,47	10,64 <sup>Bb</sup>	0,59	86,41 <sup>A</sup>	6,08	11,13	0,58
II (7–10 lat/years)	407	45,76 <sup>B</sup>	4,16	97,15 <sup>AcB</sup>	4,95	84,31 <sup>B</sup>	3,95	10,82 <sup>BcCa</sup>	0,65	87,03 <sup>A</sup>	6,50	11,14	0,57
III (11–15 lat years)	168	46,35 <sup>B</sup>	4,83	97,93 <sup>C</sup>	4,88	84,11 <sup>B</sup>	3,85	10,98 <sup>AcC</sup>	0,71	86,08 <sup>A</sup>	5,68	11,22	0,60
IV (>15 lat/years)	42	45,88 <sup>B</sup>	4,19	99,55 <sup>B</sup>	3,50	82,64 <sup>A</sup>	3,15	11,10 <sup>A</sup>	0,63	83,05 <sup>B</sup>	2,82	11,15	0,54
Kategoria długości trwania ciąży – Pregnancy period category													
Bardzo krótka Very short (<314 dni/days)	16	44,88 <sup>A</sup>	3,22	94,81 <sup>Aa</sup>	4,74	86,44 <sup>A</sup>	2,85	10,48 <sup>Aa</sup>	0,49	91,36 <sup>A</sup>	5,20	11,06	0,47
Krótką – short (314–327 dni/days)	368	44,48 <sup>A</sup>	4,82	95,89	4,65	83,57 <sup>B</sup>	4,28	10,76 <sup>bC</sup>	0,66	87,34 <sup>B</sup>	6,13	11,23 <sup>A</sup>	0,56
Normalna – Normal (328–338 dni/days)	493	44,75 <sup>A</sup>	4,66	97,21 <sup>b</sup>	4,88	83,59 <sup>B</sup>	4,09	10,81 <sup>bd</sup>	0,64	86,20 <sup>B</sup>	6,14	11,13 <sup>a</sup>	0,57
Długa – Long (339–348 dni/days)	155	43,07	4,95	97,79 <sup>B</sup>	4,50	82,98 <sup>B</sup>	3,97	10,85 <sup>Bb</sup>	0,66	85,024 <sup>B</sup>	5,65	11,11	0,62
Bardzo długa very long (>348 dni/days)	32	41,47 <sup>B</sup>	6,41	97,16 <sup>b</sup>	5,44	82,38 <sup>B</sup>	6,02	10,54 <sup>acd</sup>	0,61	84,911 <sup>B</sup>	6,23	10,87 <sup>Bb</sup>	0,66
Płeć źrebięcia – Sex of foal													
Klacz – Mare	545	44,19	4,80	96,70	4,87	83,54	4,04	10,71 <sup>A</sup>	0,64	86,61	6,10	11,09 <sup>A</sup>	0,57
Ogier – Stallion	519	45,15	16,82	96,91	4,76	83,45	4,39	10,86 <sup>B</sup>	0,65	86,31	6,17	11,22 <sup>B</sup>	0,57

A, B – średnie wartości oznaczone różnymi literami różnią się wysoko istotnie w kolumnach przy p ≤ 0,01

A, B – means marked with the different letter differ high significantly in columns at p ≤ 0,01

a, b – średnie wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie w kolumnach przy p ≤ 0,05

a, b – means marked with the different letter differ significantly in columns at p ≤ 0,05

Z badań własnych oraz według Purzyc i wsp. (2011) wynika, że przy urodzeniu dymorfizm płciowy u źrebiąt jest słabo zaznaczony. Płeć źrebięcia spowodowała wysoko istotnie większy obwód nadpęcia ogierków i co się z tym wiąże – wysoko istotnie większy indeks kościistości ogierków w porównaniu z klaczkami. Natomiast badania Purzyc i wsp. (2007) przeprowadzone na koniach rasy huculskiej nie wykazały istotnych różnic w tym względzie. Pozostałe parametry u klaczek i ogierków w całej populacji nie różniły się istotnie, mimo że ogierki były cięższe i wyższe, a klaczki miały większy indeks i obwód klatki piersiowej. Według Hintza i wsp. (1979) oraz Yamamoto i wsp. (1993) ogierki odznaczają się wyższymi wartościami morfometrycznymi, również większym w stosunku do klaczek obwodem nadpęcia.

## PODSUMOWANIE

W wyniku przeprowadzonych badań można zauważyć, iż źrebięta czystej krwi arabskiej hodowane w SK Michałów z ciąży bardzo krótkiej były wysoko istotnie niższe w porównaniu ze źrebiętami z ciąży długich oraz istotnie od źrebiąt z ciąży normalnych i bardzo długich. Ponadto źrebięta z ciąży bardzo długich charakteryzowały się wysoko istotnie niższą masą ciała w porównaniu z tymi z pozostałych grup. Jednocześnie analizy wskazują, że klacze najmłodsze rodzą źrebięta o wysoko istotnie niższej masie ciała, obwodzie klatki piersiowej i wysokości w kłębie. Należy także zauważyć, że klacze w wieku powyżej 15. roku życia rodzą źrebięta charakteryzujące się wysoko istotnie niższą wartością indeksu obwodu klatki piersiowej.

## PIŚMIENNICTWO

- Allen W.R., Brown L., Wright M., Wilsher S., 2007. Reproductive efficiency of flatrace and national hunt Thoroughbred mares and stallions in England. *Equine Vet. J.*, 39: 438–445.
- Bosh K.A., Powell D., Shelton B., Zent W.W., 2009. Reproductive performance measures among Thoroughbred mares in central Kentucky during the 2004 mating season. *Equine Vet. J.*, 41: 883–888.
- Bruck I., Anderson G.A., Hyland J.H., 1993. Reproductive performance of Thoroughbred mares on six commercial stud farms. *Aust. Vet. J.*, 70: 299–303.
- Engelken T.J., 1999. Reproductive health programs for beef: analysis of records for assessment of reproductive performance [in:] Youngquist, R.S. (Ed.) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia: 451–456.
- Hearn P., Bonnett B., Samper J., 1993. Factors influencing pregnancy and pregnancy loss on one thoroughbred farm. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*: 161–163.
- Hintz R.L., Hintz H.F., Van Vleck L.D., 1979. Growth rate of thoroughbreds. Effect of age of dam, year and month of birth, and sex of foal. *Faculty Papers and Publications in Animal Science*: 338.
- Kosiniak-Kamysz K., Wierzbowski S., 2003/2004. *Rozród koni*. DRUKROL, Kraków.
- Morris L.H.A., Allen W.R., 2002. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Vet. J.*, 34: 51–60.
- Purzyc H., Kobryń F., Bojarski J., 2010. Sexual dimorphism in Hucul horses using discriminant analysis. *Animal*, 5, 4: 506–511.

- Purzyc H., Kobryń H., Komosa M., Bojarski J., 2007. Ocena eksterieru konia huculskiego na podstawie wybranych wskaźników morfometrycznych (część 1). *Acta Sci. Pol. Medicina Veterinaria*, 6: 49–64.
- Sanderson M.W., Allen W.R., 1987. Reproductive efficiency of Thoroughbred mares in the United Kingdom [in:] Huntingdon T., (ed.) *Proceedings of Bain-Fallon Memorial Lectures*. Aust. Equine Vet. Assoc., Sydney.
- Walkowicz E., Jodkowska E., 2001. Hodowla i chów koni – przewodnik do ćwiczeń, Wrocław.
- Wieczorek M., 2001. Niepłodność klaczy uwarunkowana genetycznie. *Koń Polski*, 5: 48–49.
- Yamamoto O., Asai Y., Kusunose R., 1993. Effects of sex, birth month, parity, weight of dam and farm on the growth of Thoroughbred foals and yearlings. *Anim. Sci. Technol.*, 64: 91–498.

## **MORPHOMETRIC PARAMETERS ANALISYS OF ARABIAN FOALS BORN IN MICHAŁÓW STUD IN 1995–2009**

### **S u m m a r y**

The aim of this study was to determine the relations between some reproduction rates like age of mare, duration of pregnancy and gender of foal and morphometric parameters of nursing Arabian Horses.

The study included 1067 foals born in Michałów Stud during the years 1995–2009. From breeding's documentations results of morphometric measurements such as body weight, height at withers, chest circumference, cannon circumference were obtained. We estimated index of girth's chest circumference and index of boniness according to Walkowicz and Jodkowska (2001).

Data were analyzed in Statistica 10.0 program using univariate analysis of variance (ANOVA). Statistical significance of results was determined with Duncan test.

Our experimental data suggest that foals from short pregnancy were lower in weight but more massive than foals from long pregnancy and very long pregnancy. Simultaneously our analysis indicated that younger mares give birth foals which have the lowest body weight, height at withers and chest circumference.

**KEY WORDS:** Michałów Stud, morphometric parameters, Arabian foals





**Zuzanna Zaik**

**CRYOPRESERVATION OF CANADA GOOSE  
(*BRANTA CANADIENSIS* L.) SEMEN**

**KRIOKONSERWACJA NASIENIA BERNIKLI KANADYJSKICH  
(*BRANTA CANADIENSIS* L.)**

*Department of Animal Nutrition and Feed Management, Wrocław University  
of Environmental and Life Sciences*

*Katedra Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

The aim of this study was to evaluate the use of Canada goose (*Branta canadensis* L.) sperm cryopreservation method in the case of White Kołuda® gander semen. Tests were performed on 7 *Branta canadensis* L. geese aged between 4 to 10 years. Semen was collected by dorso – abdominal massage, and then pooled ejaculate was diluted with EK diluents in the ratio of 1:0.5. Then the diluted semen was cooled at 4°C for 15 minutes. Next the dimethylformamide (DMF) of a final concentration of 6% was added to the semen. After the addition the covering agent the semen hoisted to 0.25 ml straws and equilibrated for 5 minutes at 4°C. Freezing of sperm took place in cryogenic chamber at a speed of 60°C/min from 4°C to -140°C, and then the straws of the semen were moved into liquid nitrogen (-196°C), to the deep freeze.

After freezing – thawing of semen a decrease in morphological quality of semen was observed. The average share of total live spermatozoa in the unfrozen semen decreased significantly ( $P < 0.05$ ) by 29.8 percentage points, as well as properly shaped spermatozoa (PSS) average share of 17.5 percentage points.

Sperm cryopreservation method used by Canada goose in relation to fresh semen, resulted in reduction of the share in total live spermatozoa and properly shaped ones, but the share of these categories in the frozen – unfrozen sperm (respectively 54.7 and 27.6%) can be considered as promising, giving rise to a eggs fertilization after the insemination.

KEY WORDS: Canada goose, semen quality, semen cryopreservation

## INTRODUCTION

Increase in the interest of cryopreservation of bird semen is highly related to the rise in importance of artificial insemination as one of the method of breeding of birds. Origins

---

For citation – Do cytowania: Zaik Z., 2013. Cryopreservation of Canada goose (*Branta canadensis* L.) semen. Zesz. Nauk. UP Wroc., Biol. Hod. Zwierz., LXVIII, 593: 33–48.

of the artificial insemination in birds date back to 1937 when Burrows and Quinn elaborated the method of semen collection from roosters and turkeys, and insemination of these species. One of the manners to breed birds is an artificial insemination that can be applied to every species of poultry as well as to wildfowl.

Nowadays, artificial insemination is widely used in turkeys and chickens reared for meat. It is most of all caused by a significant difference between male and female body mass and in consequence, low indices of fertilized eggs. Besides, this kind of insemination is applicable when: there are not enough males to cause a natural mating, it is crucial to obtain the maximal number of the progeny after a valuable breeder, it is necessary to be independent of sex drive occurring in different periods of reproductive season and to eliminate preferences in mating, it is needed to overcome periodical decrease in fertilization, mating between species takes place (e.g. between Pekin duck and Muscovy Duck), reproductive flock is kept in a cage. It should be mentioned that artificial fertilization can prevent diseases transmitted by natural mating from spreading (Chełmońska 1980, Łukaszewicz 2002, Sellier et al. 2005).

The process of the cryopreservation consists of four related stages, as follows: dilution of the semen with species and accordant thinner (Chełmońska et al. 2006a, Łukaszewicz 2002), choosing of the concentration and time of exposure to cryoprotectant (equilibration time) (Chełmońska et al. 2006b, Łukaszewicz and Fujihara 2000), rapidity of temperature decreasing during freezing (Łukaszewicz 2002, Kowalczyk 2008), temperature and time of semen defrosting (Ostaszko 1971). Undiluted bird semen, stored *in vitro*, loses its fertilizing capacity very fast (Christensen 1995). According to Wambeke (1972) fertilizing capacity of unthinned semen of roosters kept for 3 hours at 2°C is reduced by 40%. That is why freshly collected sperm should be diluted, with use of an adequate thinner, as soon as possible. So it is important to use, during storage, such a thinner which will provide the highest possible fertilizing capacity (Lake 1960). During cryopreservation, besides thinners, a cryoprotectant is needed. Its main purpose is dehydration of sperm cells which protects them from destructive results of hyperosmotic and thermic shock (Blanco et al. 2000). There can be distinguished two groups of cryoprotective medium: the first, low molecular, that are able to go through plasma membranes of the cells to be frozen (e.g. glycerol, ethylene glycol, dimethylacetamide, dimethylformamide) and the second, also structured of small particles, but without ability of cell membrane penetration (e.g. polyvinylpyrrolidone, polyethylene glycol). Cryoprotectants are to inhibit or reduce freezing damages that occur due to ice formation, out of cells and in the sperm cytoplasm. It is possible thanks to their ability to bind water particles. Penetration of water and electrolytes among the sperm and the external environment causes damages in plasma membrane (Blanco et al. 2000, Papis 1997). An important element for the success of cryopreservation is choosing an adequate amount of the cryoprotectant and its time of exposure (time of equilibration) to the sperm. The time should be long enough to enable the penetration of the sperm by the cryoprotectant but not too long to avoid its toxic effect on the sperm (Blanco et al. 2000).

Łukaszewicz maintains (2002) that there is a close relationship between the thinner used, the protective efficacy of some means of shielding and the pace of semen freezing. Gee and Sexton (1990) froze the semen of the Aleutian Canada goose (*Branta canadensis* L.) at 6 or 7% concentration of the DMSO cryoprotectant (dimethylsulfoxide) with the initial speed of 1°C/min up to a temperature of -20°C, than with 50°C/min, up to a temperature of -8°C, than with 160°C/min, until a temperature of -196°C. After the thawing there was

46.7% of living sperms, and after the insemination of females a percentage of fertilized eggs ranged from 12 to 31%.

## MATERIAL AND METHODS

The research was carried out in the experimental facility of the Poultry Breeding Department, Wrocław Environmental and Life Science, Poland. The studies lasted from 31 March to 15 May. The time included a period of geese to get accustomed to the procedure of ganders semen collection (catching, dorso – abdominal massage – first 3 weeks and checking the quality of semen and its cryopreservation – another 6 weeks). The reproductive cycle was divided into three periods, which lasted: I period – 8 days, II period – 17 days, III period – 8 days.

The material consisted of 7 ganders of *Branta Canadensis* L. Four of the birds (4 years old) came from the private breeding facility located in Jarnołtówek near Glucholązy and the three individuals (10 years old) were from the zoo in Opole.

Semen was collected by dorso – abdominal massage twice a week (Tuesday and Friday morning). Activities for the collection of semen in each case were carried out by the same persons. Semen was collected into the glass test-tube, which shape and size was adapted to the shape of the gander copulating organ. Each sample was evaluated in terms of purity (presence of faeces, urine and blood). During cryopreservation process – semen samples were combined in test tubes with an automatic pipette and mixed in order to obtain a homogeneous sample. Each time the males were subjected to individual assessed of the reaction rate on the dorso – abdominal massage and the semen was evaluated by macroscopic and microscopic methods.

### Macroscopic and microscopic evaluation of the semen

To the macroscopic evaluation of semen were:

- the semen volume (determined by using an automatic pipette with an accuracy of 0.01 ml),
- color of the semen (light or dark gray),
- consistency of the semen (sparse, consistent – without jelly addition).

To the microscopic evaluation of semen were the concentration of the semen was assessed by using a Potain mixer and a Thom Zeiss table. Morphological assessment of the semen was based on the cytological preparations. The analysis was based on morphological assessment (under the microscope) 300 spermatozooids per the sample of the semen, placed in one of eight categories (tab. 2). Motility was estimated by using the hanging drop method at 400 × magnification (Bakst and Cecil 1997).

### Semen quality index (SQI\*)

Semen quality index (SQI) determines reproductive suitability of an individual by more complex analysis of the collected semen. Semen quality index values were calculated according to the following equation (Łukaszewicz and Kruszynski 2003):

$$*SQI = \frac{\text{ejakulate semen volume (ml)} \times \text{semen concentration (n} \times 10^6 \text{ ml)} \times \text{live sperm cells, properly shaped (\%)}}{100\%}$$

$$WJN = \frac{\text{objętość ejakulatu (ml)} \times (\text{n} \times 10^6 \text{ ml}) \times \text{prawidłowe plemniki (\%)}}{100\%}$$

### Dilution of the semen

EK diluent (tab. 1) has been used to dilute fresh semen before freezing. Diluent was at room temperature (about 20°C) and it was added to the semen in a ratio of 1:0.5. The diluted semen was cooled at 4°C for 15 minutes. Next the 6% dimethylformamide (DMF) was added to the semen. After the addition the covering agent the semen was draw into 0.25 ml straws and equilibrated for 5 minutes at 4°C. Freezing of the semen took place in cryogenic chamber at a speed of 60°C /min from 4°C to -140°C, and then the straws of the semen were moved into liquid nitrogen (-196°C), to the deep freeze.

Table 1  
Tabela 1

The chemical composition of the diluent EK  
Skład chemiczny rozcieńczalnika EK

Components Komponenty	Diluent EK Rozcieńczalnik EK
Monosodium glutamate Glutaminian sodu	1.4
Potassium citrate × H <sub>2</sub> O Potassium citratex × H <sub>2</sub> O	0.14
Glucose Glukoza	0.7
D – Fructose D – Fruktaza	0.2
Inositol Inozytol	0.7
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	0.1
Protamine sulphate Siarczan protaminy	0.02
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.98
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.21

### Thawing the semen

Frozen samples were thawed in a water bath at 60°C for about 3–5 seconds. After the defrosting both ends of the straws were cut off and the semen was poured into the test tubes.

### The description of statistical results

The results of the evaluation of semen quality of fresh and frozen – thawed analyzed statistically using ANOVA and the significance of differences was determined using Duncan's test using Statistica, version 7.1

## RESULTS

## Evaluation of male's reaction to semen collection

Table 2  
Tabela 2Evaluation of the response to dorso-abdominal massage (n = 11)  
Ocena reakcji samców na zabieg masażu grzbietowo-brzuszego (n = 11)

Period Okres	Number of individual Nr osobnika	352	353	354	355	356	889	1138	% of positive reactions/each day % pozytywnych reakcji/dzień
	Date of collection Data pobrania materiału								
I	31.03.09	+++	+++	+++*	+++!	+++!	+++	+++	71.42
	3.04.09	+++	++	+++	+++!	+++!	+++	+++	57.14
	7.04.09	++	+++	+++*	+++!	+++!	+++	+++	57.14
	10.04.09	a.s	a.s	+++	a.s	+++	a.s	a.s	28.57
II	14.04.09	a.s	+++!	++	+++	+++!	+++	+++	85.71
	17.04.09	a.s	++	+++	+++*	+++	+++	+++	57.14
	21.04.09	a.s	+++	+++	+++!	+++	+++	a.s	57.14
III	27.04.09	a.s	+++	++	+++	+++	a.s	+++	71.42
	30.04.09	a.r	+++	+++	+++	+++	++	a.s	57.14
	5.05.09	++	a.s	+++	+++!	+++	a.r	+++	71.52
	8.05.09	a.s	+++!	+	+++	+++	+	+++	57.14
% of positive reactions/the whole cycle % pozytywnych reakcji/cykl		18.18	81.81	45.45	81.81	100	27.27	72.72	61.04

Data contained in columns should be analyzed as a result obtained from particular males. Verses contain scores gained from all males on given day of the research.

Dane przedstawione w kolumnach należy analizować jako wynik uzyskany od każdego samca indywidualnie. Dane przedstawione w wierszach należy analizować jako wynik uzyskany od wszystkich samców w danym dniu badawczym.

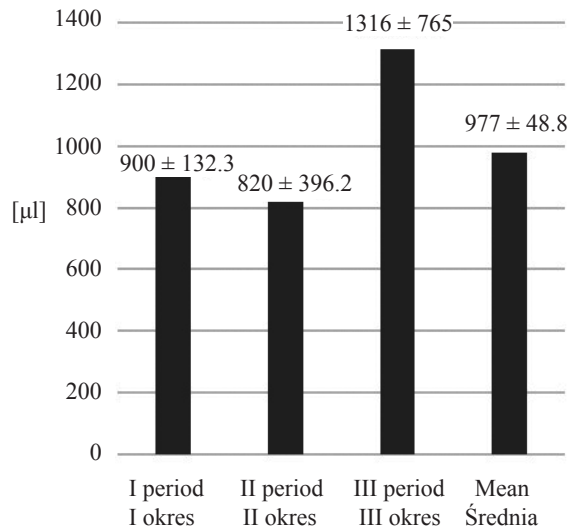
Legend: +++! – very immediate reaction of gander (below 60 sec.), semen clear, without urine and blood; +++ – immediate reaction of gander (to 60 sec.), semen clear, without urine and blood; ++ – fast reaction of gander (above 60 sec.), semen clear, without urine and blood; + – slow reaction of gander, semen clear, without urine and blood; +\* – very slow reaction of gander, semen contaminated, ejaculated into feathers; a.r – no response to massage, no semen; a.s – normal reaction, the absence of semen.

Objaśnienie tabeli 2: +++! – bardzo szybka reakcja samca (poniżej 60 sek.), nasienie czyste, bez domieszek kała-moczu i krwi; +++ – szybka reakcja samca (do 60 sek.), nasienie czyste, bez domieszek kała-moczu i krwi; ++ – szybka reakcja samca (powyżej 60 sek.), nasienie czyste, bez domieszek kała-moczu lub krwi, + – bardzo wolna reakcja samca, nasienie czyste, bez domieszek kała-moczu lub krwi, +\* – bardzo wolna reakcja samca, nasienie zanieczyszczone, oddane w pióra; a.r – brak reakcji samca na masaż, brak nasienia; a.s – dłuższy okres pobudzenia samca, erekcja bez ejakulacji.

According to Łukaszewicz (2002), very important stage of dealing with males, semen donors, is to assess the stage of development of copulatory organ and the rapidity of response to the dorso – abdominal massage. In the research conducted, gaining of a clear semen, free from faeces and blood (+++! +++ or ++), was regarded as a positive result. The weakest reactions to the massage, total of 18.2%, were stated in case of male number 352 whereas male number 356 showed 100% of positive responses. During all reproductive period 77 attempts to collect semen were done, of which as many as 61% resulted in gaining valuable ejaculates.

### Factors affecting the quality of semen

An important factor conditioning the success of the storage of liquid or frozen semen is the quality of the ejaculate, which depends on: the species and the race (Chełmońska 1972), age of males (Łukaszewicz 2002), reproductive period (Łukaszewicz 2002), habituation to catching, technique and frequency of sperm collecting (Grunder and Pawluczyk 1991, Łukaszewicz 2000), living conditions (access to pools and runs), individual characters of males (Gee and Temple 1978).

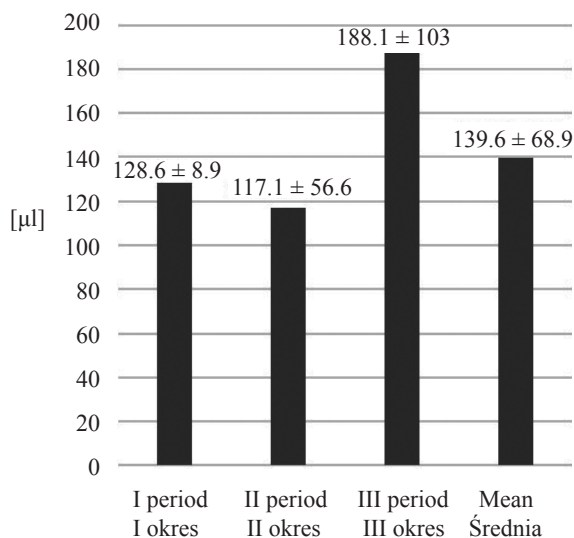


Graph 1. Mean volume of the ejaculate gained collectively from males during particular periods of the reproductive cycle and an average of all collections (n = 11;  $\bar{x}$   $\bar{x} \pm SD$ )

Wykres 1. Średnia objętość nasienia uzyskana zbiorczo od samców w poszczególnych okresach sezonu reprodukcyjnego oraz średnia wszystkich pobrań (n = 11;  $\bar{x}$   $\bar{x} \pm SD$ )

There were no significant differences in semen amount between studied periods. The lowest volume was stated in the uppermost stage of the reproduction cycle (820.0 µl) while the highest – in the terminal phase (1316.6 µl). The mean lot of semen of whole reproduction period was 997.2 µl (graph 1). Calculating the average volume of semen obtained from an individual in the test periods of the reproductive season, insignificant variations were observed. The lowest mean amount of sperm was noticed in the uppermost stage of the reproduction cycle (188.1 µl). The average of all reproductive period

was 139.6  $\mu\text{l}$  (graph 2). Chrzanowska and Kochanowski (2004) obtained from Canada goose male an average of 53.3  $\mu\text{l}$  of semen which was lower, by 86.3  $\mu\text{l}$ , than results of present study. The amount of ejaculate collected from the Graylag goose (*Anser anser* L.) was lower as compared to the mentioned in the research and ranged from 7.5 to 70  $\mu\text{l}$  (Chrzanowska and Kochanowski 2004, Łukaszewicz et al. 2004). On the other hand, comparing semen lots from Canada goose males to Biała Kołodzka<sup>®</sup> (deriving from the Graylag goose), higher volume of ejaculate (by 57  $\mu\text{l}$ ) was stated (Łukaszewicz 2002).



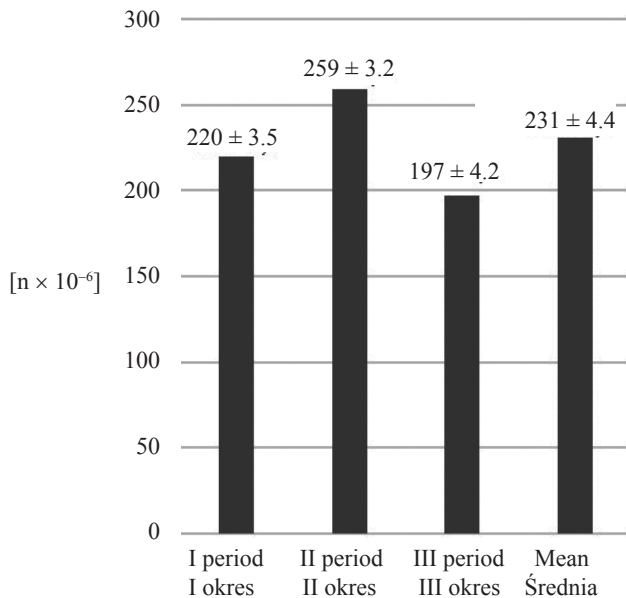
Graph 2. Mean semen volume\* gained from the individuals in particular periods of the reproductive cycle and an average of all collections ( $n = 11$ ;  $\bar{x} \pm \text{SD}$ )

Wykres 2. Średnia objętości nasienia\* uzyskana od osobnika w poszczególnych okresach sezonu reprodukcyjnego oraz średnia wszystkich pobrań ( $n = 11$ ;  $\bar{x} \pm \text{SD}$ )

\*Semen volume (in  $\mu\text{l}$ ) collected from the individual was calculated by dividing the mean lot gained on given day by total amount of donors.

\*Objętość nasienia (w  $\mu\text{l}$ ) pobrana od jednego osobnika została wyliczona, dzieląc średnią objętość uzyskaną w danym dniu przez liczbę samców oddających nasienie.

The mean concentration of sperm cells in Canada goose's semen during all test period amounted  $231 \times 106/\text{ml}$ , ranging insignificantly from 197 to  $259 \times 106/\text{ml}$  (graph 3). Gee and Sexton (1990) evaluating the semen of Aleutian Canada goose (*Branta canadensis* L). also stated fluctuations in sperm cells concentration depending on reproductive cycle phase. Namely, in the beginning it was from 35 to  $350 \times 106/\text{ml}$ , while increased to  $920 \times 106/\text{ml}$  during the climax. Chrzanowska and Kochanowski (2004) indicated in Canada goose higher sperm cells concentration than showed in the study. The mean difference was  $80 \times 106/\text{ml}$ . Also Gee and Temple (1978) obtained higher concentration of sperm cells in Aleutian Canada goose, by  $109 \times 106/\text{ml}$ . Whereas the semen of the Graylag goose was characterized by lower sperm cells concentration, by  $147 \times 106/\text{ml}$  (Łukaszewicz et al. 2004).



Graph 3. Mean concentration of sperm cells gained collectively from the individuals in articular stages of the reproductive cycle and an average of all collections (n = 11;  $\bar{x}$   $\bar{x} \pm SD$ )  
 Wykres 3. Średnia koncentracja nasienia uzyskana zbiorczo od samców w poszczególnych okresach sezonu reprodukcyjnego oraz średnia wszystkich pobrań (n = 11;  $\bar{x}$   $\bar{x} \pm SD$ )

The fraction of the live sperm cells revealed in the research was 84.5% on average and varied significantly ( $P < 0.05$ ) from the fraction of 74.1% in the terminal stage of reproductive cycle (III) and 90.2% at the climax (II) (tab. 3). As compared to the results showed, Gee and Sexton (1990) stated higher part of live sperm cells in Aleutian Canada goose semen, by 8.4%, and Chrzanowska and Kochanowski (2004), by 13.7%, in Canada goose. In the case of the Graylag goose the share of living sperm cells was 97.2%. Also Łukaszewicz revealed higher percentage, total of 8.7%, of living sperm in the semen of Biała Kołodzka<sup>®</sup> goose.

The highest share of properly shaped sperm (PSS), 51.9%, was noticed in the I period of reproduction cycle, which was significantly higher ( $P < 0.05$ ) as compared to the average of the III period (33.6%). Mean fraction of PSS of all reproductive period was 45.1% (tab. 3). In comparison to the results presented, Gee and Sexton (1990) stated higher share of PSS in Aleutian Canada goose's semen. Chrzanowska and Kochanowski (2004) found in Canada goose's ejaculate higher part of PSS, by 31.1%, as well. Also in case of the Graylag goose, the interest of PSS was greater, by 9.0%, (Chrzanowska and Kochanowski 2004) and of Biała Kołodzka<sup>®</sup> – by 6.4% (Łukaszewicz 2002).

In this research the fraction of sperm with inflated heads ranged from 18.3 to 28.2%. No significant differences in the share of this morphological form were stated in particular test periods (tab. 3). The mean percentage of inflated head sperm cells for all reproductive period was 24.2%.



Table 3  
Tabela 3

Fraction of morphological forms in fresh semen during particular stages of reproductive period and the average of all collections (n = 11;  $\bar{x} \pm SD$ )  
 Udział form morfologicznych w nasieniu świeżym w poszczególnych okresach sezonu reprodukcyjnego oraz średnia wszystkich pobrań (n = 11;  $\bar{x} \pm SD$ )

Period Okres	Start Początek	Middle Szczyt	End Koniec	Mean Średnia
Live sperm cells total Plemniki żywe ogółem	85.3 ± 7.4	90.2 <sup>a</sup> ± 3.4	74.1 <sup>b</sup> ± 11.4	84.5 ± 9.6
Live sperm cells, properly shaped Plemniki żywe, prawidłowo ukształtowane	51.9 <sup>a</sup> ± 6.2	47.9 <sup>ab</sup> ± 4.6	33.6 <sup>b</sup> ± 2.2	45.1 ± 8.6
Sperm with inflated head Plemniki o rozdętych główkach	18.3 ± 4.2	25.3 ± 6.8	28.2 ± 6.2	24.2 ± 6.7
Sperm with defects in acrosome Plemniki ze zmianami w akrosomie	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
Sperm with broken mid piece Plemniki z załamanymi szyjkami	4.5 <sup>a</sup> ± 2.8	2.7 ± 0.6	1.3 <sup>b</sup> ± 0.6	2.8 ± 1.8
Sperm with looped heads Plemniki ze spętloną główką	2.4 ± 0.8	4.2 ± 2.2	2.1 ± 0.8	3.1 ± 1.8
Sperm with defects in connecting piece Plemniki ze zmianami we wstawce	0.7 <sup>a</sup> ± 0.7	0.0 <sup>b</sup> ± 0.0	0.0 <sup>b</sup> ± 0.0	0.2 ± 0.3
Spermatids, immature stages of sperm cells Spermatydy, niedojrzałe formy morfologiczne plemników	1.1 <sup>a</sup> ± 0.7	0.6 ± 0.5	0.0 <sup>b</sup> ± 0.0	0.6 ± 0.6
Other morphological forms Inne formy morfologiczne plemników	6.2 ± 5.3	9.4 ± 3.3	8.9 ± 9.0	8.4 ± 5.3
Dead sperm cells Plemniki martwe	14.7 ± 7.4	9.8 <sup>a</sup> ± 4.0	25.9 <sup>b</sup> ± 11.4	15.5 ± 9.5

\*Values in columns marked with different letters differ significantly (a, b –  $P \leq 0.05$ ) from each other  
 Wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie (a, b –  $P \leq 0,05$ )

As compared to the present study, Gee and Sexton (1990) indicated in Aleutian Canada goose's semen content of sperm cells with inflated heads lower by 17.5%. Chrzanowska and Kochanowski (2004) also revealed lower share of this category of sperm cells, by 16.1% in Canada goose and by 14.6% in the Graylag goose. Result for Biała Kołudzka<sup>®</sup> is comparable and amounts 26.8% (Łukaszewicz 2002). The fraction of sperm cells with broken neck ranged from 2.1% to 4.2%. No significant differences in share of this morphological form were stated in particular test periods (tab. 3.). The mean share of this kind of sperm for all reproductive period was 3.1%. Chrzanowska and Kochanowski (2004) showed higher amount of sperm cells with broken necks, by 3.1%, in Canada goose and by 5% in the Graylag goose. In Łukaszewicz's research the percentage of cells with broken neck in Biała Kołudzka<sup>®</sup> was greater by 6.5%.

The mean part of cells with broken connecting piece stated in the investigation was 0.2% and ranged significantly ( $P < 0.05$ ) in the initial (I), uppermost (II) and terminal (III) stage of the reproductive cycle (tab. 3). Gee and Sexton (1990) found in Aleutian Canada goose's 12.6% more cells with this kind of defect, whereas Chrzanowska and Kochanowski (2004) in Canada goose's semen – 5.1%. In case of the Graylag goose, sperm with

broken connecting piece accounted for 5.6% of the whole. The semen of Biała Kołodzka<sup>®</sup> was also characterized by higher, by 3.3%, share of cells with defects of connecting piece (Łukaszewicz 2002) amounted 12%. The higher part of spermatids was also revealed by Łukaszewicz (2002) in semen of Biała Kołodzka<sup>®</sup>. The difference was of 4.1%.

In comparison to the present study, Gee and Sexton (1990) indicated in Aleutian Canada goose's semen content of sperm cells with inflated heads lower by 17.5%. Chrzanowska and Kochanowski (2004) also revealed lower share of this category of cells, by 16.1% in Canada goose, and by 14.6% in the Graylag goose. Result for Biała Kołodzka<sup>®</sup> is comparable and amounts 26.8% (Łukaszewicz 2002).

The fraction of sperm cells with broken neck ranged from 2.1 to 4.2%. No significant differences in share of this morphological form were stated in particular test periods (tab. 3). The mean share of this kind of sperm for all reproductive period was 3.1%. Chrzanowska and Kochanowski (2004) showed higher amount of sperm cells with broken necks, by 3.1% in Canada goose, and by 5% in the Graylag goose. In Łukaszewicz's research the percentage of cells with broken neck in Biała Kołodzka<sup>®</sup> was greater by 6.5%.

The mean part of cells with broken connecting piece stated in the investigation was 0.2% and ranged significantly ( $P < 0.05$ ) in the initial (I), uppermost (II) and terminal (III) stage of the reproductive cycle (table 3). Gee and Sexton (1990) found in Aleutian Canada goose's semen higher fraction, by 12.6%, of cells with this kind of defect, whereas Chrzanowska and Kochanowski (2004) in Canada goose's semen – by 5.1%. In case of the Graylag goose, sperm with broken connecting piece accounted for 5.6% of the whole. The semen of Biała Kołodzka<sup>®</sup> goose was also characterized by higher, by 3.3%, share of cells with defects of the connecting piece (Łukaszewicz 2002).

Spermatids accounted for 0.6% on average of all semen investigated. The part of this kind of cells ranged significantly ( $P < 0.05$ ) in the initial stage of the reproductive period (I) – with 1.1% and the terminal (III) – with no share at all (tab. 3). In Chrzanowska and Kochanowski's (2004) study on Canada goose semen, the fraction of spermatids was comparable, while in the Graylag goose it amounted 12%. The higher part of spermatids was also revealed by Łukaszewicz (2002) in semen of Biała Kołodzka<sup>®</sup>. The difference was of 4.1%.

The fraction of other morphological forms in investigated semen was 84% on average, ranging from 6.2% in initial phase of reproductive cycle (I) to 9.4% at the climax (II) (tab. 3). Gee and Sexton (1990) revealed in Aleutian Canada goose less share of other morphological forms by 8.2%, whereas Chrzanowska and Kochanowski (2004) in Canada goose semen stated comparable percentage of other forms (10.3%). In the Graylag Goose's semen other morphological forms of sperm cell accounted for 2.7% of all. Łukaszewicz (2002) as well proved the higher fraction of cells with other morphological defects in Biała Kołodzka's<sup>®</sup> semen, which amounted 9.9%.

### **Semen quality index**

In the fresh sperm SQI for whole reproductive cycle was 14.5 and ranged from 12.5 to 14.7. There were no statistically significant differences between periods under investigation (tab. 4). Semen quality obtained by Chrzanowska and Kochanowski (2004), from Canada goose and the Graylag goose was higher and amounted – respectively 37.9 and

60.8. Comparable quality of semen to the results presented was obtained by Łukaszewicz (2002) in case of Biała Kołudzka® in which mean SQI was 31.1.

Table 4  
Tabela 4

Semen quality index in particular stages of the reproductive cycle and the mean value of all collections (n = 11;  $\bar{x} \bar{x} \pm SD$ )  
Wskaźnik jakości nasienia w poszczególnych okresach sezonu reprodukcyjnego oraz średnia wszystkich pobrań (n = 11;  $\bar{x} \bar{x} \pm SD$ )

Period of the productive cycle Okres cyklu produkcyjnego	Semen quality index (SQI) Indeks jakości nasienia (WJN)
Start Początek	14.7 ± 78.2
Middle Szczyt	14.5 ± 145.3
End Koniec	12.5 ± 72.7
Mean Średnia	14.5 ± 17.6

Basing on own results and these from other authors it can be stated that SQI of Canada goose is considerably higher as compared to other free – living geese, being at the same time similar to Biała Kołudzka®.

### Cryopreservation of semen

Besides the quality of obtained semen, another decisive factor affecting the final result is applied method of cryopreservation. In the presented research, the semen of Canada goose was preserved according to the method elaborated for Biała Kołudzka®, in which after freezing – thawing of semen and further insemination high indices of fertilized eggs and hatchability were obtained (Łukaszewicz 2002).

### Impact of cryopreservation on sperm cells morphology

After cryopreservation of Canada goose semen mean share of living sperm was after thawing 54.7%, with the lowest value of 44.6% in terminal stage of reproductive cycle (III) and the highest of 61.3% at the climax (II). An average obtained in II stage was significantly ( $P < 0.05$ ) higher as compared to the mean value from III stage (tab. 5).

Morphological analysis of frozen-thawed semen showed high percentage (54.7%) of living sperm cells in general but in comparison to the fresh semen a significant ( $P < 0.05$ ) reduction (by 29.7%) was observed (graph 4). Gee and Sexton (1990) also noticed reduction of living cells in Aleutian Canada goose's semen after the cryopreservation. The difference was 46.2% as compared to fresh sperm. Still, it has to be mentioned that during Gee's and Sexton's research on the cryopreservation, another cryoprotectant was applied (DMSO) in comparison to own research (capture 3). It is considered that dimethylsulphoxide (DMSO) at a concentration crucial to protect sperm cell during the cryopreservation becomes toxic to cells undergoing equilibration (Sexton 1981).

Also high reduction of living sperm cells fraction, by 41.4% in general, after the cryopreservation was observed by Łukaszewicz et al. (2004). While Łukaszewicz (2002) applying the method elaborated for Biała Kołudzka's® semen (used in present research as well), stated general reduction of percentage of living sperm by 25.1%. Instead, Łukaszewicz et al. (2003) employing higher degree of dilution of sperm with "EK" thinner (2:1), at identical other parameters of the cryopreservation, stated considerably higher (by 34.5%) general loss of living sperm. It may indicate the favorable impact of lower degree of semen dilution on sperm cells morphology after the cryopreservation.

Table 5  
Tabela 5

Fraction of different morphological forms in frozen-thawed semen in particular stages of reproductive cycle and the average of all collections ( $n = 11$ ;  $\bar{x} \pm SD$ )  
Udział form morfologicznych w nasieniu zamrożonym-rozmrożonym w poszczególnych okresach sezonu reprodukcyjnego oraz średnia wszystkich pobrań ( $n = 11$ ;  $\bar{x} \pm SD$ )

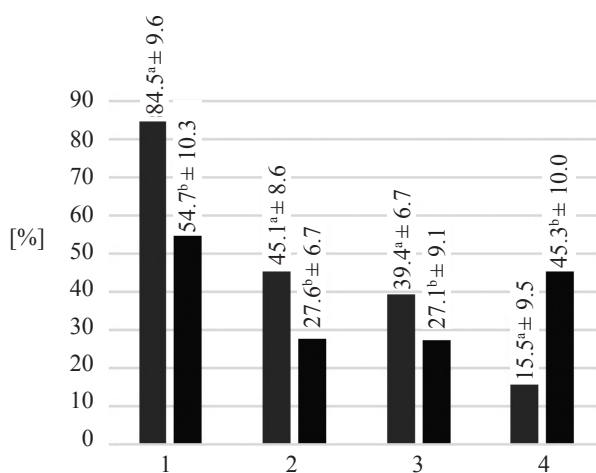
Period Okres	Start Początek	Middle Szczyt	End Koniec	Mean Średnia
Live sperm cells total Plemniki żywe ogółem	56.8 ± 8.3	61.3 <sup>a*</sup> ± 8.8	44.6 <sup>b</sup> ± 7.0	54.7 ± 10.3
Live sperm cells, properly shaped Plemniki żywe, prawidłowo ukształtowane	25.1 ± 10.2	31.0 ± 4.6	24.6 ± 5.2	27.6 ± 6.7
Sperm with inflated head Plemniki o rozdętych główkach	15.9 ± 10.5	15.3 ± 3.8	9.3 ± 5.7	13.8 ± 6.5
Sperm with defects in acrosome Plemniki ze zmianami w akrosomie	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.2
Sperm with broken mid piece Plemniki z załamanymi szyjkami	2.6 ± 1.9	2.9 ± 2.8	1.7 ± 1.7	2.5 ± 2.2
Sperm with looped heads Plemniki ze spętłąną główką	1.9 ± 2.1	3.4 ± 1.5	2.3 ± 0.9	2.7 ± 1.6
Sperm with defects in connecting piece Plemniki ze zmianami we wstawce	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.2
Spermatids, immature stages of sperm cells Spermatydy, niedojrzałe formy morfologiczne plemników	0.7 <sup>a</sup> ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.1 <sup>b</sup> ± 0.2	0.4 ± 0.3
Other morphological forms Inne formy morfologiczne plemników	7.2 ± 2.5	8.1 ± 3.5	6.5 ± 5.5	7.4 ± 3.5
Dead sperm cells Plemniki martwe	46.2 ± 8.3	38.7 <sup>a</sup> ± 8.8	55.4 <sup>b</sup> ± 7.1	45.3 ± 10.4

\*Values in columns marked with different letters differ significantly (a, b –  $P \leq 0.05$ )

Wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie (a, b –  $P \leq 0,05$ )

Properly shaped sperm (PSS) accounted for the most important population in the analyzed semen due to their highest chance to reach infundibulum and fertilize the egg cell. Thus, crucial element verifying the efficiency of the chosen method of the cryopreservation is assessment of the fraction of the PSS, which in consequence, may let obtain eggs fertilized with frozen-thawed semen. It should be also kept in mind that basing mainly of PSS share (and concentration of sperm cells) in semen, volume of the insemination dose

is calculated. After freezing – thawing of semen, PSS accounted for 27.6% and applied method of the cryopreservation caused significant ( $P < 0.05$ ) cut of their share, by 17.5%, as compared to the fresh semen. Gee and Sexton (1990) after the cryopreservation of Aleutian Canada goose's semen stated reduction of the PSS fraction by 41.8%, gaining finally 28.1% of proper cells in thawed semen, which is comparable to the results presented in this paper (graph 4.). Łukaszewicz et al. (2004) in frozen-thawed sperm of the Graylag goose revealed reduction (in comparison to fresh state) of PSS share by 17.32%, gaining finally 11.33% of proper sperm. Also in research on Biała Kołodzka's<sup>®</sup> semen, fraction of PSS was cut by 24.8% after thawing (Łukaszewicz 2002). In further studies the authoress mentioned (Łukaszewicz et al. 2003), employing another method of cryopreservation of Biała Kołodzka's<sup>®</sup> semen showed even higher reduction of percentage of PSS, by 34.6%. The difference between results of Łukaszewicz (2002) and Łukaszewicz et al. (2003) may result from different degree of dilution of sperm by "EK" thinner.



Graph 4. Fractions of particular morphological forms in fresh and frozen – thawed semen ( $n = 11$ ;  $\bar{x} \bar{x} \pm SD$ )

Wykres 4. Udział form morfologicznych plemników w nasieniu świeżym oraz zamrożonym-rozmrożonym ( $n=11$ ;  $\bar{x} \bar{x} \pm SD$ )

\*Percentages of highlighted morphological forms in fresh and frozen-thawed marked with different letter differ significantly ( $a, b - P \leq 0.05$ ).

Wartości procentowe udziału wyróżnionej formy morfologicznej w nasieniu świeżym oraz zamrożonym-rozmrożonym oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ( $a, b - P \leq 0,05$ ).

Legend: 1 – living sperm total, 2 – properly shaped sperm cells, 3 – deformed sperm cells, 4 – dead sperm cells, red columns – fresh semen, blue columns – frozen-thawed semen.

Objaśnienie wykresu: 1 – **plemniki żywe ogółem**, 2 – **plemniki prawidłowo ukształtowane**, 3 – **plemniki zdeformowane**, 4 – **plemniki martwe**, kolumny czerwone-nasienie świeże, kolumny niebieskie nasienie zamrożone-rozmrożone.

% share of living sperm cells in total + % share of dead sperm cells = 100%

% share of properly shaped cells + % share of deformed cells + % share of dead cells = 100%

% udział plemników żywych, ogółem + % udział plemników martwych = 100%

% udział plemników prawidłowo ukształtowanych + % udział plemników zdeformowanych + % udział plemników martwych = 100%

In frozen-thawed sperm a reduction, by 12.3% ( $P < 0.05$ ), of part of deformed sperm cells as compared to freshly collected semen was noticed (graph 4). The decrease of this kind of cells may be explained by their decay during the cryopreservation. Similar observations were made by Gee and Sexton (1990) during their studies on free – living Aleutian Canada goose semen, namely, the part of deformed cells was reduced by 3.6%, and by Łukaszewicz et al. (2004) in the sperm of the Graylag goose – the reduction was of 24%. After thawing of domestic Biała Kołodzka<sup>®</sup> goose's semen the fraction of deformed cells was very high and ranged from 41.3 to 47.5%, however, considerable decrease of their share after the cryopreservation was not observed. The difference was respectively – 0.3 and 0.2% (Łukaszewicz 2002, Łukaszewicz et al. 2003).

In the research conducted, the fraction of dead sperm cells was significantly ( $P < 0.05$ ) higher in frozen – thawed semen than after collection – the difference was 29.8%. Even higher increase in above category of cells was observed by Gee and Sexton (1990) and Łukaszewicz et al. (2004) after thawing of, respectively, Aleutian Canada goose – 46.2% and the Graylag goose – 41.4%. The semen of Biała Kołodzka<sup>®</sup> displayed higher percent of dead cells after thawing as well – from 25.1% to 34.4% (Łukaszewicz 2002, Łukaszewicz et al. 2003).

## CONCLUSIONS

Summarizing, the results obtained let conclude that negative changes which semen of Canada goose undergoes during the cryopreservation (decrease in part of living and properly shaped cells, with a simultaneous increase in share dead sperm) are comparable to stated in sperm of other goose species. Despite of reduction of PSS up to 27.6% in frozen-thawed semen, the result may be considered as sufficient to make the first trials of insemination.

## REFERENCES

- Bakst, M.R., Cecil, H.C., 1997. Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination. Poultry Sci. Assoc., Savoy, IL.
- Blanco J.M., Gee G., Wildt D.E., Donoghue A.M., 2000. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry. Eagle, and Peregrine Falcon spermatozoa. Biol. Reprod., 63: 1164–1171.
- Chelmońska B., 1972. Sezonowe zmiany w funkcjonowaniu układu rozrodczego gęsi w aspekcie sztucznego unasieniania. Część I i II, Pol. Arch. Wet., 15 (3): 375–611.
- Chelmońska B., Dymkowska B., 1980. Ocena właściwości nasienia kaczorów pizmowych pobieranego metoda elektro ejakulacji. Med. Wet., 7: 414–417.
- Chelmońska B., Łukaszewicz E., Kowalczyk A., Jerysz A., 2006a. The effect of semen dilution on morphology and fertility of Japanese quail (*Coturnix japonica*) spermatozoa. J. Poultry Sci., 43: 55–59.
- Chelmońska B., Łukaszewicz E., Kowalczyk A., Jerysz A., 2006b. The effect of DNA level on morphology and fertilising ability of Japanese quail (*Coturnix japonica*) spermatozoa. Theriogenol., 65: 451–458.

- Christensen V., 1995. Diluents, dilution and storage of poultry semen for six hours. First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. Bakst M. R., Wishart G.J. Poultry Sci. Assoc., Savoy, Illinois: 90–104.
- Chrzanowska M., Kochanowski G., 2004. Wstępna ocena wybranych cech reprodukcyjnych gęsiów gęgawych (*Anser anser* L.), bernikli kanadyjskich, (*Branta canadensis* L.) oraz Białych Kofudzkich. Zesz. Nauk. A.R. we Wrocław., 501: 51–55.
- Gee G.F., Temple S.A., 1978. Artificial insemination for breeding non-domestic birds. Symposia of the Zool. Soc., 43: 51–72.
- Gee G.F., Sexton T.J., 1990. Cryogenic preservation of semen from Aleutian Canada goose (*Branta canadensis leucopareia*), Zool. Biol., 9: 361–371.
- Grunder A.A., Pawluczuk B., 1991. Comparison of procedures for collecting semen from ganders and inseminating geese. Poultry Sci., 70: 1975–1980.
- Hammerstedt R.H., 1995. Cryopreservation of poultry semen-current status and economics. First Internat. Symp. On the Artificial Insemination of Poultry. Bakst M.R., Wishart G.J. (ed.) Poultry Sci. Assoc., Savoy, Illinois: 229–250.
- Kowalczyk A., 2008. The effect of cryopreservation process on morphology and fertilising ability of Japanese quail (*Coturnix japonica*) spermatozoa. Cryolett., 29 (3): 199–208.
- Lake P.E., 1960. Studies on the dilution and storage of fowl semen. J. Reprod. Fertil., 1: 30–35.
- Łukaszewicz E., 2000. Częstość pobierania nasienia od gęsiów białych włoskich a ilościowe i jakościowe cechy nasienia pobieranego w ciągu całego sezonu reprodukcyjnego. Zesz. Nauk. Przegł. Hod., 49: 447–451.
- Łukaszewicz E., 2001. Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa. Theriogeneol., 55: 1819–1829.
- Łukaszewicz E., 2002a. Kriokonserwacja nasienia gęsiów. Zesz. Nauk. AR. we Wrocław., Rozprawy CXC AR: 1–111.
- Łukaszewicz E., 2002b. An effective method for freezing White Italian gander semen. Theriogeneol., 58: 19–27.
- Łukaszewicz E., Chrzanowska M., Jerysz A., Chelmońska B., 2004. Attempts on freezing the Greylag (*Anser anser* L.) gander semen. Anim. Reprod. Sci., 80: 163–173.
- Łukaszewicz E., Fujihara N., 2000. The effect of DMF addition on morphology and fertilizing ability of unfrozen gander spermatozoa. Brit. Poultry Sci., 41: 6–17.
- Łukaszewicz E., Kruszyński W., 2003. Evaluation of fresh and frozen-thawed semen of individual ganders by assessment of spermatozoa motility and morphology. Theriogeneol., 59: 1627–1640.
- Ostaszko F.I., 1971. Zagadnienia teorii i praktyki konserwacji nasienia zwierząt w niskich temperaturach. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol., 124: 405–415.
- Papis A., 1997. Metody kriokonserwacji zarodków ssaków. Biotechnologia zwierząt. PWN, Warszawa, rozdz. XIII: 472–499.
- Quinn J.P., Burrows W.H., 1936. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry Sci., 16: 19–24.
- Sakhatski N.I., Artemenko A.B., Tereshchenko A.V., Taghirov M.T., 2002. Reproductive traits of cock sperm of different breeds after long-term preservation in liquid nitrogen. XXI WPC, Montreal, Canada.
- Sellier N., Brun J.M., Richard M.M., Batellier F., Dupuy V., Brillard J.P., 2005. Comparison of fertility and embryo mortality following artificial insemination of common duck females (*Anas platyrhynchos*) with semen from common or Muscovy (*Cairina moschata*) drakes. Theriogeneol., 15, 64 (2): 429–39.
- Sexton T.J., 1981. Development of a commercial method for freezing turkey semen. I. Effect of prefreeze techniques on the fertility of processed unfrozen and frozen-thawed semen. Poultry Sci., 60: 1567–1573.

- Smulikowska S, Rutkowska A., 2005. Zalecenia żywieniowe i wartości pokarmowe pasz. Normy żywienia drobiu.
- Van Wambeke F., 1972. Fertility and hatchability results with low spermatozoa stored in fresh and freeze-dried diluents. *Brit. Poult. Sci.*, 13: 179–183.
- Wishart G.J., 1989. Physiological changes in fowl and turkey spermatozoa during *in vitro* storage. *Brit. Poult. Sci.*, 30: 443–454.

## KRIOKONSERWACJA NASIENIA BERNIKLI KANADYJSKICH (*BRANTA CANADIENSIS* L.)

### Streszczenie

Celem prezentowanych badań była ocena możliwości zastosowania w przypadku nasienia bernikli kanadyjskich metody kriokonserwacji nasienia gęsi Białych Kołudzkich®. Badania wykonywano na 7 gęsiorach bernikli kanadyjskich w przedziale wiekowym od 4 do 10 lat. Nasienie pobierano metodą masażu grzbietowo-brzusznego, a następnie łączono ejakulatory i rozrzedzano rozcieńczalnikiem "EK" w stosunku 1:0,5. Z kolei tak rozrzedzone nasienie schładzano w temperaturze 4°C przez 15 minut. Następnie do nasienia dodawano środek osłaniający dimetyloformamid (DMF), o końcowym stężeniu 6%. Po dodaniu środka osłaniającego nasienie wciągano do 0,25 ml słomek i poddawano 5-minutowej ekwilibracji w temperaturze 4°C. Zamrażanie nasienia odbywało się w komorze kriogenicznej z prędkością 60°C/min od 4°C do -140°C, a potem słomki z nasieniem przekładano do ciekłego azotu (-196°C), celem głębokiego zamrożenia.

Po zamrożeniu-rozmrożeniu nasienia stwierdzono spadek jakości morfologicznej plemników. Średni udział plemników żywych ogółem w nasieniu rozmrożonym obniżył się istotnie ( $P < 0,05$ ) o 29,8 punktów procentowych, jak również średni udział plemników prawidłowo ukształtowanych o 17,5 punktów procentowych.

Zastosowana metoda kriokonserwacji nasienia bernikli kanadyjskich w stosunku do nasienia świeżego powodowała obniżenie udziału plemników żywych ogółem oraz prawidłowo ukształtowanych, jednakże udział wymienionych kategorii w zamrożonym-rozmrożonym nasieniu (odpowiednio 54,7 i 27,6%) można uznać za obiecujący, dający podstawę do uzyskania zapłodnienia jaj po inseminacji.

SŁOWA KLUCZOWE: bernikla kanadyjska, jakość nasienia, kriokonserwacja nasienia