

**ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY
W SZCZECINIE
WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I HODOWLI ZWIERZĄT**

Ewa Kwita

**OCENA FUNKCJONALNYCH I STRUKTURALNYCH ZMIAN PLEMNIKÓW KNURA
PODCZAS PRZECHOWYWANIA NASIENIA W STANIE PŁYNNYM
Z UWZGLĘDNIENIEM POLIMORFIZMU GENÓW *CD9*, *DAZL*, *ESR2* I *PIWIL4*
ORAZ GRUPY GENETYCZNEJ**

*Praca doktorska wykonana
w Katedrze Biotechnologii Rozrodu
Zwierząt i Higieny Środowiska*

*Promotor:
prof. dr hab. inż. Jan Udala*

*Promotor pomocniczy:
dr hab. inż. Daniel Polasik, prof. ZUT*

Szczecin 2024

Serdeczne podziękowania składam:

mojemu promotorowi,

Panu prof. dr hab. inż. Janowi Udale za opiekę merytoryczną, poświęcony czas, życzliwość i okazaną cierpliwość oraz pomoc w realizacji tej pracy, bez której jej powstanie nie byłoby możliwe.

Promotorowi pomocniczemu,

Panu dr hab. inż. Danielowi Polasikowi, prof. ZUT za opiekę naukową, wszechstronną pomoc i poświęcony czas.

Panu dr hab. Dariuszowi Gączarzewiczowi, prof. ZUT za nieocenioną pomoc przy wykonaniu badań oraz cenne wskazówki.

Pani dr hab. inż. Renacie Pilarczyk, prof. ZUT za udzielone wsparcie merytoryczne w opracowaniu statystycznym wyników niniejszej pracy.

Wykaz skrótów używanych w pracy.....	3
Streszczenie.....	5
Abstract	7
1. Wprowadzenie	9
2. Przegląd piśmiennictwa	12
2.1. Ocena nasienia knurów	12
2.1.1. Tradycyjne metody oceny nasienia	13
2.1.2. Inne metody oceny nasienia	15
2.2. Konserwacja nasienia knurów	20
2.3. Genetyczne uwarunkowania jakości nasienia.....	25
3. Cel pracy i hipoteza badawcza.....	31
3.1. Cel pracy	31
3.2. Hipoteza badawcza	31
4. Materiał i metody.....	32
4.1. Ocena integralności błony komórkowej oraz akrosomu na podstawie barwienia różnicowego.....	32
4.2. Ocena integralności błony komórkowej oraz akrosomu na podstawie barwienia fluorescencyjnego	33
4.3. Ocena integralności błony komórkowej oraz aktywności mitochondriów plemników na podstawie barwienia fluorescencyjnego	34
4.4. Analiza ruchliwości plemników	35
4.5. Identyfikacja genotypów	36
5. Analiza statystyczna.....	39
6. Wyniki i dyskusja	40
6.1. Analiza miejsc polimorficznych.....	40
6.2. Tradycyjna ocena mikroskopowa	41
6.3. Wpływ czasu przechowywania na integralność błony komórkowej, stopień uszkodzenia akrosomu oraz aktywność mitochondriów plemników.....	45
6.4. Wpływ czasu przechowywania na parametry ruchu plemników	49
7. Spostrzeżenia i wnioski.....	56
8. Piśmiennictwo.....	58
9. Spis tabel i rycin.....	73
10. Tabele.....	75

Wykaz skrótów używanych w pracy

ACR – Acrosin (Akrozyna)

ACTG2 – Actin Gamma 2 (Aktyna Gamma 2)

ADAM7 – Metallopeptidase Domain 7 (Domena 7 Metalopeptydazy)

AI – artificial insemination (sztuczne unasiennianie)

ALH – amplitude of lateral head displacement (amplituda bocznych wychyleń główki plemnika)

AR – Androgen Receptor (Receptor androgenowy)

ARRDC4 – Arrestin Domain Containing 4 (α -arestyna 4)

ASMA – Computer-assisted sperm morphology analyses (komputerowa analiza morfologiczna plemników)

ATP – adenosynotryfosforan

BCF – beat-cross frequency (częstotliwość bocznych wychyleń główki plemnika)

CASA – Computer Assisted Semen Analysis (wspomagana komputerowo analiza nasienia)

CD9 – Cluster-of-Differentiation Antigen 9

CYP21 – steroid 21-hydroxylase (21-hydroksylaza steroidowa)

DAZL – Deleted in Azoospermia Like

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

ESR2 – Estrogen Receptor 2, Estrogen Receptor Beta (Receptor estrogenowy 2)

ET – embryo transfer (transfer zarodków)

FC – flow cytometry (cytometria przepływowa)

GHR – Growth hormone receptor (Receptor hormonu wzrostu)

GNRHR – Gonadotropin Releasing Hormone Receptor (Receptor hormonu uwalniającego gonadotropinę)

INHBA – Inhibin Beta A (Inhibina Beta A)

INHBB – Inhibin Beta B (Inhibina Beta B)

JC-1 – jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolilo-karbocyjaniny

KPL2 – Sperm Flagellar 2 (białko wici plemnika 2)

LIN – linearity (liniowość ruchu plemnika)

MAS – marker-assisted selection (selekcja wspomagana markerami)

PI – propidium iode (jodek propidyny)

PIWIL4 – Piwi like RNA-mediated gene silencing 4

PLCz – Phospholipase C Zeta (Fosfolipaza C-Zeta)

PNA – lektyna z orzeszków ziemnych

PRLR – Prolactin Receptor (Receptor prolaktyny)

QTL – quantitative traits loci (*locus* cechy ilościowej)

R123 - rodamina

RBP4 – Retinol Binding Protein 4 (Białko wiążące retinol 4)

RLN – Relaxin (Relaksyna)

RNA – kwas rybonukleinowy

SELENOP - Selenoprotein P (Selenoproteina P)

SNP – Single Nucleotide Polymorphism (polimorfizm pojedynczego nukleotydu)

STR – straightness (prostość ruchu plemnika)

SYBR-14 – zieleń SYB, cyjaninowy barwnik fluorescencyjny

VAP – average path velocity (prędkość uśredniona plemnika)

VLC – curvi-linear velocity (prędkość krzywoliniowa plemnika)

VSL – stright-line velocity (prędkość liniowa plemnika)

WOB – wobble (oscylacja toru rzeczywistego plemnika)

$\Delta\Psi_m$ – transbłonowy potencjał mitochondrialny

Streszczenie

Inseminacja w hodowli świń ma już ponad 50 letnią historię i spośród dostępnych technologii reprodukcyjnych jest metodą w największym stopniu wykorzystywaną w doskonaleniu postępu genetycznego. W przypadku trzody chlewnej nasienie kriokonserwowane ma niewielkie zastosowanie, a przyczyną tego jest duża wrażliwość plemników knura na szok chładowy, wiązana ze specyficznym składem błony plazmatycznej tych gamet, ulegającej strukturalnemu uszkodzeniu. Stąd też nasienie samców tego gatunku zwierząt przechowywane jest głównie w stanie płynnym, a jego przydatność do wykorzystania ograniczona jest zazwyczaj do kilkunastu dni i zależy od wielu czynników środowiskowych i genetycznych.

Celem pracy było określenie zmian strukturalno-funkcjonalnych plemników przechowywanych w stanie płynnym z uwzględnieniem polimorfizmu genów *CD9*, *DAZL*, *ESR2* i *PIWIL4* oraz rasy/grupy genetycznej knurów. Badania przeprowadzono na 195 knurach ras/grup genetycznych: duroc, duroc × pietrain, pbz, PIC oraz wbp w wieku od 18 do 36 miesięcy. Po pobraniu i rozrzedzeniu nasienia w rozcieńczalnikach Vitasem LD oraz Gedil przechowywano je w tubach w temperaturze 16 °C. Pierwszego dnia badań wykonano preparaty morfologiczne (eozyna – nigrozyna) określając odsetek plemników żywych i z nieuszkodzonym akrosomem, procent plemników z wadami morfologicznymi głównymi i podrzędnymi. W 1., 3., 5. i 7. dniu określano procent plemników o ruchu postępowym na stoliku Bloma, ruchliwość plemników (system CASA), ocenę integralności błony komórkowej i aktywności mitochondriów plemników na podstawie barwienia fluorescencyjnego (fluorochromy SYBR-14 i PI, JC-1), oraz integralności akrosomów (lektyna PNA). Analizę genetyczną knurów wykonano na wyizolowanym z plemników DNA, identyfikując polimorfizmy wybranych genów metodą PCR–RFLP.

Przeprowadzone badania wykazały, że czas konserwacji miał istotny wpływ na ruchliwość plemników ocenianą metodą tradycyjną na stoliku Bloma i za pomocą systemu CASA, integralność błony komórkowej i akrosomu oraz aktywność mitochondriów plemników. Wraz z upływem czasu konserwacji oceniane wskaźniki charakteryzujące kinetykę i żywotność plemników oraz integralność błony komórkowej ulegały wyraźnemu pogorszeniu. Skłania to do wykonywania zabiegów inseminacyjnych, o ile to możliwe, nasieniem mającym krótszy okres przechowywania. W przypadku różnych wskaźników wykazano istotne różnice między wariantami polimorficznymi genów, z wyjątkiem genu *PIWIL4*. Stwierdzono jednocześnie istotny wpływ rasy/grupy genetycznej na kształtowanie się tych cech, co nie pozwala na jednoznaczną preferencję nasienia knurów z daną formą polimorficzną do konserwacji w stanie płynnym. Najwyższymi wartościami analizowanych wskaźników w czasie przechowywania, z wyjątkiem wysokiej aktywności mitochondriów, ogólnie charakteryzowały się knury linii PIC, a najniższymi knury rasy wbp, u których między pierwszym a ostatnim dniem wystąpiły największe różnice. Wykazane pozytywne zależności między procentowym udziałem plemników o ruchu postępowym ocenianym szacunkowo pod mikroskopem

a wskaźnikami charakteryzującymi ruchliwość plemników, integralność ich błony komórkowej i aktywność mitochondriów wskazują na pełną przydatność powszechnie wykorzystywanej metody w praktyce laboratoryjnej do określania jakości nasienia i kwalifikacji ejakulatów do dalszego wykorzystania w inseminacji.

Słowa kluczowe: knur, nasienie, przechowywanie, stan płynny, *CD9*, *DAZL*, *ESR2*, *PIWIL4*, polimorfizm, CASA, testy fluorescencyjne

Abstract

Insemination in pig breeding has a history of more than 50 years, and of the available reproductive technologies, it is the method most used in improving genetic progress. In the case of pigs, cryopreserved semen has little use, and the reason for this is the high sensitivity of boar sperm to cold shock, linked to the specific composition of the plasma membrane of these gametes, which undergoes structural damage. Hence, the semen of males of this animal species is mainly stored in a liquid state, and its suitability for use is usually limited to several days and depends on a many of environmental and genetic factors.

The aim of the study was to determine the structural and functional changes of liquid-stored spermatozoa taking into account the polymorphism of *CD9*, *DAZL*, *ESR2* and *PIWIL4* genes and the breed/genetic group of boars. The study was conducted on 195 boars of the breed/genetic group: Duroc, Duroc × Pietrain, Polish Landrace, PIC and Polish Large White, aged 18 to 36 months. Semen, after collection and dilution in Vitasem LD and Gedil diluents, was stored in tubes at 16 °C. On the first day of the study, morphological preparations (eosin - nigrosin) were made, determining the percentage of spermatozoa alive and with intact acrosome, the percentage of spermatozoa with major and minor morphological defects. On days 1., 3., 5. and 7., the percentage of spermatozoa with progressive movement on Blom's table, sperm motility (CASA system), assessment of sperm cell membrane integrity and mitochondrial activity by fluorescent staining (fluorochromes: SYBR-14 and PI, JC-1), and acrosome integrity (PNA lectin) were determined. Genetic analysis of the studied boar groups was performed on DNA isolated from spermatozoa, identifying polymorphisms of the chosen genes by PCR-RFLP.

The study showed that preservation time had a significant effect on sperm motility assessed by the traditional method on Blom's table and with the CASA system, as well as on the integrity of the cell membrane and acrosome, and sperm mitochondrial activity. With the passing of time, the evaluated indicators characterizing sperm kinetics and viability and cell membrane integrity deteriorated markedly. This induce to perform insemination procedures, if possible, with semen having a shorter storage period. Significant differences between polymorphic variants of genes were shown for various indicators, with the exception of the *PIWIL4* gene. At the same time, a significant effect of breed/genetic group on the formation of these traits was found, which does not allow a clear preference of boar semen with a particular polymorphic form for liquid preservation. The highest values of the analyzed indices during storage, with the exception of high mitochondrial activity, were generally characterized by boars of the PIC line, and the lowest by boars of the Polish Large White breed, in which the greatest differences occurred between the first and last days. The demonstrated positive correlations between the percentage of spermatozoa with progressive motility estimated under the microscope and indices characterizing sperm motility, the integrity of their cell membrane and

mitochondrial activity indicate the full usefulness of the commonly used method in laboratory practice for determining semen quality and qualifying ejaculates for further use in insemination.

Keywords: boar, semen, storage, liquid state, *CD9*, *DAZL*, *ESR2*, *PIWIL4*, polymorphism, CASA, fluorescent assays

1. Wprowadzenie

Efektywność produkcji zwierzęcej zależy zarówno od czynników genetycznych, jak i środowiskowych. W masowym rozrodzie trzody chlewnej, podobnie jak i bydła, istotną rolę odgrywa sztuczne unasienianie. Knury inseminacyjne, ze względu na możliwość rozrzedzenia nasienia i otrzymania z pobranego ejakulatu wielu dawek w większym stopniu niż rozplodniki używane do krycia naturalnego wpływają na rozród świń.

Tempo produkcji i popyt konsumpcyjny na mięso wieprzowe wykazują ciągłą tendencję wzrostową na świecie. Produkcja ta powinna być zatem wydajna i prowadzona w systemie zrównoważonym, przyjaznym dla środowiska i z zachowaniem dobrostanu zwierząt, zapewniając jednocześnie opłacalność i konkurencyjność. W tym kontekście zwiększający się postęp genetyczny populacji trzody chlewnej w celu produkcji większej ilości i lepszej jakości mięsa przy mniejszej liczbie zwierząt hodowlanych ma kluczowe znaczenie dla zmniejszenia presji środowiskowej, zarówno pod względem produkcji pasz, jak i zagospodarowania odchodów.

Spośród dostępnych technologii reprodukcyjnych, wykorzystywanych w doskonaleniu postępu genetycznego i poprawie globalnej populacji zwierząt gospodarskich, największe znaczenie mają sztuczne unasienianie (AI) i transfer zarodków (ET). W przypadku trzody chlewnej, pomimo iż poczyniono w ostatnich latach znaczne postępy w zakresie długoterminowej konserwacji zarodków i niechirurgicznych metod ET u świń, ich praktyczna i komercyjna implementacja jest jeszcze odległa (Martinez i wsp., 2016). Dlatego też, jedynym praktycznym narzędziem globalnej dystrybucji genów świń pozostaje inseminacja (Roca i wsp., 2016).

Komercyjne wykorzystanie inseminacji w hodowli świń rozpoczęło się ponad 50 lat temu i jest to obecnie szeroko stosowana biotechnika na całym świecie (Knox, 2016). Przez pierwsze 30 lat była ona raczej narzędziem pomagającym hodowcom w poprawie zarządzania hodowlą i zapobieganiu rozprzestrzenianiu się chorób przenoszonych podczas krycia, niż narzędziem przyspieszającym postęp genetyczny. Opracowane metody i procedury inseminacji są skuteczne, dając wyniki płodności porównywalne do krycia. Nie są one jednak w pełni efektywne, ograniczając rentowność i możliwość wykorzystania najbardziej genetycznie wartościowych knurów, ponieważ nie więcej niż około 2000 loch/loszek jest rocznie inseminowanych nasieniem jednego rozplodnika. Ponadto większość dawek inseminacyjnych stosowanych komercyjnie pochodzi z puli nasienia kilku (zwykle 3) knurów, a nie od jednego knura, co utrudnia zwiększenie postępu genetycznego (Foxcroft i wsp., 2010). Dlatego przy niewielkim wykorzystaniu w praktyce nasienia mrożonego należy poszukiwać innych sposobów zwiększenia oddziaływania w hodowli masowej najlepszych knurów. W pewnym stopniu można to osiągnąć poprzez znaczne obniżenie liczby plemników w dawce inseminacyjnej i wykonanie zabiegu sztucznego unasieniania do trzonu czy rogu macicy. Pomocne w tym względzie mogą być też

metody polegające na hormonalnej regulacji cyklu rujowego i wykonaniu zabiegu w ustalonym czasie oraz inne metody biotechniczne, które u świń nie znalazły jednak takiego zastosowania jak u bydła.

Zmniejszenie całkowitej liczby plemników na ciążę daje stacjom inseminacyjnym szanse na szersze wykorzystanie osobników o najwyższej wartości genetycznej i zainseminowanie nasieniem jednego knura około 6000 loch/loszek rocznie, do czego te stacje dążą. Możliwe jest to poprzez zmiany w systemie produkcji dawek inseminacyjnych, m.in. zindywidualizowane podejście do knurów, aby zmaksymalizować dyfuzję genetyczną najlepszych osobników, a tym samym zoptymalizować produktywność fermy hodowlanej (Foxcroft i wsp., 2010). Wiążą się z tym zmiany w organizacji inseminacji i przejście od klasycznych małych stacji użytkujących kilka osobników, zwykle istniejących w obrębie ferm hodowlanych, w kierunku dużych, niezależnych i technicznie wysoce wyspecjalizowanych stacji utrzymujących knury z dużym potencjałem genetycznym, produkujących wysokiej jakości, przechowywanych w stanie płynnym dawek inseminacyjnych (Roca i wsp., 2015). Pomimo jednak osiągniętego postępu szacuje się, że od 5 do 7 % niepłodnych knurów nadal pozostaje „ukrytych” w stacjach inseminacji (Roca i wsp., 2015), a odsetek ten może znacznie wzrosnąć wraz ze spadkiem liczby plemników w dawce inseminacyjnej i spowodować wystąpienie problemów z płodnością knurów o wcześniejszej wysokiej płodności przy stosowaniu konwencjonalnych dawek (Flowers, 2002). Zazwyczaj knury i/lub ejakulatory do inseminacji są wybierane w zakładach unasienniania zwierząt za pomocą standaryzowanego spermogramu obejmującego liczbę plemników, ruchliwość i morfologię, który jest w dużym stopniu miarodajny w identyfikacji knurów/ejakulatów o gorszej płodności, ale niestety nie jest w stanie zidentyfikować knurów/ejakulatów niepłodnych. Mając powyższe na uwadze, stacje inseminacyjne powinny w jak najszerszym stopniu wdrażać nowe metody, które będą w stanie wcześniej identyfikować knury niepłodne, najlepiej przed włączeniem ich do użytkowania w inseminacji. Widoczny i znaczący już w wielu ośrodkach inseminacyjnych postęp strukturalny doprowadził do wdrożenia w nich dokładniejszej i bardziej precyzyjnej oceny nasienia poprzez włączenie niektórych technologii, takich jak CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*) i/lub cytometria przepływowa (Broekhuijsen i wsp., 2015), co skutkuje uzyskiwaniu lepszych wyników płodności w stadzie świń. Proponowane są także inne metody, w tym ocena DNA plemników, analiza cytogenetyczna pod kątem wzajemnych translokacji i test zapłodnienia *in vitro*, które spełniałyby powyższe wymagania indywidualnej oceny dla młodych, zdrowych knurów przed rozpoczęciem kariery rozródowej w zakładzie unasienniania zwierząt. Taka ocena mogłaby wystarczyć do miarodajnego oszacowania potencjalnej płodności danego osobnika (Roca i wsp. 2016).

Aby więc w pełni wykorzystać korzyści płynące z zastosowania inseminacji, koniecznym jest wybór najlepszych knurów o wysokiej wartości hodowlanej i zapewnienie możliwości przekazania następnemu pokoleniu potencjału genetycznego, oddziałującego w jak najszerszym zakresie na hodowlę masową. Stąd też właściwa ocena pobranych ejakulatów od knurów i określenie

potencjalnej zdolności zapładniającej plemników, jest kluczowym zadaniem w praktyce inseminacyjnej. Realizacji tego zadania służą opracowane różne metody oceny wartości biologicznej nasienia, począwszy od stosunkowo prostych polegających na szacunkowym określeniu podstawowych cech pobranego ejakulatu i znajdujących się w nim plemników do zaawansowanych technik wykorzystujących najnowsze osiągnięcia z obszaru biologii molekularnej. Zakres i stopień ich zastosowania zależy w głównej mierze od rodzaju wykonywanych badań i wyposażenia laboratorium w sprzęt i aparaturę oraz posiadanych kwalifikacji pracowników laboratorium.

Pobrane ejakulatory od knurów powinny charakteryzować się odpowiednią objętością i koncentracją plemników o prawidłowym ruchu z zachowanymi wszystkimi funkcjami zapewniającymi wysoką zapłodnialność. Dla hodowcy pozwoli to utrzymać wysoką płodność i plenność w stadzie oraz realizację przyjętych celów, natomiast zakładom unasienniania zwierząt da możliwość sporządzenia z takich ejakulatów dużej liczby dawek inseminacyjnych i uzyskanie zadowalającego wyniku ekonomicznego. (Borg i wsp., 1993; Kondracki i Banaszewska, 1999; Kondracki, 2010). Knury poszczególnych ras i ich mieszańce wykazują różnice w objętości ejakulatu, koncentracji plemników czy ich ruchliwości (Park i wsp., 2002; Kondracki, 2003; Wysokińska i wsp., 2005). Cechy te ulegają także zmianom pod wpływem czynników środowiskowych, takich jak pora roku, temperatura, warunki utrzymania czy też żywienia. Zmiany sezonowe szczególnie widoczne są w okresie letnim, gdzie zauważane jest obniżenie popędu płciowego u knurów (Kondracki i wsp., 2004; Adamiak i wsp., 2010).

Posiadanie zwierząt o wysokiej wartości genetycznej jest pożądane, ponieważ zmniejsza koszty produkcji. Stąd też przeprowadzana selekcja musi być szczegółowa i dokładna. Ocena wartości hodowlanej dużej liczby zwierząt jest obecnie możliwa przy zastosowaniu markerów genetycznych, dodatkowo można ją przeprowadzić w młodym wieku osobników (Różycki, 2002; Eckert i Oczkowicz, 2010). Identyfikacja genów warunkujących pożądane cechy rozrodcze, cechy jakości mięsa oraz cechy użytkowości tucznej, pozwoli na doskonalenie metod selekcji i uzyskanie większego postępu hodowlanego (Bogdzińska, 2010; Eckert i Oczkowicz, 2010). Analiza genów wpływających na użytkowość rozplodową, pozwala na wczesne określenie przydatności zwierząt do rozrodu. Większość cech ilościowych ma charakter poligeniczny a za ich ujawnienie odpowiada kilka lub więcej genów. Dlatego ważne jest, aby zidentyfikować geny dające efekt główny w cechach fenotypowych (Bogdzińska, 2010).

Mając powyższe na uwadze, interesującym wydawało się podjęcie badań nad określeniem związków między poszczególnymi wariantami genów *CD9*, *ESR2*, *DAZL* i *PIWIL4* a wybranymi cechami wartości biologicznej nasienia knurów z uwzględnieniem grupy genetycznej zwierząt.

2. Przegląd piśmiennictwa

2.1. Ocena nasienia knurów

Efektywność produkcji zwierzęcej uwarunkowana jest cechami reprodukcyjnymi. Knury jako rozplodniki powinny charakteryzować się dobrym zdrowiem, kondycją fizyczną i bardzo dobrymi parametrami nasienia. Jak wynika z badań przeprowadzonych w naszym kraju (Knecht i wsp., 2004; Adamiak i wsp., 2010; Muczyńska i wsp., 2010) około 40 % knurów kierowanych do rozplodu podlega brakowaniu z powodu wytwarzania nasienia niskiej jakości, osłabienia lub zaniku popędu płciowego czy niewydolności fizycznej.

Użytkowość rozplodową knurów wyznaczają parametry jakościowe pobranego nasienia. Z ekonomicznego natomiast punktu widzenia, ogromne znaczenie ma liczba dawek inseminacyjnych uzyskana z ejakulatu, uwarunkowana jego objętością, koncentracją i ruchliwością plemników. Produkcja nasienia o wysokiej wartości biologicznej zależy od wielu czynników środowiskowych oraz genetycznych, m. in. od rasy i wieku knura, żywienia, systemu utrzymania czy pory roku. Knury poszczególnych ras mogą wykazywać różnice w zakresie objętości ejakulatu oraz koncentracji i ruchliwości plemników (Wilczyńska i wsp., 2013). Wskaźniki te najmniej korzystnie kształtują się w okresie letnim, co związane jest z długością dnia świetlnego oraz temperaturą otoczenia (Kozdrowski i Dubiel, 2004; Sancho i wsp., 2004; Wysokińska i wsp., 2008). Pomimo iż świnię wykazują zdolność do rozrodu przez cały rok, to jednak można zaobserwować u nich charakterystyczne sezonowe zmiany w przebiegu procesów płciowych, podobnie jak u dzika. Podczas skracającego się dnia w okresie jesiennym, u loch występuje nasilenie objawów rui i towarzyszących jej zmian, a knury wytwarzają ejakulatory o najlepszej jakości, większej objętości, dużej koncentracji oraz o wyższym odsetku plemników o prawidłowej budowie morfologicznej. (Kozdrowski i Dubiel, 2004; Gundogan, 2007; Pokrywka i wsp., 2009; Adamiak i wsp., 2010).

Spośród wielu czynników środowiskowych wpływających na zachowania płciowe, wytwarzanie, żywotność oraz zdolność zapładniającą nasienia knurów istotną rolę odgrywa żywienie. Niedożywienie młodych osobników jest przyczyną zaburzeń w procesie spermatogenezy i morfologicznym rozwoju jąder (Strzeżek, 2007). Właściwe zbilansowanie dawek pokarmowych pod względem poziomu energii i białka, witamin oraz mikro i makroelementów z uwzględnieniem przyswajalności oraz potrzeb osobników pozwala na utrzymanie optymalnej kondycji samca. Dodatkowo działanie czynników stresogennych może również przekładać się na obniżenie parametrów ejakulatów i pogorszenie wskaźników reprodukcyjnych. Dlatego ważne jest zapewnienie zwierzętom właściwego dobrostanu (Bajena i wsp., 2013). Nieodpowiednie warunki utrzymania i żywienia są jedną z przyczyn zmienności w parametrach ejakulatów, co stanowi istotny problem dla stacji unasienniania, ograniczając efektywność produkcji, a tym samym wpływając na ekonomiczny aspekt użytkowania knurów.

Pozyskanie wysokiej jakości nasienia ma kluczowe znaczenie dla powodzenia inseminacji, która jest szeroko stosowaną metodą rozrodu w produkcji trzody chlewnej. W porównaniu z kryciem naturalnym daje możliwości optymalnego wykorzystania potencjału rozrodczego samca, pozwala na skuteczną selekcję hodowlaną oraz na efektywne wykorzystanie nasienia w kraju i na skalę międzynarodową (Lopez Rodriguez i wsp., 2017; Waberski i wsp., 2019; Schulze i wsp., 2023).

2.1.1. Tradycyjne metody oceny nasienia

Diagnostyka laboratoryjna nasienia obejmuje ocenę makroskopową (objętość ejakulatu, zapach i barwa) oraz ocenę mikroskopową (morfologia, koncentracja oraz ruchliwość plemników). Jak podają Rodriguez-Martinez i wsp. (2024) objętość ejakulatu pobranego od dorosłego knura wynosi przeciętnie 250 – 300 ml, z czego plemniki zawieszone w wydzielinie płynu ogona najądrza stanowią 2 – 5 %. Wśród wydzielin dodatkowych gruczołów płciowych wchodzących w skład ejakulatu, 15 – 20 % przypada na gruczoły pęcherzykowe, 10 – 25 % na gruczoły opuszkowo-cewkowe, a reszta na bezzelową wydzielinę prostaty. Objętość ejakulatu u knurów może zawierać się jednak w znacznie szerszym przedziale, od 80 do 900 cm³ (Bielański, 1977, Strzeżek, 2007). Pomimo, iż zazwyczaj od knurów otrzymuje się ejakulatory o objętości powyżej 100 ml to u rasy duroc minimalna objętość ejakulatu może wynosić poniżej tej dolnej wartości. Na kształtowanie się tej cechy może wpływać wiele czynników, m.in. wiek zwierząt, żywienie i utrzymanie, rasa, pora roku czy też intensywność pobierania nasienia (Bielański, 1977; Kondracki i Wysokińska, 2005; Strzeżek, 2007; Bajena i wsp., 2013; Udała i wsp., 2015). Jak podają na przykład Bajena i wsp. (2013), w przypadku knurów rasy wbp objętość ejakulatów pozyskiwanych po 3-dniowej przerwie, a w przypadku knurów rasy pbz po 4 – 5 dniowej przerwie, była większa niż pobieranych w krótszych odstępach czasu.

Zapach nasienia knura przypomina zapach białka jaja kurzego lub jest słabo specyficzny, bliski zapachowi knura. Ejakulatory o wyraźnym ostrym zapachu mogą wskazywać na zanieczyszczenia moczem lub wydzieliną uchyłka napletkowego, a o zapachu gnilnym świadczyć o stanie chorobowym w obrębie układu płciowego. Powinny być one dyskwalifikowane, a przyczyny ich występowania dokładnie zbadane i wyeliminowane. Barwa ejakulatu przypomina silnie rozcieńczone mleko, a widoczne zmętnienie związane jest z koncentracją plemników. Poszczególne frakcje ejakulatu charakteryzuje inna barwa: frakcja przedplemnikowa jest przeźroczysta, frakcja plemnikowa jest biała, frakcja poplemnikowa ma barwę szarą (Trzcńska i Bryła, 2020).

Ruchliwość plemników jest jedną z podstawowych właściwości, która bezpośrednio determinuje ich funkcję. Dzięki zdolności do ruchu plemniki mogą przemieszczać się przez drogi rodne samicy oraz penetrować osłonkę przejrzystą komórki jajowej (Kommisurud i wsp., 2002). Subiektywna, mikroskopowa ocena odsetka plemników ruchliwych oraz odsetka plemników o ruchu postępowym jest szybką, prostą i tanią metodą pozwalającą na wstępną ocenę jakości nasienia. Jednak wynik tej

tradycyjnej oceny ruchliwości w dużym stopniu zależy od umiejętności i doświadczenia osoby oceniającej (Antończyk, 2012).

Ruch postępowy plemników, oceniany jako główny parametr jakości nasienia w zakładach unasienniania, pozwala na kwalifikację ejakulatów do dalszych etapów sporządzenia dawek inseminacyjnych. Ocenę przeprowadza się pod mikroskopem na podgrzanym stoliku Bloma. Taki rodzaj szkiełka podstawowego daje możliwość analizy badanego nasienia w warstwach o określonych grubościach (350 μm , 50 μm , 5 μm). W 200-krotnym powiększeniu, w kilku polach widzenia, w warstwie nasienia o grubości 5 μm określany jest procentowy udział plemników wykazujących prawidłowy ruch w ogólnej liczbie plemników będących w polu widzenia mikroskopu (Biełański, 1977).

Koncentracja plemników w jednostce objętości określana może być metodami fotometrycznymi lub cytometrycznymi. W praktyce, ze względu na szybkość wykonania badania, często wykorzystywane są spektrofotometry. Dokładniejsze wyniki można uzyskać stosując komory hemocytometryczne, wymagające jednak większego nakładu pracy. Możliwe jest również wykonanie badania przy pomocy urządzeń komputerowych, cytometrów przepływowych (Klimowicz i wsp., 2005; Niżański, 2006). Liczba plemników w 1 cm^3 ejakulatu waha się średnio od 150×10^6 do 600×10^6 . W gęstej frakcji ejakulatu koncentracja plemników mieści się w granicach od 500 do $800 \times 10^6/\text{cm}^3$. Kształtowanie się tego wskaźnika, podobnie jak objętości ejakulatu uwarunkowane jest wieloma wymienionymi wyżej czynnikami środowiskowymi. Występują również różnice między rasami, a charakterystycznym w tym przypadku jest występowanie, w porównaniu z innymi rasami, dużej koncentracji plemników w nasieniu knurów rasy duroc (Wysokińska i wsp., 2005; Wilczyńska i wsp., 2013).

Zachowanie wszystkich funkcji plemnika jest niezbędnym warunkiem powodzenia procesu zapłodnienia. Podczas przechowywania nasienia ważne jest, aby komórki, jak najdłużej zachowywały zdolność ruchu oraz integralność błon komórkowych. Główka zawierająca materiał genetyczny w przedniej części otoczona jest cytoplazmatycznym akrosomem, który podczas zapłodnienia bierze udział w rozpuszczaniu osłonki komórki jajowej. Energia potrzebna do poruszania się plemnika wytwarzana jest w mitochondriach, zlokalizowanych w wstawce, natomiast witka jest narzędziem ruchu (Maleszewski, 2011). Ocena ruchliwości i koncentracji komórek rozrodczych w ejakulacie nie jest wystarczającym parametrem do określenia przydatności nasienia do inseminacji. Pomimo wykazywanej aktywności ruchowej, zmiany morfologiczne plemników mogą uniemożliwiać prawidłowy przebieg procesu zapłodnienia (Morales i wsp., 1988). Nieprawidłowości w ukształtowaniu główki i witki, czy też różnego typu zapętlenia wpływają na ruch plemników i ich właściwości biologiczne (Udała i wsp., 2005; Sysa i Karbowicz, 2007).

Badanie morfologii plemników dostarcza ważnych informacji o wartości nasienia. Wykonywane jest przy użyciu mikroskopu świetlnego na preparatach przygotowywanych z użyciem różnych barwników. W praktyce, do oceny zmian w budowie morfologicznej plemników, często wykorzystywany jest 10 % roztwór wodny nigrozyny. Na preparatach przygotowanych z użyciem tego barwnika dobrze uwidoczniony jest akrosom, co można również wykorzystać przy ocenie stanu tej struktury plemnika (Udała i wsp., 2005). Do rozróżnienia natomiast plemników żywych od martwych może być użyty 5 % roztwór wodny eozyny niebieskawej i 10 % roztwór wodny nigrozyny, wymieszany w stosunku 1:4 (Bielański, 1977). W metodzie tej główki plemników żywych nie są wybarwione, a plemników martwych wybarwiają się na różowo. Za plemniki martwe uważa się również te wybarwione niecałkowicie. W ocenie morfologicznej nasienia powszechnie stosowana jest klasyfikacja według Bloma (1981) z podziałem plemników ze zmianami głównymi i podrzędnymi. Wady główne dotyczą w większości zmian w podstawowej budowie plemnika lub jego strukturze wewnętrznej, a podrzędne zmian zlokalizowanych w aparacie ruchu lub na błonach powierzchniowych. Według Trzcińskiej i Bryły (2017), ejakulat kwalifikuje się do konserwacji w stanie płynnym, gdy odsetek plemników prawidłowych morfologicznie jest nie mniejszy niż 80 %, a odsetek wad głównych i podrzędnych nie przekracza odpowiednio: 5 % i 10 %. Wysoki odsetek plemników z wadami morfologicznymi głównymi i/lub podrzędnymi w ejakulacie knura może być powiązany z występowaniem większej liczby plemników z uszkodzonym akrosomem oraz zaburzeniami ruchliwości (Kondracki i Wysokińska 2005; Udała i wsp., 2005; Banaszewska i wsp., 2007).

2.1.2. Inne metody oceny nasienia

Przedstawione wyżej metody oceny nasienia pozwalają generalnie na wykrycie knurów dających ejakulaty, w których znajdują się plemniki ze zmianami strukturalnymi i funkcjonalnymi, z potencjalnie gorszą płodnością. Są stosunkowo proste i nie wymagają dużych nakładów finansowych, co jest niewątpliwie ich zaletą. Stąd też wiele wskaźników oceny szacunkowej i szczegółowej nasienia nadal jest wykorzystywanych do oceny ejakulatu po jego pobraniu i eliminacji nieprzydatnych do dalszego użycia, a tym samym nie dopuszczenia do rozrodu osobników z potencjalnie gorszą płodnością. Przy stosowanych jednak technologiach konserwacji nasienia i maksymalizacji wykorzystania potencjału rozrodczego knura poprzez zmniejszenie liczby plemników w dawce, trudniej jest zapewnić wysoki poziom zapłodnialności i wykryć subtelne wady upośledzające funkcje plemników, deponowanych w macicy w ograniczonej liczebności. Należy mieć na uwadze, że pomimo spełnienia wymaganych kryteriów przy stosowanych powszechnie metodach w tradycyjnej ocenie nasienia, nadal od 5 do 10 % osobników charakteryzuje się niedostateczną płodnością – „subpłodnością”, niższą niż występująca w danej rasie, stadzie czy nawet wśród rodzeństwa (Roca i wsp., 2015).

Zastosowanie nowszych metod, komputerowo wspomaganej analizy nasienia (CASA) do szczegółowych badań kinetycznych plemników, wspomaganej komputerowo analizy morfologicznej plemników (ASMA), stosowania fluorochromów i cytometrii przepływowej (FC) do analiz stanu błony komórkowej oraz lokalizacji określonych cząsteczek związanych z istotnymi procesami – kapacytacji, reakcji akrosomalnej (Keller i Kerns, 2023) zwiększyło możliwości w zakresie oceny nasienia oraz wykorzystania powyższych metod przez naukowców, często do postawienia diagnozy lub wykonania badań (Maside i wsp., 2023; Peña i Rodriguez-Martinez, 2023).

Jednym z najczęściej wybieranych wskaźników oceny jakości nasienia jest ruchliwość plemników (Tremoen i wsp., 2018). Wykorzystywana powszechnie do oceny tego parametru metoda subiektywna przy użyciu mikroskopu optycznego może prowadzić do występowania błędów w postaci mało precyzyjnych wyników. Aby wyeliminować ten problem odpowiedzią są systemy komputerowo wspomaganej analizy nasienia CASA (Niżański i wsp., 2006), pozwalające na dokładną ocenę parametrów ruchliwości plemników (Amman i Katz, 2004; Tremoen i wsp., 2018).

Komputerowa analiza nasienia umożliwia obserwację wszystkich plemników w polu widzenia detektora. Oprogramowanie pozwala na zdefiniowanie wstępnych ustawień względem wybranego gatunku zwierząt w celu standaryzacji procedury pomiarowej oraz dokonanie obliczeń na zdefiniowanych parametrach (Mortimer, 2000; Antończyk, 2012; Lu i wsp., 2013). Dotyczy to zwłaszcza rozmiaru plemnika oraz danych związanych z szybkością oraz liniowością ruchu plemników. Pozwala to na identyfikację różnych populacji plemników np. wykazujących ruchliwość, o ruchu prawidłowym czy plemników statycznych (Trzcńska i Bryła, 2017).

Poza parametrami dotyczącymi właściwości badanego materiału, program pozwala na wybór takich ustawień jak: temperatura pomiaru, rodzaj zastosowanej komory z próbą, intensywność kontrastu lub częstotliwość odświeżania obrazu. Prawidłowe i szczegółowe zdefiniowanie ustawień wstępnych umożliwia uzyskanie miarodajnych i precyzyjnych wyników (Verstegen i wsp., 2002; Niżański i wsp., 2006).

Za pomocą systemów CASA analizowane są poszczególne tory ruchu wszystkich poruszających się plemników. Urządzenie rejestruje położenie główki plemnika w kolejno analizowanych obrazach. Dzięki temu możliwe jest sklasyfikowanie plemników na subpopulacje związane z ich kinetyką takie jak: odsetek plemników o ruchu progresywnym i nieprogresywnym, odsetek plemników poruszających się szybko (*rapid*), odsetek plemników poruszających się z umiarkowaną prędkością (*medium*), odsetek plemników poruszających się wolno (*slow*) oraz odsetek plemników nie wykazujących ruchu (*static*) (Niżański i wsp., 2006; Antończyk 2012). Wyodrębnienie tych grup możliwe jest na podstawie parametrów oprogramowania określających prędkość plemnika po określonej trajektorii. Prędkość krzywoliniowa (VLC – *curvi-linear velocity*) opisuje średnią

prędkość plemnika po rzeczywistej ścieżce ruchu. Prędkość liniowa (VSL – *stright-line velocity*) opisuje średnią prędkość po trajektorii liniowej (tj. ścieżce wyznaczonej przez początkową i ostatnią zarejestrowaną pozycję główki plemnika). Prędkość uśredniona plemnika (VAP – *average path velocity*) określa prędkość plemnika po ścieżce uśrednionej (Mortimer, 2000; Nizański i wsp., 2006; Antończyk, 2012).

Na podstawie parametrów dotyczących prędkości wyliczane są pozostałe parametry takie jak: liniowość (LIN – *linearity*) stanowiąca stosunek wartości VLC do VAP, która opisuje krzywoliniowość ścieżki plemnika; prostota (STR – *straightness*) wyrażana stosunkiem wartości VSL do VAP, opisująca prostotę ruchu plemnika; oscylacja toru rzeczywistego plemnika (WOB – *wobble*) wyznaczana na podstawie stosunku VAP do VCL; amplituda bocznych wychyleń główki plemnika (ALH – *amplitude of lateral head displacement*) oraz częstotliwość bocznych wychyleń główki plemnika (BCF – *beat-cross frequency*) (Mortimer, 2000; Nizański i wsp., 2006; Lu i wsp., 2013).

Oznaczenie ruchliwości plemników jest jednym z najważniejszych parametrów oceny nasienia. Odsetek plemników o prawidłowym ruchu może być głównym wskaźnikiem brany pod uwagę podczas określania przydatności nasienia knurów do wykorzystania w praktyce inseminacyjnej (Frunza i wsp., 2008; Gączarzewicz, 2015). Odpowiednie przygotowanie badanej próbki oraz standaryzacja procedury pomiarowej pozwalają na otrzymanie dokładniejszych wyników analizy nasienia niż w przypadku subiektywnej oceny mikroskopowej. Dzięki nowoczesnym systemom można uzyskać wysoką i dokładną powtarzalność wyników. Pomimo tego, że na poprawność wyników wpływa wiele parametrów związanych z doświadczeniem osoby wykonującej pomiary, przygotowanie aparatury, wykonanie preparatu oraz jakość sprzętu, na którym wykonywana jest analiza, komputerowo wspomagana ocena ruchliwości plemników jest bardzo cennym narzędziem (Broekhuijsen i wsp., 2011).

Inne, nowsze metody oceny nasienia knura oraz innych samców zwierząt hodowlanych, oparte na wykorzystaniu osiągnięć ostatnich lat z zakresu techniki i biologii molekularnej, poza komputerową analizą wykorzystują również ocenę stanu poszczególnych struktur komórkowych. Skuteczną ocenę zdolności plemników do zapłodnienia można osiągnąć poprzez określenie właściwości błony komórkowej plemników. Uszkodzenia, które mogą pojawić się w czasie przechowywania, prowadzą do pogorszenia jakości nasienia wykorzystywanego do inseminacji i stanowić problem przy sztucznym unasiennianiu (Madeja i wsp., 2003; Smardzija i wsp., 2008).

Do badania integralności i funkcjonalności błony komórkowej wykorzystywane są barwniki fluorescencyjne takie jak SYBR-14, jodek propidyny (PI), JC-1, PNA, które stosuje się przyżyciowo. Plemniki znakuje się wybranym fluorochromem, następnie analizuje próbkę wykorzystując mikroskop fluorescencyjny. Według Rodriguez-Martinez (2019) test fluorescencyjny jest ściślej związany

z płodnością nasienia niż ruchliwość plemników. Zdaniem autora ważna jest liczebność próby, a ocena stu plemników może być niewystarczająca.

Jedną z stosowanych kombinacji do oceny integralności błony komórkowej główki plemnika jest połączenie barwnika SYBR-14 z jodkiem propidyny. Fluorochrom SYBR-14 przenika nieuszkodzoną błonę komórkową i łączy się z DNA komórki, emitując zieloną fluorescencję o długości fali 518 nm (Gilian i wsp., 2005; Antończyk, 2012; Gotowiecka i wsp., 2015; Gączarzewicz i wsp., 2015). W przypadku zaburzeń w integralności błony komórkowej do wnętrza komórki wnika PI, który również łączy się z DNA komórki i wypiera SYBR-14. W obrazie mikroskopowym widoczne jest to w postaci pojawienia się czerwonej fluorescencji w zakresie długości fal 535 – 617 nm (Gączarzewicz i wsp., 2015; Gotowiecka i wsp., 2015). Tak zastosowane barwienie SYBR-14/PI pozwala na wyodrębnienie populacji plemników żywych, martwych oraz zamierających, tracących integralność błony komórkowej (Klimowicz i wsp., 2005; Gączarzewicz i wsp., 2015). Zestawienie kombinacji tych barwników z powodzeniem wykorzystywane jest do oceny integralności błon komórkowych plemników wielu gatunków, w tym knura, buhaja, tryka, psa czy człowieka (Antończyk, 2012).

Wykorzystując znakowanie fluorescencyjne można również oznaczyć aktywność mitochondriów na podstawie oceny transbłonowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$). Mitochondria, które zlokalizowane są we wstawce, pełnią kluczową rolę w różnych funkcjach komórkowych. Odpowiedzialne są głównie za produkcję ATP potrzebną plemnikom do ruchu, ale także między innymi za modulację stanu redoks, regulację osmotyczną i homeostazę Ca^{2+} . Mitochondria plemników mogą ponadto znacząco przyczyniać się również do stresu oksydacyjnego co może prowadzić do zmniejszenia ruchliwości plemników knurów, niezależnie od fosforylacji oksydacyjnej tych organelli (Guthrie i Welch, 2012; Piomboni i wsp., 2012; Ramio-Lluch i wsp., 2012; Roca i wsp., 2016). Pożądane jest, aby te organellum było zbudowane prawidłowo oraz wykazywało wysoki poziom aktywności enzymatycznej, która skorelowana jest z ruchliwością i maleje wraz z upływem czasu.

Brak wad morfologicznych i wysoki potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej warunkują postępowy ruch plemników (Bochenek, 1998; Gillan i wsp., 2005). Do oceny aktywności mitochondriów plemnika może być wykorzystywany lipofilny kationowy barwnik JC-1 lub Rodamina 123 (R123). Oba barwniki kumulowane są w tych strukturach i w zależności od wartości potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi_m$) wykazują zróżnicowaną fluorescencję. JC-1 kumulując się w aktywnych mitochondriach, emituje pomarańczową fluorescencję przy długości fali 590 nm. W komórkach o niskim potencjale wewnętrznej błony mitochondrialnej barwnik JC-1 powoduje emisję światła zielonego o długości fali 520 – 530 nm. W połączeniu z zestawem SYBR-14/PI można zidentyfikować trzy grupy komórek: plemniki żywe o wysokim $\Delta\Psi_m$, plemniki żywe o niskim $\Delta\Psi_m$, plemniki martwe (Maxwell i Johnson, 1997; Cheuqueman i wsp., 2012; Gączarzewicz i wsp., 2015).

Przy zastosowaniu barwienia R123, jeśli mitochondria wykazują potencjał transbłonowy to emitują zieloną fluorescencję, natomiast jeśli go nie wykazują to nie emitują światła. Badanie z wykorzystaniem JC-1 jest częściej stosowane ze względu na większą dokładność, gdyż oparte jest na zmianach wartości potencjału transbłonowego. Natomiast w przypadku wykorzystania R123 można stwierdzić czy mitochondria ten potencjał posiadają czy też nie. Przy jednoczesnym zastosowaniu barwienia JC-1 i pomiaru ATP w plemnikach można określić status funkcjonalno-energetyczny ich mitochondriów (Garner i wsp., 1997; Gadea, 2005). Pomiar zawartości tego głównego nośnika energii w plemnikach może być dobrym markerem ich funkcjonalności, odzwierciedla bowiem sprawność fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach wstawki tych komórek. Dobrym uzupełnieniem powyższego pomiaru ATP może być określenie tempa zużycia tlenu (współczynnika ZO_2) przez plemniki oraz ilości produkowanego L-mleczanu (Strzeżek, 2007).

Kolejnym fluorochromem stosowanym do wykrywania uszkodzeń może być lektyna PNA. W procesie zapłodnienia niezbędny jest prawidłowo funkcjonujący akrosom i zawarte w nim enzymy, umożliwiające plemnikowi penetrację błon komórki jajowej. Podczas kontaktu plemnika z osłonką przejrzystą dochodzi do przerywania ciągłości akrosomu i uwolnienia enzymów. Dlatego ważnym jest, aby nasienie stosowane w inseminacji charakteryzowało się jak najmniejszym odsetkiem plemników z uszkodzonym akrosomem. Lektyna PNA ze względu na dużą czułość jest często stosowana do szacowania integralności akrosomu. Koniugowana wraz z barwnikiem fluorescencyjnym Alexa Fluor 594 (Silva i Gadella, 2006) wykazuje powinowactwo do reszt β -galaktozowych zewnętrznej błony akrosomalnej. Utrata ciągłości umożliwia związanie lektyn i wywołuje czerwoną fluorescencję w obrębie akrosomu. W kombinacji z SYBR-14 oraz PI pozwala na identyfikację trzech subpopulacji komórek rozrodczych: plemniki żywe z integralnym akrosomem, plemniki żywe z nieintegralnym akrosomem, plemniki martwe.

Integralność błon plazmatycznych plemników można także badać za pomocą testu ORT (*osmotic resistance test*), w którym oceniany jest odsetek plemników z nienaruszonym akrosomem po ich inkubacji w środowisku hipoosmotycznym (integralność błony w regionie akrosomu) oraz testu HOS (*hypoosmotic swelling test*) – pęcznienia plemników w takim samym środowisku, pozwalającym na ocenę integralności błony w regionie wici (Schilling i Vengust, 1987; Udała i wsp., 1996; Gączarzewicz i wsp., 2010). Dobrym wyznacznikiem stanu błon plemników poddanych konserwacji, zwłaszcza kriokonserwacji, może być pomiar aktywności enzymów, m.in. aminotransferazy asparaginianowej (AspAT) i akrosyny, czy też substratów energetycznych w postaci ATP (Gączarzewicz i wsp., 2010). W wyniku zaburzeń w strukturze plazmolemy plemników w czasie konserwacji nasienia, dochodzi do wycieku tych enzymów z regionu wstawki i główki do środowiska zewnątrzkomórkowego.

2.2. Konserwacja nasienia knurów

Według powszechnie przyjętych metod postępowania z nasieniem w zakładach unasieniana, po pobraniu jest ono rozcieńczane w celu przedłużenia żywotności plemników. Ogólnie, można wyróżnić dwie podstawowe metody konserwacji nasienia, tj. mrożenie oraz konfekcjonowanie w stanie płynnym. W przypadku nasienia knurów do zabiegów inseminacyjnych używa się głównie nasienia rozcieńczonego w stanie płynnym. Jak podają Mellagi i wsp. (2023) tak konserwowanym nasieniem inseminowanych jest ok. 93 % loch. Nasienie poddane kriokonserwacji wykorzystywane jest natomiast w inseminacji sów w niecałym 1 %. To niewielkie wykorzystanie mrożonego nasienia knura spowodowane jest dużą wrażliwością plemników tych zwierząt na temperatury z zakresu tzw. szoku chłodowego, który prowadzi do utraty integralności błony komórkowej plemników oraz obniża stopień ich ruchliwości.

Nasienie rozrzedzone w rozcieńczalniku przechowywane jest w temperaturze 15 – 18 °C, pozwalającej na utrzymanie właściwości biologicznych plemników nawet do kilkunastu dni w zależności od substancji stosowanej do konserwacji. Dawka inseminacyjna zawiera około $2,5 - 3,0 \times 10^9$ plemników w 80 – 100 ml rozcieńczonego nasienia knura. (Waberski i wsp., 2011; Henning i wsp., 2022b; Pezo i wsp., 2019; Waberski i wsp., 2019). Jak podaje Knox (2016) często stosowana procedura inseminacji w fermach trzody chlewnej obejmuje stosowanie nasienia przechowywanego przez 3 – 5 dni i deponowanie w szyjce macicy dużej liczby plemników na lochę i/lub loszkę w rui, zwykle $5 - 7 \times 10^9$ plemników łącznie, w wyniku 2 – 3 inseminacji na lochę i/lub loszkę w rui przy użyciu $2 - 3 \times 10^9$ plemników w dawce inseminacyjnej.

Pomimo prowadzonych badań nad doskonaleniem technologii konserwacji nasienia knura wciąż nie opracowano w pełni satysfakcjonujących procedur. Podczas prac nad poprawą tych metod dąży się do zachowania na odpowiednim poziomie ruchliwości oraz integralności błony komórkowej plemników w czasie przechowywania, co przekłada się na utrzymanie zdolności zapładniającej (Dziekońska i wsp., 2017b; Pezo i wsp., 2019). Spadek jednak żywotności plemników knura w miarę upływu czasu przechowywania nasienia i związany z tym powyższy spadek zdolności zapładniającej jest przyczyną ograniczonego wykorzystania dawek inseminacyjnych po kilkunastu dniach od ich przygotowania. W praktyce około 85 % inseminacji wykonuje się w ciągu 48 godzin od pobrania nasienia (Gadea, 2003). Wykorzystując nasienie knurów w pierwszych dwóch dobach można osiągnąć wskaźnik porodów na poziomie 80 – 85 %, ale dłuższe przechowywanie może wiązać się ze znacznym obniżeniem liczby prosiąt w miocie inseminowanych loch (Boe-Hansen i wsp., 2008).

W związku z tym podejmowane są różne próby modyfikacji składu i technologii przygotowywania rozcieńczalników, aby stworzyć korzystne warunki umożliwiające zachowanie wszystkich właściwości biologicznych przez plemniki knura w jak najdłuższym okresie, przechowywanych zarówno w stanie płynnym jak i zamrożonym. Obiecujące w tym względzie okazały się między

innymi nasze krajowe prace z zastosowaniem lipoprotein żółtka jaja kurzego i strusia afrykańskiego (Fraser i wsp., 2003; Fraser i wsp., 2010), wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (Strzeżek i wsp., 2004) i antyoksydantów (Szczęśniak-Fabiańczyk i wsp., 2002; Strzeżek i wsp., 2004) czy wody o zmienionych właściwościach fizykochemicznych (nanowody), uzyskanej po zastosowaniu zimnej plazmy (Szymanowicz i wsp., 2019).

Stopień uszkodzeń plemników podczas chłodzenia zależy w dużej mierze od szybkości chłodzenia i temperatury progowej, ale odporność plemników knura na uszkodzenia wywołane zimnem można zwiększyć przez odpowiednio długie i powolne chłodzenie do 5 °C (Casas i Althouse, 2013; Schmid i wsp., 2013). Występujący spadek żywotności plemników knura podczas obniżania temperatury poniżej temperatury szoku termicznego wiązany jest ze specyficznym składem błony plazmatycznej tych gamet, ulegającej strukturalnemu uszkodzeniu. Ma ona stosunkowo wysoką zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i niskie stężenie cholesterolu, a w konsekwencji niższy jest stosunek steroli do fosfolipidów, co sprawia, że błony plazmatyczne plemników knura są bardziej podatne na chłodzenie niż plemniki innych gatunków zwierząt (Bailey i wsp., 2008; Bresciani i wsp., 2017). Plemniki zwierząt charakteryzujące się wyższą zawartością cholesterolu są mniej podatne na uszkodzenia spowodowane niskimi temperaturami (Lemma, 2011; Martinez-Alborcia i wsp., 2012; Guimarães i wsp., 2017).

Zaburzeniom funkcjonalnym i molekularnym błony wywołanym schłodzeniem towarzyszą zmiany białek błonowych, płynności błony i wzrostu jej przepuszczalności, a następnie wyciek jonów i zmniejszenie aktywności enzymów (López Rodriguez i wsp., 2012; Casas i Althouse, 2013; Schmid i wsp., 2013). Wady błony plazmatycznej i utrata ważnych składników wewnątrzkomórkowych, takich jak jony wapnia, nukleotydy adeninowe, przeciwutleniacze i enzymy, wywołują zaburzenia metaboliczne, które mogą wpływać na ruchliwość i żywotność plemników. Obniżenie funkcji plemników wywołane chłodzeniem może być również spowodowane uszkodzeniami oksydacyjnymi wynikającymi ze szkodliwego tworzenia się reaktywnych form tlenu (RFT) i peroksydacji lipidów błonowych (Brouwers i wsp., 2005; Aitken i wsp., 2014). Song i wsp. (2024) dokonując analizy proteomicznej nasienia knurów charakteryzujących się dobrą i złą przydatnością do konserwacji w temp. 17 °C, wśród 2791 zidentyfikowanych białek wyróżnili spośród nich 187 kluczowych, potencjalnie związanych z funkcją ochronną podczas jego przechowywania. Funkcja ta powiązana była między innymi z odpowiedzią na stres oksydacyjny i aktywnością różnych szlaków metabolicznych. Na podstawie analizy interakcji białko-białko badacze zidentyfikowali 8 białek (GPX5, GLRX, ENO4, QPCT, BBS7, OXSR1, DHRS4 i AP2S1), które mogą być wykorzystane jako potencjalne biomarkery, a więc mogące odgrywać istotną rolę w prognozowaniu przydatności nasienia knurów do przechowywania w stanie płynnym.

Główną przyczyną generowania reaktywnych form tlenu w nasieniu jest wysoka koncentracja nienasyconych kwasów tłuszczowych w strukturze błon plazmatycznych oraz ograniczone możliwości

lokalizacji pełnego enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego plemnika spowodowane niską zawartością cytoplazmy we wstawce plemnika. Nadmiar ich może prowadzić do zachwiania równowagi między wytwarzaniem a niszczeniem wolnych rodników i w ostateczności do powstania stresu oksydacyjnego (Luberda i Strzeżek, 1990; Strzeżek, 1999; Jedlińska-Krakowska, 2005). Zachowanie równowagi między wytwarzaniem a neutralizacją wolnych rodników jest bardzo istotne, dlatego w plazmie nasienia obok triady enzymatycznej są różne składniki nisko i wysokocząsteczkowe, które mają właściwości antyoksydacyjne. Należą do nich między innymi: zredukowany glutation, ergotioneina, kwas l-askorbinowy, tokoferol, kwas moczowy, jak też białka plazmowe i białkowe substancje immunomodulacyjne oraz substancje antybakteryjne np. lizozym czy glikozydazy (Strzeżek, 1999). Stres oksydacyjny działa destrukcyjnie na prawidłową funkcję plemników i prowadzi do poważnych zmian w ich strukturze a nawet do ich śmierci. Wzrost nieswoistej przepuszczalności błon plazmatycznych plemników w wyniku modyfikacji ich struktur lipidowych, jest odpowiedzialny za obniżenie ruchliwości i przeżywalności plemników. Oksydacyjne zmiany w strukturze i topografii białek błonowych główki i wici mogą zaburzać proces kapacytacji, reakcję akrosomalną i ostatecznie fuzję oocyt – plemnik (Frączek i Kurpisz, 2005). Za uszkodzenia DNA odpowiedzialny jest rodnik hydroksylowy doprowadzając do powstania pojedynczych lub podwójnych pęknięć nici DNA co prowadzi do nasilenia procesów apoptozy, a w konsekwencji do zaburzeń w rozrodzie.

Dla przedłużenia funkcji życiowych plemników podstawowe znaczenie ma odpowiedni skład rozcieńczalników, będącymi wodnymi roztworami substancji, które stanowią źródło składników energetycznych dla tych gamet mających wysokie wymagania metaboliczne w trakcie przechowywania. Głównym ich zadaniem jest zapewnienie odpowiednich warunków do utrzymania pełnej żywotności i ruchliwości plemników (Pezo i wsp., 2019). Aby spełnić swoje funkcje, ochronne rozcieńczalniki powinny charakteryzować się odpowiednimi wartościami parametrów pH, ciśnienia osmotycznego, zabezpieczać przed drobnoustrojami oraz dostarczać substratów energetycznych dla plemników. Głównym źródłem energii w rozcieńczalnikach najczęściej jest glukoza, która dodawana jest w wysokich stężeniach, aby odpowiadać zapotrzebowaniom metabolicznym plemników. Będąc związkiem niejonowym wpływa również na utrzymanie osmolarności na odpowiednim poziomie (Johnson i wsp., 2000; Pezo i wsp., 2019). Stosowano także inne cukry, jak galaktozę, fruktozę, rybozę czy trehalozę (Gadea, 2003; Bresciani i wsp., 2013). Oceniano alternatywne substraty energii, w tym dodanie pochodnych ATP, które są jednak drogie i niestabilne, odtłuszczone mleko w proszku czy jako stymulatory nieorganiczny pirofosforan i kofeinę, oddzielnie lub w połączeniu (Sutovsky, 2015). Korzystny wpływ na ruchliwość plemników i ich zdolność zapładniającą oraz liczbę prosiąt w miocie wykazano po zastosowaniu nasienia konserwowanego w długoterminowym rozcieńczalniku z udziałem sacharozy i inwertazy (Bresciani i wsp., 2017).

W skład rozcieńczalnika powinny wchodzić także związki buforowe, zapewniające odpowiednie pH (6,8 – 7,2). Najczęściej stosowanymi spośród nich są cytrynian i wodorowęglan sodu. Bardziej złożonymi związkami regulujących pH są HEPES oraz TRIS (Gadea, 2003). Rozcieńczalniki używane do przechowywania nasienia zawierają w swoim składzie także związki mineralne, odpowiedzialne za regulację ciśnienia osmotycznego. Dodawane są także antybiotyki mające za zadanie hamowanie namnażania bakterii oraz substancje chroniące plemniki przed szokiem termicznym, np. albumina surowicy zwierzęcej (Gadea, 2003; Pezo i wsp., 2019, Luter i wsp., 2021). W zależności od możliwości utrzymania właściwości biologicznych plemników przez określony czas wyróżnia się rozcieńczalniki krótkoterminowe (przechowywanie plemników przez 1 – 2 dni), średnioterminowe (przechowywanie plemników przez 3 – 4 dni) oraz długoterminowe (przechowywanie plemników przez 7 – 10 dni) (Pezo i wsp., 2019; Yeste, 2017).

Dla zapewnienia roli ochronnej przez rozcieńczalnik nieodzownym jest zachowanie odpowiedniej temperatury w czasie przechowywania nasienia. Jak wspomniano wcześniej, na skutek specyficznej budowy błony komórkowej, plemniki knura wykazują dużą wrażliwość na temperatury z zakresu tzw. szoku chłodowego, prowadzącego do utraty integralności błony komórkowej oraz obniżenia ruchliwości tych gamet. Optymalna temperatura przechowywania nasienia knura mieści się w granicach 15 – 18 °C, dając tym samym możliwość obniżenia aktywności metabolicznej plemników, nie powodując przy tym utraty integralności błony komórkowej (Henning i wsp., 2022b). Dalsze obniżenie temperatury poniżej 12 °C powoduje wystąpienie szoku termicznego i pogorszenie jakości nasienia (Pezo i wsp., 2019; Yeste, 2017). Przy szybkim spadku temperatury dochodzi do przejścia fosfolipidów błonowych ze stanu ciekłokrystalicznego w żel. Przebiegający w zakresie temperatur 10 – 30 °C proces przejścia fazowego lipidów znacznie usztywnia błonę komórkową, prowadząc do nieodwracalnych zmian w białkach błonowych i w konsekwencji do destabilizacji struktury i funkcji błony komórkowej plemników (Schmid i wsp., 2013; Murphy i wsp., 2017; Pezo i wsp., 2019). Natomiast przechowywanie nasienia w temperaturze powyżej 20 °C powoduje wzrost aktywności metabolicznej plemników i w efekcie wyczerpanie ich rezerw energetycznych (Henning i wsp., 2022b).

Pomimo badań prowadzonych na przestrzeni lat dotyczących doskonalenia technologii konserwacji nasienia knura wciąż nie opracowano w pełni satysfakcjonujących procedur tego procesu. Kluczowym kryterium, do którego dąży się podczas doskonalenia metod konserwacji nasienia samców tego gatunku zwierząt jest zachowanie ruchliwości oraz integralności błony komórkowej plemników w trakcie przechowywania co pozwala utrzymać ich zdolność zapładniającą na odpowiednio wysokim poziomie.

Analiza zmian zachodzących w strukturze plemników w trakcie przechowywania jest istotna w aspekcie doskonalenia metod konserwacji. Wydłużenie okresu przydatności nasienia do inseminacji

może mieć istotne znaczenie pod względem ekonomicznym i organizacyjnym w praktyce inseminacyjnej zwierząt (Strzeżek, 2007; Gotowiecka i wsp., 2015).

Osobnym problemem w konserwacji nasienia, zarówno w stanie płynnym jak i mrożonym, jest stosowanie odpowiednich markerów, które dałyby możliwość oceny świeżego nasienia i prostą odpowiedź czy ejakulat nadaje się do przechowywania, czy też nie. Podejmowano różne próby zdefiniowania takich markerów, które przewidywałyby przydatność ejakulatów do kriokonserwacji. Między innymi Thurston i wsp. (2002) porównali za pomocą technologii amplifikacji polimorfizmów długości fragmentów restrykcyjnych (AFLP) DNA knurów rasy wielkiej białej, których nasienie odznaczało się dobrą i złą przydatnością do zamrażania, autorzy wygenerowali 2182 fragmenty restrykcyjne, z których 421 było polimorficznych. Porównując profile AFLP z zdolnością do zamrażania zidentyfikowali 16 kandydatów jako potencjalne markery genetyczne, potwierdzając zarazem hipotezę, że istnieje genetyczna podstawa zmienności jakości nasienia po rozmrożeniu między osobnikami, i że technologia AFLP może być w stanie zidentyfikować markery molekularne powiązane z genami wpływającymi na tę zmienność. Nie wiadomo jednak, za pomocą jakiego mechanizmu zmienność genetyczna leży u podstaw różnic w przydatności ejakulatu do zamrażania. Należy przy tym zwrócić szczególną uwagę na fakt, że ejakulatory kwalifikują się do przechowywania w stanie płynnym i zmrożonym tylko wtedy, gdy świeże nasienie zawiera co najmniej 70 % ruchliwych plemników. Istnieje również indywidualna zmienność w przydatności nasienia na przechowywanie w niskich temperaturach między knurami i między ejakulatami tego samego osobnika. Z tego powodu knury i ich ejakulatory są klasyfikowane jako osobniki o dobrej i złej przydatności do wykorzystania ich nasienia w kriokonserwacji (Hernández i wsp., 2007) oraz jako ejakulatory o dobrej lub słabej zamrażalności (Yeste i wsp., 2013). Aby określić jednak podatność na zamrażanie, konieczne jest przeprowadzenie czasochłonnej procedury kriokonserwacji.

Duże znaczenie dla zachowania pełnej funkcjonalności plemnika, a tym samym zdolności zapładniającej ma plazma nasienia. U knura ma ona złożony skład (Strzeżek i wsp., 2005), a niektóre jej składniki, jak peroksydaza glutationowa (Novak i wsp., 2010) czy paraoksonaza-I (Barranco i wsp., 2015) korzystnie wpływają na zachowanie zdolności zapładniającej przez plemniki przechowywane w stanie płynnym. Inne natomiast składniki plazmy nasienia, jak białka PSP-1 i AQN-3, mogą osłabiać tę zdolność zapładniającą (Novak i wsp. 2010; May i wsp. 2015). Ten funkcjonalny kontrast między składnikami plazmy nasienia należy mieć na uwadze przed jej użyciem jako rozcieńczalnika plemników po rozmrożeniu nasienia, co może prowadzić do niespójnych wyników płodności. Zastosowanie metod klasycznych i najnowszych osiągnięć z zakresu biologii molekularnej pozwoliło na wykrycie w plazmie nasienia wielu innych białek powiązanych z różnymi cechami rozrodczymi i mogących służyć jako potencjalne markery. Niektóre z nich jak na przykład fibronektyna-1 i N-acetylo- β -heksozoaminidaza mogą być markerami przydatności plemników do konserwacji (Wysocki i wsp., 2015) inne natomiast jak wspomniana spermadhezyna świńskiego białka

SP-1 (PSP-1) liczebności miotu. Rodriguez-Martinez i wsp. (2024) cytując najnowsze prace wielu autorów omawia znaczenie biocząsteczek zamkniętych w zewnątrzkomórkowych pęcherzykach nasiennych (sEV) wydzielanych przez najądrza i prostatę, w stosunkowo większej liczbie niż we krwi, wpływające zarówno na plemniki, jak i drogi rodne pokrytej samicy. W zależności od biogenezy pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są definiowane jako eksosomy (pęcherzyki o wielkości 30 – 100 nm uwalniane z cytoplazmatycznych ciałek wielopęcherzykowych) lub ektosomy (pęcherzyki błony plazmatycznej o wielkości 100 – 1000 nm). Każdy typ zawiera dużo cholesterolu i sfingomieliny, lipidów zaangażowanych w krioprzeżywalność plemników knura. EV (*Extracellular Vesicles* – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe) otaczają aktywne składniki biologiczne, tj. lipidy, białka sygnałowe, małe niekodujące i regulacyjne RNA. Białka występują również w plazmie nasienia w postaci wolnej i są podatne na szybką degradację przez proteazy. Inne enzymy, jak nukleazy, mogą łatwo degradować inne cząsteczki, takie jak wolne RNA. Taka degradacja wolnych cząsteczek może wyjaśniać nieregularną lub nawet brak odpowiedzi na dodatek plazmy, gdy jest stosowana w celu poprawy krioodporności plemników, a nawet płodności po inseminacji (Rodriguez-Martinez i Roca, 2022). Są one w stanie oddziaływać na plemniki i nabłonek żeńskich narządów płciowych uwalniając do nich aktywne cząsteczki, wpływając tym samym na zdolność do zapłodnienia (Andrade i wsp., 2022). Mogą nawet modyfikować odpowiedź immunologiczną żeńskich dróg rodnych po ekspozycji na antygeny pochodzące od ojca. Pęcherzyki te przenoszą cytokiny (Padilla i wsp., 2023) i małe ncRNA, w tym miRNA, między innymi związany z płodnością ssc-miR-10b (Xu i wsp., 2020). Znalezione miRNA w plemnikach knurów (ssc-miR-503) lub w małych sEV (ssc-miR-130a, ssc-miR-9) zostały powiązane z niską kriotolerancją plemników w nasieniu knurów, stając się w ten sposób potencjalnymi „negatywnymi” markerami kriotolerancji, a tym samym obniżonej płodności (Pedrosa i wsp., 2021). Osiągnięcia te, jak również dalsze prace nad wyjaśnieniem roli plazmy nasienia i oddziaływania jej składników na plemniki, może przyczynić się do poznania przyczyn ograniczających przeżywalność nasienia konserwowanego w niższych temperaturach, a tym samym w większym stopniu wykorzystać potencjał genetyczny najlepszych knurów w doskonaleniu świń.

2.3. Genetyczne uwarunkowania jakości nasienia

Cechy ilościowe związane z reprodukcją charakteryzują się niską odziedziczalnością, są wynikiem oddziaływania kilku lub więcej genów oraz czynników środowiskowych. Selekcja wspomagana markerami – MAS (*marker-assisted selection*) może przynieść znaczące efekty w genetycznym doskonaleniu cech niskoodziedziczalnych. Wykorzystanie markerów genetycznych daje możliwość w szybkim czasie i przy stosunkowo niskich nakładach finansowych na wyselekcjonowanie najlepszych osobników o pożądanym fenotypie. Ważne jest, aby przy takiej selekcji odpowiednio wybrać geny cech ilościowych QTL (*quantitative traits loci*), których funkcjonalność jest rozpatrywana jako marker danych cech i wpływa na ich rozwój. Selekcja typu MAS w oparciu o geny o sprawdzonym i wysokim efekcie oddziaływania pozwoli na prowadzenie efektywnej hodowli,

a praktyczne wykorzystanie osiągnięć genetyki molekularnej, znacząco będzie wspierać klasyczną hodowlę. Znalezienie sekwencji markerowych związanych z jakością nasienia może przyczynić się do postępu w doskonaleniu rozrodu trzody chlewnej (Kowalczyk i wsp., 2018).

Bliższe poznanie funkcji plemników knura i wprowadzenie nowych zaawansowanych metod w diagnostyce andrologicznej przyczynia się do poprawy wydajności reprodukcyjnej tych samców będąc ważnym elementem w zarządzaniu rozrodem stada trzody chlewnej. Według Sutovskiego (2015) obiektywna ocena pojedynczego ejakulatu i indywidualne przewidywanie płodności knurów staje się w dużym stopniu możliwe dzięki wprowadzeniu zautomatyzowanej analizy nasienia metodą cytometrii przepływowej z barwieniem przyżyciowym (np. integralność akrosomalna i potencjał mitotyczny), analizie fragmentacji DNA i biomarkerach (ubikwityna, białko PAWP, lipoksygenaza arachidonowa – ALOX15) związanych z normalnymi lub wadliwą budową plemników, pomiarów reaktywnych form tlenu wytwarzanych przez plemniki. Jak wskazuje autor alternatywne substraty energii i stymulatory plemników, takie jak nieorganiczny pirofosforan i kofeina, mogą przedłużyć żywotność plemników w rozrzedzonym nasieniu i w narządach żeńskiego układu rozrodczego. Takie technologie można połączyć z deponacją plemników w narządach płciowych samicy podczas inseminacji. Ponadto, ejakulatory złej jakości można by próbować „uratować”, a ejakulatory akceptowalne „ulepszyć” za pomocą metod segregowania nasienia, opartych na bazie nanocząstek i sortowania plemników aktywowanych magnetycznie. Zdaniem autora postępy naukowe i technologiczne mogą przynieść korzyści w hodowli trzody chlewnej, pod warunkiem, że wyzwania związane z przyjęciem, upowszechnieniem i redukcją kosztów nowych technologii zostaną spełnione.

Jak rozważa dalej cytowany autor analiza fenotypowa plemników za pomocą cytometrii przepływowej opartej na obrazowaniu będzie szła w parze z postępem genomiki świń, łącząc nieprawidłowy fenotyp plemników z polimorfizmami genów wpływającymi na płodność. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) mogą zmieniać aktywność promotora dotkniętych genów lub bezpośrednio zmieniać funkcję kodowanych przez geny białek zaangażowanych w spermatogenezę, różnicowanie spermatyd lub funkcję plemników po opuszczeniu jąder, czego przykładem jest SNP w genie kodującym ligazę ubikwityny *HECW2* związaną z dziedzicznym defektem akrosomu w kształcie guzka u fińskich knurów Yorkshire (Sironen i wsp., 2010). Taka funkcjonalna zmiana jest spowodowana zmianą funkcji niehomologicznej substytucji aminokwasu lub przedwczesnym skróceniem kodonem stop, skutkującym krótszym transkryptem i ostatecznie krótszym, dysfunkcyjnym białkiem. Przykłady SNP związanych ze zmniejszoną płodnością knurów obejmują geny kodujące białka plemników, takie między innymi jak fosfolipaza C zeta (*PLCz*) zaangażowana w aktywację oocytów podczas zapłodnienia (Kaewmala i wsp., 2011), białka *DAZL* (usunięte w przypadku azoospermii) zaangażowane w regulację spermatogenezy (Ma i wsp., 2013) oraz antygen *CD9* zaangażowany w dojrzewanie plemników najądra i usuwanie kropli cytoplazmatycznych (Kaewmala i wsp., 2011). Polimorfizmy

w wymienionym genie kodującym ligazę ubikwityny *HECW2* mogą przyczyniać się natomiast do wady akrosomu w postaci guzków w plemnikach knurów (Sironen i wsp., 2010). Przeprowadzone badania przez różnych autorów pozwoliły na wykazanie związków między cechami rozrodczymi świń a wybranymi genami (tab. 1). Również w niniejszej pracy postanowiono zbadać takie zależności mając na uwadze zachodzące zmiany w strukturze i funkcjach plemników podczas konserwacji nasienia w stanie płynnym uwzględniając występujące polimorfizmy genów, mogących ewentualnie służyć jako markery i zostać wykorzystane we wczesnej selekcji knurów inseminacyjnych.

Tab. 1. Przykładowe geny kandydujące związane z cechami jakości nasienia

Nazwa genu	Symbol genu	Cecha(y)	Piśmiennictwo
<i>Acrosin</i> Akrozyna	<i>ACR</i>	koncentracja i ruchliwość	Lin i wsp., 2006b
<i>Actin Gamma 2</i> Gamma aktyna 2	<i>ACTG2</i>	objętość i ruchliwość	Wimmers i wsp., 2005
<i>Metallopeptidase Domain 7</i> Domena 7 metalopeptydazy	<i>ADAM7</i>	ruchliwość	Gao i wsp., 2019
<i>Androgen Receptor</i> Receptor androgenowy	<i>AR</i>	morfologiczne nieprawidłowości	Lin i wsp., 2006b
<i>Arrestin Domain Containing 4</i> α -arestyna 4	<i>ARRDC4</i>	ruchliwość	Reyer i wsp., 2024
<i>Steroid 21-hydroxylase</i> 21-hydroksylaza steroidowa	<i>CYP21</i>	koncentracja i morfologiczne nieprawidłowości	Kmieć i wsp., 2002
<i>Growth hormone receptor</i> Receptor hormonu wzrostu	<i>GHR</i>	morfologiczne nieprawidłowości	Gao i wsp., 2019
<i>Gonadotropin Releasing Hormone Receptor</i> Receptor hormonu uwalniającego gonadotropinę	<i>GNRHR</i>	krople cytoplazmatyczne, morfologiczne nieprawidłowości, ruchliwość	Lin i wsp., 2006a
<i>Inhibin Beta A</i> Inhibina beta A	<i>INHBA</i>	krople cytoplazmatyczne	Lin i wsp., 2006a
<i>Inhibin Beta B</i> Inhibina beta B	<i>INHBB</i>	koncentracja	Lin i wsp., 2006a
<i>Sperm Flagellar protein 2</i> Białko wici plemnika 2	<i>KPL2</i>	morfologiczne nieprawidłowości	Sironen i wsp., 2006
<i>Phospholipase C Zeta</i> Fosfolipaza C-zeta	<i>PLCz</i>	koncentracja	Kaewmala i wsp., 2012
<i>Prolactin Receptor</i> Receptor prolaktyny	<i>PRLR</i>	koncentracja i objętość	Kmieć i Terman, 2004
<i>Retinol Binding Protein 4</i> Białko wiążące retinol 4	<i>RBP4</i>	ruchliwość	Lin i wsp., 2006b
<i>Relaxin</i> Relaksyna	<i>RLN</i>	objętość	Lin i wsp., 2006b
<i>Selenoprotein P</i> Selenoproteina P	<i>SELENOP</i>	morfologiczne nieprawidłowości	Gao i wsp., 2019

Gen *CD9* (*Cluster-of-Differentiation Antigen 9*) zlokalizowany na chromosomie 5 u świń koduje białko z rodziny tetraspanin - 9 antygen różnicowania komórkowego, który występuje na powierzchni

blony komórkowej. W zależności od typu komórki białka z tej rodziny wykazują szereg aktywności biologicznych, takich jak: rozwój komórek, ich aktywację, wzrost, migrację, adhezję oraz fuzję plemników z komórkami jajowymi (Jankovičová i wsp., 2015; Brosseau i wsp., 2018; Jankovičová i wsp., 2020; Sultan i wsp., 2020). U knura wykryto ekspresję *CD9* w komórkach Leydiga, komórkach Sertoliego, komórkach męskiej linii zarodkowej oraz w komórkach nabłonkowych najądrzy, nasieniowodów i gruczołu krokowego (Kaewmala i wsp., 2011; Cupperova i wsp., 2014).

Poszukując markerów jakości nasienia u knurów Kaewmala i wsp. (2011) zbadali zależność pomiędzy polimorfizmem genu *CD9* w intronie 6 (g.358 A>T) a ruchliwością plemników, odsetkiem plemników z kroplą cytoplazmy oraz procentem plemników nieprawidłowych morfologicznie. Ekspresja *CD9* odgrywa kluczową rolę podczas rozwoju plemników, zwłaszcza w najądrzach, gdzie plemniki dojrzewają i nabierają specyficznych właściwości, niezbędnych do pokonania osłonki komórki jajowej oraz fuzji gamet. W badaniach przeprowadzonych na knurach pietrain oraz pietrain × Hampshire zanotowano statystycznie istotne różnice dla polimorficznych wariantów genu *CD9*. Osobniki posiadające genotyp AA charakteryzowały się najwyższą ruchliwością plemników, najmniejszym odsetkiem kropeł cytoplazmy oraz najniższym procentem plemników o nieprawidłowej budowie. Podobnie Cho i wsp. (2015) u knurów rasy duroc stwierdzili istotne statystycznie różnice w ocenie ruchliwości na korzyść genotypu AA.

Kumar i wsp. (2015) wykazali, że polimorfizm pojedynczego nukleotydu w intronie 6 (g.358 A>T) genu *CD9* powiązany jest z cechami jakości nasienia u buhajów rasy frieswal (hf × sahiwal) takimi jak koncentracja oraz ruchliwość. W badanej grupie wykryto dwa genotypy: AA i AB, nie zaobserwowano jednak genotypu BB. Heterozygoty AB znacząco charakteryzowały się wyższymi parametrami analizowanych cech.

Gen *DAZL* (*Deleted in Azoospermia Like*) u świń zlokalizowany jest na chromosomie 13 i należy do rodziny genów *DAZ* (*DAZ*, *DAZL* i *BOULE*), które odgrywają istotną rolę w procesie prawidłowej spermatogenezy i oogenezy. Jest wysoce konserwatywnym białkiem wiążącym RNA (Zhang i wsp., 2009; VanGompel i Xu, 2011; Fu i wsp., 2015; Tang i wsp., 2023) ulegającym ekspresji w komórkach rozrodczych oraz komórkach Leydiga i niezbędnym do utrzymania płodności (Li i wsp., 2019; Mikedis i wsp., 2020). *DAZL* jest kluczowym regulatorem procesu spermatogenezy poprzez modulację ekspresji genów zaangażowanych w determinację, różnicowanie i mejozę komórek rozrodczych. Bierze przede wszystkim udział w dojrzewaniu komórek rozrodczych, promując proliferację spermatogonii i różnicowanie spermatocytów, co ostatecznie prowadzi do produkcji funkcjonalnych plemników (Li i wsp., 2019; Nicholls i wsp., 2019; Mikedis i wsp., 2020). Brak białka *DAZL* blokuje mejozę spermatocytów, zmniejsza ilość i jakość dojrzałych plemników oraz prowadzi do oligospermii lub azospermii (Ma i wsp., 2013).

Ma i wsp. (2013) szukając potencjalnych markerów molekularnych do poprawy cech jakości nasienia u świń zidentyfikowali dwa polimorfizmy pojedynczego nukleotydu: c.570+385 A>G w intronie 7 oraz c.735+150 C>A w intronie 9. W populacji świń rasy wielka biała i landrace, wykazali, że osobniki o genotypie AG różniły się statystycznie istotnie wyższą ruchliwością plemników niż knury GG. W przypadku knurów rasy duroc, wykazali, że heterozygoty CA różniły się statystycznie istotnie niższą ruchliwością i koncentracją plemników w ejakulacie niż homozygoty CC i AA. Dodatkowo knury rasy wielka biała o genotypie CC produkowały istotnie mniej ($p \leq 0,05$) nieprawidłowych form plemników niż zwierzęta o genotypie CA i AA. Autorzy zasugerowali, że genotyp CC powinien być preferowany w wyborze zwierząt do rozrodu.

We wcześniejszych badaniach Zhang i wsp. (2009) wykazali, że polimorficzne warianty *DAZL* mogą wpływać na wielkość miotu. Mutacja C>A w intronie 9 w populacji świń wielka biała i linii DIV spowodowała, że homozygoty CC charakteryzowały się istotnie wyższym odsetkiem żywo urodzonych prosiąt od pozostałych genotypów CD i DD.

Estrogeny odgrywają główną rolę w przebiegu procesów rozrodczych u samic. Badania jednak dowodzą, że mogą być również zaangażowane w regulację męskich funkcji rozrodczych. Wpływają między innymi na zachowanie płciowe oraz regulują proces spermatogenezy, stymulują wzrost komórek oraz ich podziały (Gunawan i wsp., 2012; Skibińska i wsp., 2023). Istnieją dwie izoformy receptora estrogenowego: alfa i beta, są one kodowane przez dwa różne geny. Transgeniczne myszy pozbawione receptora estrogenowego beta nadal są płodne, inaczej niż w przypadku braku receptora estrogenowego alfa. Jednak nadekspresja *ESR2* (*Estrogen Receptor 2*, *Estrogen Receptor Beta*) może prowadzić do zahamowania cyklu komórek rozrodczych, a nawet ich apoptozy; co znacząco wpływa na płodność (Selva i wsp., 2004; Terman i wsp., 2006; Gunawan i wsp., 2012). W badaniach Carpino i wsp. (2004) wykazali, że *ESR2* może modulować funkcje najądrza dorosłych knurów i jest zaangażowany w morfologiczne i biochemiczne dojrzewanie plemników.

Gen *ESR2* u świń znajduje się na chromosomie 1. Terman i wsp. (2006) badając związek pomiędzy polimorficznymi wariantami *ESR2* a cechami nasienia takimi jak objętość ejakulatu, koncentracja, odsetek plemników żywych, zidentyfikowali dwa allele tego genu – C oraz D w grupie badanych knurów różnych ras. Badania wykazały, że osobniki o genotypie CC charakteryzowały się najwyższą średnią objętością ejakulatów oraz najwyższym odsetkiem żywych plemników, natomiast osobniki o genotypie DD produkowały ejakulatory o najwyższej koncentracji. Badane cechy nasienia wykazały statystycznie istotne różnice ($p \leq 0,01$) pomiędzy wszystkimi analizowanymi parametrami u knurów posiadających różne genotypy.

W badaniach Gunawan i wsp. (2012) wykazali, że polimorfizm pojedynczego nukleotydu w eksonie 5 genu *ESR2* g.35547 A>G ma związek z jakością ejakulatów i płodnością knurów pietrain oraz pietrain $\times$ Hampshire. W obu populacjach osobniki o genotypie AA charakteryzowały się istotnie

wyższą ruchliwością i mniejszą liczbą plemników z kroplą cytoplazmy ($p = 0,06$) niż osobniki o genotypie AG lub GG. Dodatkowo w populacji knurów pietrain genotyp AA charakteryzował się wyższą liczbą żywo urodzonych prosiąt na poziomie $p = 0,06$. Zwierzęta o genotypie AA w populacji knurów pietrain $\times$ Hampshire statystycznie istotnie różniły się od pozostałych wyższą koncentracją i ruchliwością plemników, mniejszą objętością ejakulatu i niższym odsetkiem plemników z kroplą cytoplazmy. Genotypy AG i GG powiązane były z gorszymi cechami ejakulatu w obu grupach.

Gen *PIWIL4* (*Piwi like RNA-mediated gene silencing 4*) zlokalizowany jest u świń na 9 chromosomie. Koduje białka należące do rodziny Argonaute, w której wyróżnia się cztery podrodziny: Ago, Piwi, Wago oraz Trypanosoma Ago. Białka podrodziny Piwi uczestniczą w wygaszaniu RNA transpozonów w procesie spermatogenezy (Poteręła i Rzeszowska-Wolny, 2016). W badaniach różnych autorów wykazano duże podobieństwo sekwencji białek Piwi pomiędzy świnią domową a człowiekiem. Analiza ekspresji genów *PIWI* w różnych tkankach ujawniła tkankowo-specyficzną ekspresję ograniczającą się do gonad. Ekspresja transkryptu *PIWIL4* była znacznie wyższa w jądrach młodych knurów niż u dorosłych samców (Kowalczykiewicz i wsp., 2012; Song i wsp., 2015).

Song i wsp. (2015) jako pierwsi podjęli się analizy polimorfizmów genu *PIWIL4* w powiązaniu z cechami jakości nasienia. Zidentyfikowali dwa polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (g.572 T>C, g.561 A>G). Przeprowadzone przez powyższych autorów badania na knurach ras duroc, wielka biała i landrace wykazały, że od knurów landrace z wariantem CT pozyskano ejakulaty o istotnie większej objętości niż od knurów TT ($p \leq 0,05$). Natomiast knury duroc o genotypie AA charakteryzowały się istotnie wyższą koncentracją plemników ($p \leq 0,05$) niż osobniki GG. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że gen ten może być potencjalnym markerem molekularnym związanym z cechami reprodukcyjnymi u świń.

Rozszerzenie badań powyższych autorów o analizę dodatkowych cech funkcjonalnych plemników może pozwolić na szczegółową ocenę i wybór osobników o preferowanych cechach produkcyjnych, a identyfikacja *loci* z dużym efektem fenotypowym w zakresie analizowanych cech, może stanowić dodatkową informację dla programów tradycyjnej selekcji materiału hodowlanego.

3. Cel pracy i hipoteza badawcza

3.1. Cel pracy

Głównym celem pracy było określenie zmian strukturalno-funkcjonalnych plemników przechowywanych w stanie płynnym z uwzględnieniem polimorfizmu genów *CD9*, *DAZL*, *ESR2*, i *PIWIL4* oraz grupy genetycznej knurów.

Cel ten realizowano poprzez:

1. Podjęcie próby określenia związków między polimorfizmem genów *CD9*, *DAZL*, *ESR2* i *PIWIL4* a wybranymi wskaźnikami jakości konserwowanego nasienia z uwzględnieniem grupy genetycznej badanych zwierząt.
2. Określenie zmian w poszczególnych parametrach ruchu plemników konserwowanych w stanie płynnym w kolejnych dniach przechowywaniach nasienia przy pomocy komputerowo wspomaganej analizy (CASA) oraz tradycyjnej metody oceny ruchliwości nasienia.
3. Określenie zmian w integralności błony komórkowej i akrosomu oraz mitochondrialnego potencjału transbłonowego w czasie przechowywania nasienia przy pomocy testów fluorescencyjnych.

3.2. Hipoteza badawcza

W obrębie występujących form polimorficznych badanych genów i grup genetycznych zwierząt występują różnice w jakości nasienia ocenianego na podstawie analizowanych cech strukturalno-funkcjonalnych plemników w kolejnych dniach przechowywania, co daje możliwość wyboru najbardziej odpowiedniego genotypu, a tym samym knura i pobranych od niego ejakulatów do inseminacji.

4. Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 195 ejakulatach pobranych od 195 knurów ras/grup genetycznych: duroc (n = 50), duroc × pietrain (n = 28), pbz (n = 52), PIC (n = 34) oraz wbp (n = 31) w wieku od 18 do 36 miesięcy użytkowanych rozplodowo w dwóch stacjach hodowli i unasienniana zwierząt w województwie zachodniopomorskim. Knury utrzymywane były w jednolitych warunkach, zgodnie z obowiązującymi normami, pod stałą kontrolą lekarza weterynarii. W badaniach wykorzystano nasienie, które zgodnie z procedurami w tego typu ośrodkach zostało poddane ocenie makro- i mikroskopowej oraz zakwalifikowane do produkcji dawek inseminacyjnych. Nasienie od knurów pobierano metodą manualną, pozyskując frakcję ejakulatu bogatą w plemniki. Rozcieńczzone nasienie konfekcjonowane było w plastikowych, termicznie zgrzewanych tubach stanowiących pojedynczą dawkę inseminacyjną, standaryzowaną według procesu technologicznego stosowanego w zakładzie unasienniania na objętość 90 cm³ i zawartość $2,5 - 3,0 \times 10^6$ plemników/cm³. Dawki inseminacyjne schładzano i przechowywano w temperaturze 16 °C w klimatyzowanym pomieszczeniu. Następnie przetransportowano je w temperaturze 16 °C do Katedry Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska ZUT, gdzie przeprowadzono ocenę jakości nasienia podczas przechowywania (16 °C; termoboks DTC-17, Minitüb, Niemcy).

Badanie wykonano w dwóch etapach. W pierwszym etapie nasienie w stanie płynnym przechowywano przez 7 dni. Gotowe dawki inseminacyjne przygotowane były z wykorzystaniem komercyjnych rozcieńczalników Vitasem LD (Megapor S.L., Hiszpania) oraz Gedil (GD, Genes Diffusion, Francja). Ta część doświadczenia miała na celu określenie zmian funkcjonalnych i strukturalnych zachodzących w plemnikach w 1., 3., 5. i 7. dniu przechowywania. Kolejnym etapem była analiza genetyczna badanych grup knurów. Z zamrożonych próbek dawek inseminacyjnych wyizolowano DNA oraz zidentyfikowano polimorfizmy badanych genów metodą PCR–RFLP.

4.1. Ocena integralności błony komórkowej oraz akrosomu na podstawie barwienia różnicowego

Pierwszego dnia badań wykonano preparaty morfologiczne, wykorzystując barwienie różnicowe mieszaniną barwników eozyna – nigrozyna (wg Lasleya, Easleya i McKenzie, 1942; w modyfikacji Bloma, 1950). Metoda przyżyciowego barwienia, pozwala na rozróżnienie żywych plemników charakteryzujących się ciągłością błony komórkowej, których główki nie absorbują eozyny i pozostają niezabarwione, od plemników martwych z uszkodzoną błoną komórkową, których główki barwią się na ciemnoróżowo. Nigrozyna umożliwia zwiększenie kontrastu pomiędzy główką plemnika a otoczeniem, ciemne wybarwienie tła pozwala na lepszą ocenę morfologii komórki. Wykorzystywano 5 % roztwór wodny eozyny niebieskawej i 10 % roztwór wodny nigrozyny, wymieszany w stosunku 1:4 (Bielański, 1977).

Przed przystąpieniem do wykonania preparatów z dawek inseminacyjnych pobrano próbki o objętości ok. 0,5 ml do probówek typu Eppendorf, które następnie inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37 °C w inkubatorze CO₂, MCO-17AI (Sanyo, Japonia). Barwnik, szkiełka podstawowe oraz bagietki potrzebne do wykonania rozmazu zostały również podgrzane do temperatury 37 °C. Na szkiełku podstawowym mieszano kroplę nasienia z kroplą barwnika przez ok. 30 sekund, następnie wykonywano rozmaz i pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Utrwalone preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym (Nikon E200) przy 1000-krotnym powiększeniu z użyciem olejku immersyjnego. Przeprowadzono analizę prawidłowych i zmienionych form plemników dokonaną wg klasyfikacji Bloma (1981) z uwzględnieniem wad głównych i podrzędnych. Oceniano także stopień uszkodzenia akrosomu według Saake i White'a (1972). Każdorazowo ocenie poddawano co najmniej 200 komórek, wyniki przedstawiono jako:

- odsetek plemników żywych,
- odsetek plemników martwych,
- odsetek plemników normalnych o prawidłowej morfologii,
- odsetek plemników z wadami głównymi,
- odsetek plemników z wadami podrzędnymi,
- odsetek plemników z nieuszkodzonym akrosomem.

Analiza próbek prowadzona była na nasieniu rozcieńczonym, dlatego ocena morfologiczna w pracy traktowana jest jako dodatkowa informacja.

4.2. Ocena integralności błony komórkowej oraz akrosomu na podstawie barwienia fluorescencyjnego

W badaniach zastosowano barwienie łączone, stosując trzy fluorochromy SYBR-14 i PI (LIVE/DEAD™ Sperm Viability Kit, Invitrogen™, USA) oraz PNA skoniugowaną z barwnikiem Alexa Fluor 594 (Invitrogen™, Eugene, OR, USA). Lektyna PNA pochodząca z *Arachis hypogea* stosowana jest do wykrywania uszkodzeń struktury akrosomu. Wykazuje powinowactwo do reszt β -galaktozowych zlokalizowanych na zewnętrznej błonie akrosomalnej, utrata integralności powoduje związanie barwnika i fluorescencję (Silva i Gadella, 2006).

Przygotowanie próbek do analizy wyglądało tak jak w przypadku przygotowania ich do wykonania preparatów morfologicznych. Następnie w warunkach słabego oświetlenia dodawano 2,5 μ l SYBR-14. Ponownie inkubowano próbkę w temperaturze 37 °C w ciemności przez 10 minut, dalej dodawano 2,5 μ l PI oraz 5 μ l PNA i ponownie przeprowadzano 10-cio minutową inkubację w tej samej temperaturze (Garner i wsp., 1995, 1997; Maxwell i Johnson, 1997; Silva i Gadella, 2006; w modyfikacji Katedry Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska). Kolejno wykonano preparaty, które oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym Olympus BX41 (Olympus Optima Co.,

Ltd, Japonia) z użyciem filtrów U-MWIBA2 i U-N51004 F/R V2) w powiększeniu 400-krotnym i zliczano 200 plemników uwzględniając procentowy udział następujących subpopulacji:

- plemniki żywe (PI-negatywne) – z integralną, nieuszkodzoną błoną komórkową, w obrazie mikroskopowym główki emitowały zieloną fluorescencję wskazującą na wybarwienie się fluorochromem SYBR-14 (i brak wybarwienia PI),
- plemniki martwe (PI-pozytywne) – z nieintegralną, uszkodzoną błoną komórkową, w obrazie mikroskopowym częściowo bądź na całym obszarze główki emitowały czerwoną fluorescencję wskazującą na wybarwienie się fluorochromem PI.

W obrębie subpopulacji plemników żywych wyróżniano:

- plemniki żywe z integralnym akrosomem (PI-negatywne, PNA-negatywne), emitujące zieloną fluorescencję główki,
- plemniki żywe z nieintegralnym akrosomem (PI-negatywne, PNA-pozytywne), emitujące zieloną fluorescencję główki oraz czerwoną fluorescencję w obrębie akrosomu.

4.3. Ocena integralności błony komórkowej oraz aktywności mitochondriów plemników na podstawie barwienia fluorescencyjnego

W badaniach zastosowano barwienie łączone, stosując trzy fluorochromy SYBR-14 i PI (LIVE/DEAD™ Sperm Viability Kit, Invitrogen™, USA) oraz JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanineiodide; Mitochondrial Membrane Potential Probe, Invitrogen™, USA). Barwnik SYBR-14 posiada zdolność przenikania przez nieuszkodzone błony komórkowe i interkaluje do DNA, wzbudzony wyzwała zieloną fluorescencję. Uszkodzenie błony umożliwia wniknięcie jodku propidyny (PI), który wypiera SYBR-14 i emituje czerwoną fluorescencję (Silva i Gadella, 2006).

Przygotowanie próbek do analizy wykonano tak jak poprzednio. Kolejno w warunkach słabego oświetlenia dodawano 2,5 µl SYBR-14 oraz 5 µl JC-1. Ponownie inkubowano próbkę w temperaturze 37 °C w ciemności przez 10 minut, dalej dodawano 2,5 µl PI i ponownie przeprowadzano 10-cio minutową inkubację w tej samej temperaturze (Garner i wsp., 1995, 1997; Maxwell i Johnson, 1997; Cheuqueman, 2012; w modyfikacji Katedry Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska). Następnie wykonano preparaty, które oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym Olympus BX41 (Olympus Optima Co., Ltd, Japonia) z użyciem filtra U-N51004 F/R V2 w powiększeniu 400-krotnym i zliczano 200 plemników uwzględniając procentowy udział następujących subpopulacji:

- plemniki żywe (PI-negatywne),
 - plemniki martwe (PI-pozytywne),
- ocenianie tak jak w poprzednim barwieniu.

W obrębie subpopulacji plemników żywych wyróżniano:

- plemniki z aktywnymi mitochondriami wykazującymi wysoki mitochondrialny potencjał transbłonowy ($\Delta\Psi_m$) – plemniki emitujące intensywną pomarańczową fluorescencję w regionie wstawki,
- plemniki z aktywnymi mitochondriami wykazującymi obniżony $\Delta\Psi_m$ – plemniki emitujące pomarańczowo-zieloną fluorescencję w regionie wstawki,
- plemniki z niską aktywnością mitochondriów wykazujące niski $\Delta\Psi_m$ – plemniki emitujące zieloną fluorescencję w regionie wstawki.

Dla uproszczenia w pracy subpopulacje plemników żywych wykazujących wysoki i obniżony $\Delta\Psi_m$ przedstawiono łącznie i określano jako odsetek plemników o wysokim $\Delta\Psi_m$.

4.4. Analiza ruchliwości plemników

Przygotowanie próbek wyglądało tak jak w poprzednich analizach. Ruchliwość nasienia oceniano metodą szacunkową wykorzystując ogrzany do 37 °C stolik Bloma oraz szkiełka nakrywkowe. Przygotowany preparat oglądano w kilku miejscach w kontraście fazowym w powiększeniu 100-krotnym. Szacunkowej oceny odsetka plemników o ruchu postępowym dokonano w warstwie 5 μm w kilku polach widzenia (Bielański, 1977).

Kolejno przeprowadzono komputerową ocenę ruchliwości plemników wykorzystując system SCA (Sperm Class Analyzer®, Microptic S.L., Hiszpania) skonfigurowany z kamerą cyfrową (A312FC/C, Basler, Niemcy) i mikroskopem Nikon Eclipse E-200z (Nikon Corporation, Japonia) wyposażonym w podgrzewany stolik (Semic Bioelektronika, Polska). Analizę obrazu przeprowadzono w kontraście fazowym ujemnym przy częstotliwości automatycznie pobieranych obrazów wynoszącej 25 Hz w powiększeniu 100-krotnym. Po inkubacji, 2 ml nasienia nanoszono na ogrzaną do 37 °C komorę Leja (Leja-8 20 μm ; Leja Products B.V., Holandia) po czym przeprowadzano analizę. Dla każdej próby nasienia oceniano wskaźniki ruchu dla co najmniej 500 plemników w 5 różnych polach widzenia.

System CASA przetwarza obraz mikroskopowy rejestrowany kamerą wideo oraz analizuje go. Moduł SCA® *motility and concentration* pozwala na automatyczną analizę ruchliwości plemników oraz na określenie koncentracji nasienia w próbce. W celu standaryzacji badań, identyfikacji plemników knura oraz analizy parametrów ruchu gamet zdefiniowano ustawienia wstępne: powierzchnia analizowanych obiektów > 10 i $< 80 \mu\text{m}^2$, wartości graniczne średniej prędkości plemników po przybliżonej ścieżce ruchu VAP (nie wykazujących ruchu – $\text{VAP} < 10 \mu\text{m/s}$, poruszających się ruchem wolnym – $10 \leq \text{VAP} < 25 \mu\text{m/s}$, poruszających się ruchem o średniej prędkości – $25 \leq \text{VAP} < 45 \mu\text{m/s}$, poruszających się ruchem szybkim – $\text{VAP} \geq 45 \mu\text{m/s}$), STR indeks prostoliniowości dla obiektów uznawanych za progresywne wartość $> 45\%$, LIN liniowość ruchu plemnika dla obiektów uznawanych za progresywne wartość $> 50\%$.

W ocenie zmian ruchliwości plemników w czasie przechowywania nasienia wyodrębniono i określono procentowy udział subpopulacji plemników:

- plemniki ruchliwe ($VAP \geq 10 \mu\text{m/s}$),
- plemniki o ruchu postępowym ($VAP \geq 25 \mu\text{m/s}$, przy prostości ruchu – $STR > 45\%$),
- plemniki o ruchu postępowym szybkim ($VAP \geq 45 \mu\text{m/s}$, $STR > 45\%$),
- plemniki o ruchu postępowym umiarkowanym ($25 \leq VAP < 45 \mu\text{m/s}$, $STR > 45\%$),
- plemniki o ruchu wolnym ($10 \leq VAP < 25 \mu\text{m/s}$),
- plemniki nie wykazujące ruchu ($VAP < 10 \mu\text{m/s}$).

oraz parametry kinetyczne plemników:

- VCL – prędkość krzywoliniowa, obliczana poprzez sumowanie kolejnych odcinków drogi plemnika i dzielona przez czas trwania obserwacji ($\mu\text{m/s}$),
- VSL – prędkość liniowa, obliczana jako odległość pomiędzy pierwszą a ostatnią pozycją plemnika w czasie rejestracji ($\mu\text{m/s}$),
- VAP – prędkość uśredniona plemnika obliczana na podstawie wygładzonej drogi plemników, uzyskanej przez uśrednienie maksymalnych odchylen od właściwej trajektorii; wartość ta odpowiada rzeczywistej progresji plemnika w czasie ($\mu\text{m/s}$),
- LIN – liniowość, stanowiąca miarę odchylen toru plemnika od linii prostej; obliczana jako stosunek VSL/VCL wyrażony w procentach (%),
- STR – prostota ruchu plemnika, stanowiąca miarę odchylenia ścieżki wygładzonej od linii prostej łączącej początkowe i końcowe położenie plemnika; obliczana jako stosunek VSL/VAP wyrażony w procentach (%),
- WOB – oscylacja toru rzeczywistego, stanowiąca miarę odchylenia toru plemnika od ścieżki wygładzonej; obliczana jako stosunek VAP/VCL wyrażony w procentach (%),
- ALH – amplituda bocznych wychyleń główki plemnika, wyrażana jako średnie odchylenie rzeczywistej drogi od wygładzonej trajektorii (μm),
- BCF – częstotliwość bocznych wychyleń główki podczas rzeczywistej drogi plemnika (Hz).

4.5. Identyfikacja genotypów

Materiał badawczy stanowiły próbki dawek inseminacyjnych zamrożone w temperaturze -20°C . Do wyizolowania DNA użyto zestawu ExtractMe DNA Swab & Semen Kit (Blirt, Polska). Izolacja DNA została przeprowadzona zgodnie z załączoną metodyką. Pozwala on na uzyskanie DNA o koncentracji $2 - 7 \mu\text{g}$ z $150 \mu\text{l}$ próbki nasienia. Czystość wyizolowanego DNA mieści się w przedziale $1,7 - 2,0$ (A_{260}/A_{280}).

Zestaw przeznaczony jest do szybkiej i wydajnej izolacji genomowego DNA o wysokiej czystości. Procedura oczyszczania DNA składa się z czterech etapów i jest przeprowadzana z wykorzystaniem minikolumn. Zawierają one odpowiednie złoże, które wydajnie i selektywnie wiąże kwasy nukleinowe. Próbka nasienia poddawana jest lizie enzymatycznej z wykorzystaniem buforu SSL, proteiny K oraz DTT. Na tym etapie degradacji ulegają błony i wszystkie białka komórkowe.

Po dodaniu soli chaotropowych i etanolu, lizat przenoszony jest na minikolumny ze złożem. Dwuetapowe przemywanie DNA (*Washing Buffer*) ma na celu usunięcie zanieczyszczeń i inhibitorów reakcji enzymatycznych. Oczyszczone DNA eluowane jest z mini kolumny buforem o niskiej sile jonowej (*Elution Buffer*) i jest gotowe do bezpośredniego wykorzystania w reakcji PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Polimorfizm genów *CD9*, *DAZL*, *ESR2* oraz *PIWIL4* zidentyfikowano metodą PCR–RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*). Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze trójblokowym, model T3 (Biometra®, Niemcy) po uprzedniej optymalizacji warunków termicznych i składu mieszaniny reakcyjnej. W reakcji PCR wykorzystano startery zaprojektowane z użyciem programu Primer3 lub zaproponowane przez innych autorów (tab. 2). Analizę restrykcyjną przeprowadzono z zastosowaniem programu RestrictionMapper.

Tab. 2. Wykaz starterów użytych do amplifikacji badanych fragmentów genów

Gen / SNP	Sekwencje starterów	Źródło
<i>CD9</i> g.358 A>T	<i>F 5' TAATGGGGGGAGTGGAAACAA 3'</i> <i>R 5' GCCAATGATGTGGAACCTT 3'</i>	Primer3 Untergasser i wsp., 2012
<i>DAZL</i> c.735+150 C>A	<i>F 5' GAAGCTGCTCCATCCTCTG 3'</i> <i>R 5' TCTTGGCAATAACAGACCCT 3'</i>	Zhang i wsp., 2009
<i>ESR2</i> g.35547 A>G	<i>F 5' CCCATATGATTTATGTTTTCTCAGC 3'</i> <i>R 5' ACCTCCAACCAGCAGCTCTC 3'</i>	Primer3 Untergasser i wsp., 2012
<i>PIWIL4</i> g.572 T>C	<i>F 5' CCTTTGGAGTGCTCGTTT 3'</i> <i>R 5' GGTTAGAGGCTCTGATGGA 3'</i>	Primer3 Untergasser i wsp., 2012

Mieszanina reakcyjna sporządzana była w objętości 15 µl. Jej skład zaprezentowano w tabeli 3. Profile termiczne poszczególnych reakcji zestawiono w tabeli 4, dla każdego genu reakcja przebiegała w 35 cyklach.

Tab. 3. Skład mieszaniny do reakcji amplifikacji fragmentów analizowanych genów

Składnik	Stężenie końcowe
DNA	75 – 100 ng
polimeraza <i>Taq</i>	1,0 U
bufor do PCR	1x
mieszanina wolnych nukleotydów (dNTPs)	0,2 mM
jony magnezu (MgCl ₂)	2,5 mM
starter 1	12,0 pmol
starter 2	12,0 pmol
woda dejonizowana	–

Tab. 4. Profile termiczne reakcji PCR

Gen		Denaturacja wstępna	Denaturacja właściwa	Przylączenie starterów	Amplifikacja	Synteza końcowa
<i>CD9</i>	temperatura	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C
	czas	5 min	30 s	30 s	45 s	10 min
<i>DAZL</i>	temperatura	94 °C	94 °C	57 °C	72 °C	72 °C
	czas	3 min	30 s	35 s	45 s	8 min
<i>ESR2</i>	temperatura	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	72 °C
	czas	5 min	30 s	30 s	30 s	10 min
<i>PIWIL4</i>	temperatura	94 °C	94 °C	57 °C	72 °C	72 °C
	czas	5 min	40 s	30 s	30 s	10 min

Uzyskane amplikony zostały poddane trawieniu odpowiednim enzymem restrykcyjnym przez całą noc w określonej temperaturze (tab. 5). Produkty trawienia były rozdzielane w 1,5 oraz 2 % żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy (bromek 3,8-diamino-N-etylo-6-fenilo-fenantrydyny) i w obecności wzorca DNA pUC19 DNA/MspI (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) lub Perfect 100-1000 bp DNA Ladder (Eurx, Polska) w 1x TBE (90 V, 40 min). Rozdział przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu do elektroforezy poziomej (BIO-RAD, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, USA). W celu odczytania i zwizualizowania wyników użyty został system dokumentacji i analizy obrazów żeli elektroforetycznych (Vilber Lourmat, Francja). Poszczególne genotypy wraz z przewidywaną długością fragmentów restrykcyjnych przedstawiono w tabeli 5.

Tab. 5. Długości fragmentów restrykcyjnych dla analizowanych miejsc polimorficznych

Gen / SNP	Enzym restrykcyjny	Temperatura trawienia	Genotypy i odpowiadające im fragmenty restrykcyjne
<i>CD9</i> g.358 A>T	<i>HinfI</i>	37 °C	AA – 523 pz AT – 523 pz, 357 pz, 166 pz TT – 357 pz, 166 pz
<i>DAZL</i> c.735+150 C>A	<i>TaqI</i>	65 °C	AA – 186 pz, 297 pz AC – 483 pz, 297 pz, 186 pz CC – 483 pz
<i>ESR2</i> g.35547 A>G	<i>NlaIII</i>	37 °C	AA – 284 pz, 146 pz, 28 pz AG – 284 pz, 174 pz, 146 pz, 28 pz GG – 284 pz, 174 pz
<i>PIWIL4</i> g.572 T>C	<i>HhaI</i>	37 °C	CC – 241 pz, 82 pz CT – 323 pz, 241 pz, 82 pz TT – 323 pz

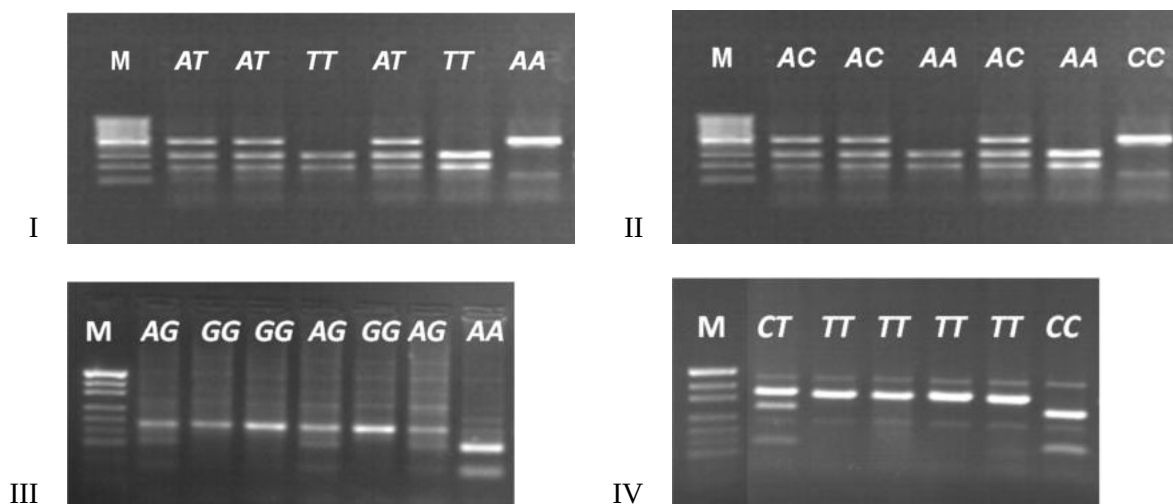
5. Analiza statystyczna

W ramach analizy statystycznej oszacowano częstość występowania alleli, genotypów dla każdego z analizowanych polimorfizmów w badanej grupie zwierząt. Uzyskane wyniki przedstawiono uwzględniając średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe (SD), medianę oraz zakres zmiennych (min – max). Zgodność rozkładu zmiennych ciągłych z rozkładem normalnym sprawdzano stosując test Shapiro-Wilka (zgodność na poziomie istotności $p \geq 0,05$). Ocenę wpływu czasu przechowywania na analizowane zmienne określano na podstawie testu analizy wariancji powtarzanych pomiarów dla rang Friedmana (ANOVA Friedmana, porównanie zmiennych pomiędzy poszczególnymi dniami przechowywania), testu U Manna-Whitneya (porównanie niezależnych grup badanych w danym dniu przechowywania w obrębie wariantów polimorficznych) oraz testu Kruskala-Wallisa (porównanie niezależnych grup badanych w danym dniu przechowywania w obrębie wariantów polimorficznych oraz pomiędzy grupami genetycznymi). Za poziom istotności testu przyjęto wartości $p \leq 0,05$ oraz $p \leq 0,01$. Występowanie wzajemnych zależności między wybranymi zmiennymi sprawdzono (dla nasienia przechowywanego przez 7 dni) określając współczynniki korelacji rang Spearmana (r_s). Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem programu Statistica v.13.3 (StatSoft, Polska).

6. Wyniki i dyskusja

6.1. Analiza miejsc polimorficznych

W wyniku przeprowadzonego genotypowania w badanej grupie zwierząt, stwierdzono obecność wszystkich trzech możliwych genotypów w każdym z analizowanych polimorfizmów. Elektroforegramy obrazujące poszczególne genotypy zaprezentowano na rycinie 1.



Ryc. 1. Elektroforegramy przedstawiające poszczególne genotypy analizowanych SNP

I – polimorfizm *CD9* g.358 A>T; M – wzorzec DNA (Perfect 100-1000 bp DNA Ladder); AA, AT, TT – genotypy;

II – polimorfizm *DAZL* c.735+150 C>A; M – wzorzec DNA (pUC19/*Msp*I); AA, AC, CC – genotypy;

III – polimorfizm *ESR2* g.35547 A>G; M – wzorzec DNA (pUC19/*Msp*I); AA, AG, GG – genotypy;

IV – polimorfizm *PIWIL4* g.572 T>C; M – wzorzec DNA (pUC19/*Msp*I); CC, CT, TT – genotypy.

Częstość występowania genotypów i alleli przedstawiono w tabeli 6. Najczęściej i najrzadziej obserwowanymi genotypami były odpowiednio AA oraz TT w przypadku polimorfizmu *CD9* g.358 A>T; AA oraz CC w przypadku polimorfizmu *DAZL* c.735+150 C>A; GG oraz AA w przypadku polimorfizmu *ESR2* g.35547 A>G; TT oraz CC w przypadku polimorfizmu *PIWIL4* g.572 T>C. W związku z zidentyfikowaniem tylko trzech osobników o genotypie *CD9*/TT nie uwzględniono ich w dalszej analizie.

Tab. 6. Frekwencja genotypów i alleli analizowanych polimorfizmów w badanej grupie zwierząt

Frekwencja genotypów			Frekwencja alleli	
CD9				
AA	AT	TT	A	T
0,89 (172)	0,1 (19)	0,01 (3)	0,94	0,06
DAZL				
AA	AC	CC	A	C
0,47 (92)	0,32 (62)	0,21 (41)	0,63	0,37
ESR2				
AA	AG	GG	A	G
0,15 (30)	0,35 (68)	0,50 (96)	0,33	0,67
PIWIL4				
CC	CT	TT	C	T
0,04 (8)	0,14 (26)	0,82 (159)	0,11	0,89

W nawiasach podano liczbę osobników z danym genotypem.

Tab. 7. Liczba osobników w poszczególnych rasach/grupach genetycznych względem wariantów polimorficznych

Gen	Wariant polimorficzny	Rasa/grupa genetyczna					
		duroc	duroc × pietrain	pbz	PIC	wbp	ogólnie
<i>CD9</i>	<i>AA</i>	50	17	50	34	21	172
	<i>AT</i>	–	10	2	–	7	19
	<i>TT</i>	–	–	–	–	3	3
<i>DAZL</i>	<i>AA</i>	38	19	9	11	15	92
	<i>AC</i>	8	6	23	13	12	62
	<i>CC</i>	4	3	20	10	4	41
<i>ESR2</i>	<i>AA</i>	2	3	22	–	3	30
	<i>AG</i>	3	14	16	23	12	68
	<i>GG</i>	45	11	14	11	15	96
<i>PIWIL4</i>	<i>CC</i>	6	2	–	–	–	8
	<i>CT</i>	13	5	6	2	–	26
	<i>TT</i>	31	19	46	32	31	159

6.2. Tradycyjna ocena mikroskopowa

Nasienie knurów przechowywane w stanie płynnym jest najczęstszą metodą konserwacji stosowaną przy inseminacji w produkcji trzody chlewnej. Ekonomicznym miernikiem efektywności użytkowania rozplodowego knurów jest liczba dawek nasienia uzyskana z ejakulatu. W praktyce laboratoryjnej w centrach inseminacyjnych nasienie poddawane jest ocenie makro- i mikroskopowej

polegającej na sprawdzeniu różnych parametrów takich jak: barwa, zapach, pH, objętość, koncentracja czy odsetek plemników wykazujący prawidłową ruchliwość (Pokrywka i wsp., 2009; Kondracki, 2010; Maes i wsp., 2016; Waberski i wsp., 2019; Schulze i wsp., 2023). Ocena ta pozwala na wybór ejakulatów spełniających podstawowe kryteria przyjęte w praktyce inseminacyjnej. Dlatego też w pierwszym etapie badań postanowiono przeanalizować kształtowanie się podstawowych wskaźników w poszczególnych grupach uwzględniających wariant polimorficzny badanych genów oraz rasę/grupę genetyczną. Zamieszczone dane w tabelach 8. i 9. wskazują, że po pobraniu nasienie badanych knurów spełniało ogólnie przyjęte kryteria w inseminacji. Pobrane ejakulatory powinny mieć objętość od 80 do 900 ml, przy koncentracji plemników od 500 do $800 \times 10^6/\text{ml}$ i ogólnej ich liczbie w 1 ml od 150 do 600×10^6 . W nasieniu tym minimum 70 % plemników winno poruszać się ruchem postępowym (Bielański, 1977; Wierzbowski, 1996; Strzeżek, 2007).

Z przedstawionych danych w tabeli 8. wynika, że średnia objętość pobranych ejakulatów w grupach uwzględniających dany gen była podobna, wynosząc od $248,9 \pm 91,7 \text{ cm}^3$ w przypadku genu *CD9* do $251,2 \pm 92,9 \text{ cm}^3$ dla genu *ESR2*, przyjmując zbliżone wartości w grupach pozostałych dwóch genów. Wykonane obliczenia statystyczne wykazały, że w przypadku genu *ESR2* wystąpiły różnice istotne w kształtowaniu się tej cechy. Od knurów z wariantem polimorficznym *AA* uzyskiwano ejakulatory o najwyższej objętości ($291,4 \pm 129,8 \text{ cm}^3$, mediana $268,0 \text{ cm}^3$), a od knurów z wariantem polimorficznym *GG* pozyskiwano ejakulatory o najniższej objętości ($225,1 \pm 81,7 \text{ cm}^3$, mediana $217,0 \text{ cm}^3$). W grupie knurów *ESR2/AG* wskaźnik ten wynosił średnio $271,7 \pm 77,4 \text{ cm}^3$ mediana $264,0 \text{ cm}^3$). Oszacowane różnice między homozygotyczną grupą *GG* a pozostałymi grupami okazały się statystycznie istotnie ($p \leq 0,01$). Istotne różnice ($p \leq 0,01$) zaobserwowano również w koncentracji plemników między osobnikami *ESR2/AA* ($351,5 \pm 117,6 \text{ cm}^3$, mediana $331,0 \text{ cm}^3$) a *ESR2/GG* $438,1 \pm 153,3 \text{ cm}^3$, mediana $410,0 \text{ cm}^3$) oraz *DAZL/AA* ($442,01 \pm 164,7 \text{ cm}^3$, mediana $408,0 \text{ cm}^3$) a *DAZL/CC* ($363,9 \pm 102,1 \text{ cm}^3$, mediana $350,0 \text{ cm}^3$, $p \leq 0,05$). Wpływ polimorfizmu genu *ESR2* w grupach knurów różnych ras przeanalizowali między innymi Terman i wsp. (2006) wykazując, że homozygoty *CC* odznaczają się statystycznie istotnie ($p \leq 0,01$) większą objętością i mniejszą koncentracją niż osobniki o genotypie *DD*. Gunawan i wsp. (2012) otrzymali podobne wyniki u mieszańców *pietrain* $\times$ *Hampshire*. Knury o genotypie *ESR2/AA* i *ESR2/AG* różniły się od osobników o genotypie *ESR2/GG* większą objętością i mniejszą koncentracją ($p \leq 0,05$). Song i wsp. (2015) zidentyfikowali dwa polimorfizmy genu *PIWIL4* (*T>C* oraz *A>G*), zaobserwowali, że knury landrace z wariantem *CT* oddawały ejakulatory o istotnie większej objętości niż knury *TT*. Natomiast knury *duroc* o genotypie *AA* charakteryzowały się istotnie wyższą koncentracją plemników niż osobniki *GG*.

W przypadku pozostałych analizowanych cech, tzn. ogólnej liczby plemników w ejakulacie, procentu plemników o ruchu postępowym i procentu plemników o ruchu postępowym ocenianym

na stoliku Bloma w pierwszym dniu badań, oszacowane różnice między wariantami polimorficznymi genów okazały się niewielkie, statystycznie nieistotne.

Analizując wpływ polimorfizmu badanych genów na kształtowanie się analizowanych cech nasienia, należy wziąć pod uwagę, że istotny był również wpływ rasy/genotypu knurów (tab. 9). Ejakulatory pobrane od knurów rasy duroc charakteryzowały się statystycznie istotnie niższą objętością ($186,2 \pm 60,8 \text{ cm}^3$, mediana $175,0 \text{ cm}^3$) w porównaniu z knurami pozostałych ras i mieszańcami ($p \leq 0,01$) oraz koncentracją ($508,8 \pm 160,0 \text{ cm}^3$, mediana $487,5 \text{ cm}^3$) istotnie wyższą ($p \leq 0,01$) od knurów linii PIC ($354,5 \pm 102,7 \text{ cm}^3$, mediana $325,5 \text{ cm}^3$), a także czystorasowych pbz ($352,5 \pm 104,1 \text{ cm}^3$, mediana $333,5 \text{ cm}^3$) i wbp ($374,8 \pm 123,2 \text{ cm}^3$, mediana $344,0 \text{ cm}^3$). Jak podaje Kondracki i wsp. (2004) oraz Pokrywka i wsp. (2009) a także Muczyńska i wsp. (2010), którzy uzyskali podobne wyniki, niższa objętość ejakulatu przy dużej koncentracji jest cechą charakterystyczną dla knurów duroc. Ekspresja genów tej rasy jest bardzo silna i jej mieszańce również charakteryzują się takimi wartościami objętości i koncentracji. Knury rasy duroc odznaczały się także najwyższą ruchliwością plemników bezpośrednio po pobraniu ejakulatów, przewyższając istotnie ($p \leq 0,01$) pod tym względem, osobniki ras pbz i wbp oraz mieszańce duroc $\times$ pietrain. Przeprowadzona ocena tego parametru pierwszego dnia po pobraniu nasienia wykazała jednak, że najwyższym procentem plemników o ruchu postępowym charakteryzują się knury linii PIC, a najniższym knury rasy wbp (tab. 9). Najprawdopodobniej więc, istotnym w tym przypadku okazał się wpływ czynników związanych z efektem rozcieńczenia i czasem przechowywania nasienia podczas jego przechowywania w pierwszej dobie. Jak podaje Strzeżek (2007) wrażliwość nasienia poddanego konserwacji, zarówno w stanie płynnym jak i mrożonym, jest zmienna i uwarunkowana wieloma czynnikami środowiskowymi i genetycznymi, jak pora roku, wiek knurów, rodzaj rozcieńczalnika, temperatura przechowywania czy rasa zwierząt. Występują również w tym względzie różnice osobnicze i znane są określenia w piśmiennictwie mówiące o dużej zmienności dotyczącej objętości ejakulatów czy ich koncentracji lub odsetka plemników morfologicznie zmienionych (Wysokińska i wsp., 2006; Kondracki i wsp., 2007; Bajena i wsp., 2013; Wysokińska i Kondracki, 2019; Górski i wsp., 2021; Kamanova i wsp., 2021; Gonzalez-Castro i wsp., 2022).

Dużą wartość prognostyczną w tradycyjnej ocenie nasienia mają badania morfologiczne. Wykazano bowiem u różnych gatunków zwierząt bezpośredni związek między wielkością zmian w budowie plemników a ich zdolnością zapładniającą (Bielański, 1977; Szostak i Sarzyńska, 2010; Henning i wsp., 2022b; Kondracki i wsp., 2023). W niniejszych badaniach ocenę morfologiczną plemników wykonano w pierwszym dniu przechowywania nasienia co mogło ewentualnie mieć pewien wpływ na wystąpienie niektórych wad, zwłaszcza typu podrzędnego związanych z witką. Z zamieszczonych danych w tabeli 10. wynika jednak, że wad tych było stosunkowo niedużo, a średni procent wad podrzędnych wynosił od $3,5 \pm 2,9$ do $5,8 \pm 6,4$ wśród wszystkich polimorficznych wariantów analizowanych genów i nie zaobserwowano w tym przypadku różnic statystycznie

istotnych. Wykazano natomiast istotnie ($p \leq 0,05$) mniejszy odsetek plemników z wadami głównymi dla knurów *DAZL/AC* ($2,8 \pm 3,4$ %, mediana 2,0 %) w porównaniu z *DAZL/AA* ($3,9 \pm 3,6$ %, mediana 3,0 %), a w przypadku kolejnego genu różnice wykazano między homozygotami *ESR2/AA* ($2,3 \pm 2,7$ %, mediana 2,0 %) a *ESR2/GG* ($4,1 \pm 3,9$ %, mediana 3,3 %). Należy jednak zwrócić uwagę, że średnie wartości tych cech mieściły się w ogólnie przyjętych normach dla oceny morfologicznej nasienia knurów (Trzcińska i Bryła, 2017). Średni odsetek plemników o prawidłowej budowie oscylował w granicach 92,0 % dla wszystkich genotypów. Istotnie statystyczne różnice potwierdzono tylko między osobnikami *ESR2/AG* ($93,3 \pm 4,6$ %, mediana 94,0 %) a *ESR2/GG* ($91,1 \pm 5,8$ %, mediana 92,0 %, $p \leq 0,05$). Odsetek plemników z nieuszkodzonym akrosomem wynosił średnio dla każdej z grup około 85 %. Parametr ten istotnie ($p \leq 0,01$) różnił się tylko w przypadku genu *ESR2* między osobnikami o genotypie *AA* ($87,4 \pm 8,1$ %, mediana 87,5 %) i *AG* ($86,8 \pm 8,7$ %, mediana 88,0 %) a osobnikami *GG* ($82,9 \pm 9,2$ %, mediana 82,0 %). Wśród plemników żywych nie wykazano różnic statystycznie istotnych, w każdej z grup średni odsetek tych plemników wynosił około 89 %. Monitorowanie zmian w budowie plemników jest wyznacznikiem funkcjonowania jąder. Ocena morfologii plemników obok oceny ruchliwości pozwala na kontrolę procesu spermatogenezy i określenie wartości biologicznej nasienia (Udała i wsp., 2005; Trzcińska i Bryła, 2017; Wysokińska i Kondracki, 2019; Górski i wsp., 2021).

W analizie wyników pod uwagę należy wziąć również istotny wpływ rasy/genotypu knurów (tab. 11) na kształtowanie się ocenianych wskaźników. Badając odsetek plemników z wadami głównymi wykazano istotne statystycznie ($p \leq 0,01$) różnice między knurami rasy duroc ($4,8 \pm 4,1$ %, mediana 4,0 %) a pbz ($2,0 \pm 2,3$ %, mediana 2,0 %). Istotne ($p \leq 0,01$) różnice stwierdzono także w przypadku odsetka plemników o prawidłowej budowie między knurami PIC ($94,1 \pm 4,2$ %, mediana 95,0 %) a czystorasowymi wbp ($90,7 \pm 5,3$ %, mediana 92,0 %). Natomiast ocena odsetka plemników z nieuszkodzonym akrosomem pozwoliła na stwierdzenie istotnych ($p \leq 0,01$) różnic pomiędzy knurami duroc ($79,7 \pm 7,2$ %, mediana 80,0 %) wykazującymi najwyższy odsetek uszkodzeń a pozostałymi mieszańcami oraz knurami czystorasowymi. W przypadku odsetka plemników żywych zaobserwowano istotnie wyższe wartości tego parametru dla knurów PIC ($90,4 \pm 7,8$ %, mediana 91,8 %) w porównaniu z knurami duroc $\times$ pietrain ($86,6 \pm 5,8$ %, mediana 86,8 %, $p \leq 0,05$). Jakość nasienia zależy m. in. od tego, ile plemników zawiera defekty w budowie uniemożliwiające lub ograniczające penetrację komórki jajowej. Nasienie z wysokim odsetkiem plemników ze zmianami morfologicznymi głównymi i/lub podrzędnymi może również cechować się zaburzeniami ruchu plemników i/lub występowaniem większej liczby plemników z uszkodzonym akrosomem (Udała i wsp., 2005; Banaszewska i wsp., 2007, 2015). Jak podaje Szostak i Sarzyńska (2010) istotny wpływ na liczbę i charakter zmian morfologicznych ma wiek i rasa knura. W badaniach swoich powyżsi autorzy wykazali, że nasienie młodych mieszańców Hampshire $\times$ pietrain oraz czystorasowych wbp w różnych grupach wiekowych wyróżniało się najniższym odsetkiem wadliwych plemników.

Wysokińska i Kondracki (2014) stwierdzili, że plemniki knurów mieszańców mają większą żywotność podczas konserwacji niż knurów ras czystych, zwłaszcza w przypadku integralności błony komórkowej.

6.3. Wpływ czasu przechowywania na integralność błony komórkowej, stopień uszkodzenia akrosomu oraz aktywność mitochondriów plemników

W ocenie przydatności nasienia do inseminacji decydujące znaczenie ma funkcjonalność błony komórkowej plemników. Jej integralna struktura potrzebna jest do prawidłowego przebiegu procesów prowadzących do zapłodnienia oocyta. Podczas przygotowywania porcji inseminacyjnych zachowanie ciągłości błony jest kluczowe dla wysokiej żywotności komórek w konfekcjonowanych dawkach. Utrzymanie prawidłowej integralności błony komórkowej w czasie konserwacji wpływa bezpośrednio na funkcje pozostałych struktur plemnika (Gączarzewicz i wsp., 2010; Kordan i wsp., 2013; Wysokińska i Szablicka, 2021). Błona komórkowa plemników knura jest podatna na uszkodzenia bardziej niż błona komórkowa plemników samców innych gatunków ssaków, szczególnie wrażliwość wykazuje względem zmian temperatury (Trzcińska i Bryła, 2017; Szablicka i wsp., 2022).

Z danych przedstawionych w tabelach 12. i 13. wynika, że czas konserwacji nasienia istotnie ($p \leq 0,01$) wpływał na integralność błony komórkowej. Na podstawie barwienia fluorochromami SYBR-14/PI/PNA wykazano stopniowy spadek udziału plemników żywych po siedmiu dniach przechowywania w obu układach, czyli w każdym wariancie polimorficznym badanych genów (tab. 5) oraz między rasami/grupami genetycznymi (tab. 13) średnio o około 19 % (z $82,0 \pm 6,2$ % do $63,3 \pm 13,4$ %). Różnice ($p \leq 0,01$) stwierdzono pomiędzy każdym analizowanym dniem przechowywania. W przypadku polimorficznych wariantów (tab. 12) najwyższy odsetek plemników z integralną błoną komórkową w pierwszym dniu badań prezentowały knury o genotypie *ESR2/AA* ($83,1 \pm 7,9$ %, mediana 83,5 %) a najniższy *PIWIL4/CC* ($79,7 \pm 4,3$ %, mediana 79,0 %). Samce *PIWIL4/CC* ostatniego dnia badań wyróżniały się również najniższym odsetkiem plemników z integralną błoną komórkową spośród wszystkich wariantów badanych genów ($55,6 \pm 7,9$ %, mediana 55,0 %), a najwyższe wartości przyjmowały homozygotyczne knury *DAZL/CC* ($66,9 \pm 10,5$ %, mediana 69,8 %). Różnice statystycznie istotne zaobserwowano dla wariantów genu *CD9* w piątym dniu przechowywania między osobnikami AA ($70,9 \pm 10,0$ %, mediana 71,0 %) a osobnikami AT ($64,3 \pm 11,0$ %, mediana 67,0 %, $p \leq 0,01$) oraz siódmego dnia pomiędzy AA ($64,1 \pm 13,2$ %, mediana 65,0 %) a AT ($55,8 \pm 13,9$ %, mediana 56,0 %, $p \leq 0,05$).

Analiza odsetka plemników z integralną błoną komórkową z uwzględnieniem rasy/grupy genetycznej (tab. 13) wykazała, że w pierwszym dniu badań najwyższymi wartościami charakteryzowały się knury duroc $\times$ pietrain ($84,6 \pm 7,7$ %, mediana 83,8 %) a najniższym knury duroc ($79,2 \pm 5,3$ %, mediana 79,0 %). Istotne ($p \leq 0,05$) różnice międzyrasowe zaobserwowano tylko siódmego dnia badań między samcami PIC ($70,0 \pm 8,1$ %, mediana 71,5 %), które przyjmowały

najwyższe wartości badanego parametru a samcami duroc ($61,1 \pm 11,5$ %, mediana 62,5 %) i wbp ($59,8 \pm 16,1$ %, mediana 58,5 %) z najniższymi wartościami. Wykrycie plemników z nieprawidłowościami w obrębie błony komórkowej, które nie są jeszcze komórkami martwymi ma ogromne znaczenie dla procedur konserwacji nasienia. Tylko nasienie o najlepszych parametrach, w tym również wykazujące możliwie najniższy udział plemników apoptotycznych, powinno być używane w dalszych etapach konserwacji (Siemieniuch i wsp., 2004). W praktyce inseminacyjnej, przy występujących tendencjach do ograniczenia liczby plemników w dawce inseminacyjnej i wykorzystania knurów o najwyższej wartości genetycznej, szczególne znaczenie ma zdiagnozowanie osobników charakteryzujących się gorszą płodnością „subfertility” dotyczącą nawet 10 % samców w stadzie, a trudnych do zdiagnozowania na podstawie powszechnie stosowanych tradycyjnych wskaźników oceny jakości nasienia (Roca i wsp., 2015). Stąd też istotne jest wprowadzenie w jak najszerszym stopniu najnowszych metod oceny, które pozwoliłyby z dużym prawdopodobieństwem oszacować zdolność zapładniającą plemników. Osiągnięcia ostatnich lat w zakresie proteomiki, transkryptomiki, genomiki, metabolamiki dają taką szansę, a obserwowany szybki postęp w zakresie diagnostyki seminologicznej, zarówno w sferze poznawczej jak i aplikacyjnej, pozwala przypuszczać, że metody te będą wdrażane w laboratoriach andrologicznych. Procedury konserwacji oraz czas przechowywania nasienia mogą w znaczny sposób wpływać na budowę i funkcję błony komórkowej plemników. Spadek odsetka plemników z integralną błoną komórkową w czasie przechowywania ogranicza przydatność nasienia do inseminacji (Maside i wsp., 2023). Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w przeprowadzonych wcześniej badaniach, w których inni autorzy również wykazali znaczące obniżenie udziału plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową (Trzińska i wsp., 2008; Dziekońska i Strzeżek, 2011; Dziekońska i wsp., 2013; Gączarzewicz i wsp., 2015; Menegat i wsp., 2017; Wysokińska i Szablicka, 2021).

Istotnym parametrem w analizie jakości nasienia jest również ocena stanu błony akrosomalnej. Akrosom zawiera enzymy hydrolityczne, mające za zadanie ułatwić wniknięcie plemnika do wnętrza oocyta. Jego prawidłowa budowa ma duży wpływ na zdolności zapładniające plemnika (Ogura i wsp., 2016; Trzińska i Bryła, 2017; Nosková i wsp., 2020; Kruit i wsp., 2022). Z danych zaprezentowanych w tabelach 14. i 15. wynika, że czas konserwacji nasienia istotnie ($p \leq 0,01$) wpływał na stopień uszkodzenia tej struktury. Na podstawie barwienia fluorochromami SYBR-14/PI/PNA stwierdzono obniżenie udziału plemników z nieuszkodzonym akrosomem po siedmiu dniach przechowywania średnio o około 19 % (z $77,5 \pm 6,8$ % do $58,9 \pm 14,3$ %, tab. 8). Pierwszego dnia badań wśród wariantów polimorficznych (tab. 14) analizowane cechy przyjmowały zbliżone wartości, najwyższy odsetek zaobserwowano w grupie *DAZL/CC* ($78,3 \pm 6,6$ %, mediana 79,3 %) a najniższy w grupie *PIWIL4/CC* ($75,8 \pm 7,2$ %, mediana 78,0 %). Nasienie knurów o genotypie *DAZL/CC* charakteryzowało się również najwyższym odsetkiem plemników z nieuszkodzonym akrosomem w końcowym okresie przechowywania nasienia ($63,2 \pm 11,5$ %, tab. 15).

mediana 65,0 %), a najniższymi wartościami charakteryzowało się nasienie knurów *CD9/AT* ($51,5 \pm 16,1$ %, mediana 52,0 %) oraz *PIWIL4/CC* ($51,5 \pm 12,1$ %, mediana 54,0 %). Różnice statystycznie istotne stwierdzone zostały tylko między wariantami genu *CD9*. W piątym dniu przechowywania homozygoty *AA* ($66,3 \pm 10,6$ %, mediana 67,0 %) różniły się istotnie ($p \leq 0,01$) od heterozygot *AT* ($56,5 \pm 15,1$ %, mediana 60,0 %). Siódmego dnia również osobniki z wariantem *AA* ($59,7 \pm 14,0$ %, mediana 62,0 %) różniły się istotnie ($p \leq 0,05$) od osobników z wariantem *AT* ($51,5 \pm 16,1$ %, mediana 52,0 %).

Analizując zamieszczone wyniki w tabeli 15. dotyczące stopnia uszkodzenia akrosomu pod względem ras/grup genetycznych zaobserwowano istotne różnice ($p \leq 0,01$) pomiędzy każdym dniem przechowywania. Pierwszego dnia badań najwyższym odsetkiem plemników z nieuszkodzonym akrosomem cechowały się knury *PIC* ($79,4 \pm 5,8$ %, mediana 79,8 %) a najniższym knury *duroc* ($75,4 \pm 6,2$ %, mediana 74,8 %). Siódmego dnia przechowywania w przypadku tego parametru najwyższe wartości zaobserwowano również u knurów *PIC* ($66,3 \pm 9,9$ %, mediana 67,5 %) a najniższe u rasy *wbp* ($55,5 \pm 17,4$ %, mediana 53,0 %). W obliczeniach statystycznych nie wykazano jednak istotnych różnic między rasami/grupami genetycznymi. Fraser i wsp. (2016) w swoich badaniach wykazali, że na integralność błony komórkowej plemników oraz prawidłową budowę akrosomu istotnie wpływa wiek knura, sezon w jakim pobierane jest nasienie oraz cechy osobnicze samca. Efekt sezonowości najbardziej widoczny był wśród knurów w wieku od 19 do 30 miesięcy w okresie jesienno-zimowym. Badania innych autorów donoszą jednak, że takie cechy jak integralność akrosomu znacząco obniża się latem, w okresie długich dni i w dużym stopniu zależy od indywidualnych uwarunkowań knura (Barranco i wsp., 2013; Zasiadczyk i wsp., 2015).

Podczas przechowywania nasienia dochodzi do wielu zmian, które obejmują uszkodzenia różnych struktur komórkowych m. in. błon plazmatycznych, akrosomów czy mitochondriów, upośledzając sprawność metaboliczną plemników. Energia wytwarzana podczas glikolizy i fosforylacji oksydacyjnej jest niezbędna do ruchu plemników, aktywnego transportu substratów przez błonę, przeprowadzenia procesu hiperaktywacji czy reakcji akrosomalnej. Mitochondria odgrywając kluczową rolę w produkcji ATP umożliwiają ruch postępowy plemników, na podstawie którego można określić ich zdolność do zapłodnienia komórki jajowej (Silva i Gadella, 2006; Dziekońska i wsp., 2013; Gączarzewicz i wsp., 2015; Sutovsky, 2015; Popova i wsp., 2022). Zapotrzebowanie energetyczne plemników wymaga wysokiej aktywności mitochondriów, więc pożądanym jest, aby nasienie konserwowane charakteryzowało się jak najdłużej, jak najwyższym odsetkiem komórek o wysokim transbłonowym potencjale mitochondrialnym. Zamieszczone dane w tabeli 17. wskazują na wyraźną tendencję spadkową odsetka plemników o wysokim transbłonowym potencjale mitochondrialnym podczas przechowywania. Czas konserwacji istotnie ($p \leq 0,01$) wpływał na aktywność mitochondriów. W pierwszym dniu badań średni udział takich plemników wynosił $65,3 \pm 17,3$ %, W trzecim oraz piątym dniu obniżył się odpowiednio do $51,1 \pm 21,0$ % oraz $41,8 \pm 17,1$ %,

natomiast ostatniego dnia przechowywania osiągnął wartość $30,5 \pm 18,4$ %. W przypadku poszczególnych wariantów polimorficznych (tab. 16) najwyższe wartości badanego parametru w początkowym okresie przechowywania odnotowano dla heterozygot *CD9/AT* ($75,6 \pm 4,0$ %, mediana 74,0 %) a najniższe dla heterozygot *PIWIL4/CT* ($61,7 \pm 14,8$ %, mediana 63,0 %). W końcowym etapie badań knury *CD9/AT* także prezentowały najwyższy odsetek plemników o wysokim transbłonowym potencjale mitochondrialnym ($38,9 \pm 10,1$ %, mediana 40,0 %),

a najniższy knury *DAZL/AC* ($28,2 \pm 17,2$ %, mediana 25,0 %). Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) zaobserwowano tylko dla genu *CD9* pierwszego i trzeciego dnia: niższe wartości przyjmował wariant AA odpowiednio $64,3 \pm 17,8$ %, mediana 67,8 % i $50,0 \pm 21,5$ %, mediana 51,0 %, a wyższe wariant AT – $75,6 \pm 4,0$ %, mediana 74,0 % i $63,7 \pm 10,4$ %, mediana 65,0 %.

Z danych zawartych w tabeli 17. wynika, że pierwszego dnia konserwacji istotne różnice ($p \leq 0,05$) a zarazem najwyższy odsetek plemników o wysokim transbłonowym potencjale mitochondrialnym zaobserwowano u knurów mieszańców duroc $\times$ pietrain ($77,2 \pm 7,5$ %, mediana 78,8 %) a najniższe wartości u knurów duroc ($60,4 \pm 16,3$ %, mediana 63,5 %). Siódmego dnia badań najwyższe wartości tego parametru prezentowały także knury duroc $\times$ pietrain ($43,6 \pm 17,6$ %, mediana 44,5 %) a najniższą wartość odnotowano u knurów PIC ($25,4 \pm 22,0$ %, mediana 20,0 %, $p \leq 0,05$). Trzcńska i wsp. (2008) analizując ejakulatory mieszańców w czasie przechowywania stwierdzili obniżenie udziału plemników o wysokim potencjale mitochondrialnym i wzrost odsetka plemników o niskim potencjale. Wykazali również wysoki współczynnik korelacji między plemnikami o wysokim transbłonowym potencjale mitochondrialnym a ruchliwością. Oszacowane współczynniki korelacji w niniejszych badaniach w pełni potwierdzają wyniki powyższej autorki, bowiem pomiędzy odsetkiem plemników o wysokim potencjale mitochondrialnym a wszystkimi wskaźnikami charakteryzującymi ruch plemników powyższe współczynniki korelacji przyjmowały wartości dodatnie statystycznie istotne ($p \leq 0,001$). Odwrotne natomiast, ujemne wartości, w zdecydowanej większości przypadków, wystąpiły między plemnikami o niskim potencjale mitochondrialnym i plemnikami z nieaktywnymi mitochondriami (tab. 32). W czasie przechowywania wraz z obniżeniem odsetka plemników o wysokim transbłonowym potencjale mitochondrialnym obserwowano istotny ($p \leq 0,01$) wzrost średniego udziału plemników o niskim transbłonowym potencjale mitochondrialnym, a także wzrost plemników z nieaktywnymi mitochondriami ($p \leq 0,01$). Dziekońska i wsp. (2013) zaobserwowali, że wydłużony czas przechowywania wpływa na funkcjonowanie mitochondriów i znacząco obniża odsetek plemników z aktywnymi mitochondriami, co upośledza ruchliwość plemników. Znaczący również okazał się stosowany rozcieńczalnik wykorzystany do przygotowania dawek inseminacyjnych. Obniżenie aktywności mitochondriów w trakcie przechowywania zaobserwowano także w badaniach innych autorów (Dziekońska i Strzeżek, 2011; Gączarzewicz i wsp., 2015; Wysokińska, 2020; Henning i wsp., 2022a).

W tabeli 18. przedstawiono między innymi średni udział plemników o niskiej aktywności mitochondriów, który wykazywał tendencję wzrostową od $13,6 \pm 17,1$ % w pierwszym dniu do $28,6 \pm 19,2$ % w dniu ostatnim i przyjmował zbliżone wartości dla każdego z analizowanych genów. Istotne różnice stwierdzono w przypadku genu *CD9* między polimorficznymi wariantami AA i AT każdego dnia doświadczenia przy poziomach istotności: $p \leq 0,01$ – pierwszego, trzeciego i siódmego dnia, przy $p \leq 0,05$ w piątym dniu. Tabela 19. przedstawiająca odsetek plemników z nieaktywnymi mitochondriami w kolejnych dniach przechowywania pozwala zaobserwować, że knury o genotypie *PIWIL4/CC* w pierwszym dniu charakteryzowały się najwyższą wartością tego parametru ($24,2 \pm 8,4$ %, mediana 26,0 %) a heterozygoty *PIWIL4/CT* – najniższą ($20,4 \pm 5,4$ %, mediana 19,0 %). Nie stwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic między tymi cechami. Istotne różnice zaobserwowano natomiast siódmego dnia między osobnikami *CD9/AA* ($40,3 \pm 12,2$ %, mediana 38,0 %) a osobnikami *CD9/AT* ($47,9 \pm 8,6$ %, mediana 46,5 %, $p \leq 0,05$). Genotyp *CD9/AT* w siódmym dniu badań przybierał najwyższe wartości tego parametru spośród wszystkich analizowanych polimorfizmów. Kolejne różnice w ostatnim dniu obserwacji odnotowano między genotypem *DAZL/CC* ($34,9 \pm 10,0$ %, mediana 33,0 %), a genotypem homozygotycznym *DZAL/AA* ($42,4 \pm 12,7$ %, mediana 41,0 %, $p \leq 0,05$) oraz genotypem heterozygotycznym *DAZL/CT* ($42,9 \pm 11,4$ %, mediana 33,0 %, $p \leq 0,01$). Knury *DAZL/CC* prezentowały najniższe wartości wśród wszystkich analizowanych wariantów. Zaobserwowana zmiana udziału plemników z nieaktywnymi mitochondriami w czasie przechowywania informuje o zwiększeniu przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej, co prowadzi do spadku potencjału transbłonowego i utraty prawidłowych funkcji plemnika, a także może inicjować procesy apoptyczne w komórce (Trzcńska i wsp., 2008). Jak podają Nesci i wsp. (2020) zaburzona aktywność mitochondriów jest przyczyną wadliwego funkcjonowania plemników. Niniejsze badania potwierdzają w znacznym stopniu stwierdzenia powyższych autorów. Oszacowane bowiem współczynniki korelacji między omawianym wskaźnikiem a pozostałymi analizowanymi wskaźnikami z wyjątkiem procentu plemników z niskim mitochondrialnym potencjałem transbłonowym, przyjmowały wysokie wartości ujemne od -0,52 do -0,86 ($p \leq 0,001$). Dysfunkcje łańcucha transportu elektronów w mitochondriach zwiększają poziom reaktywnych form tlenu, powodując uszkodzenia struktur komórkowych wpływające na jakość nasienia. Wysoki odsetek plemników o ruchu całkowitym czy o ruchu postępowym zależy od mitochondrialnej produkcji ATP potrzebnego do prawidłowego funkcjonowania komórek.

6.4. Wpływ czasu przechowywania na parametry ruchu plemników

Procesy zachodzące prawidłowo w plemnikach przekładają się na ich żywotność oraz zdolność do ruchu, dlatego też ocena ruchliwości jest standardowym parametrem jakości nasienia wskazującym na integralności błony komórkowej, stanu przepuszczalności błon akrosomalnych czy odpowiedni status energetyczny. Odsetek plemników o ruchu prawidłowym jest podstawowym wskaźnikiem określającym jakość nasienia brany pod uwagę przy produkcji dawek inseminacyjnych. Wysokie

wartości tego parametru odzwierciedlają zdolność zapładniającą gamet (Tejerina i wsp., 2008; Trzcińska i Bryła, 2017).

W przypadku procentowego udziału plemników ruchliwych w kolejnych dniach przechowywania (tab. 20) pierwszego dnia badań najwyższe i najniższe wartości zaobserwowano wśród polimorficznych wariantów genu *DAZL*, odpowiednio dla AC ($92,5 \pm 5,2$ %, mediana 93,3 %) oraz AA ($90,7 \pm 7,4$ %, mediana 92,1 %). Siódmego dnia najwyższe wartości prezentowały knury *PIWIL4/CC* ($71,6 \pm 19,6$ %, mediana 67,9 %) a najniższe osobniki *ESR2/AA* ($60,4 \pm 22,7$ %, mediana 64,1 %). Czas przechowywania statystycznie istotnie ($p \leq 0,01$) wpływał na procentowy udział plemników ruchliwych. Istotne ($p \leq 0,01$) różnice między genotypami stwierdzono w trzecim dniu badań dla genu *ESR2* między wariantem GG ($85,2 \pm 8,5$ %, mediana 86,8 %) a wariantami AA ($88,3 \pm 5,3$ %, mediana 87,8 %) oraz AC ($88,2 \pm 11,2$ %, mediana 91,7 %). Z danych przedstawionych w tabeli 22. dotyczących procentowego udziału plemników o ruchu postępowym wynika, że w pierwszym dniu przechowywania najwyższe i najniższe wartości wystąpiły w przypadku genu *ESR2* u homozygot, odpowiednio $82,3 \pm 6,7$ %, mediana 84,9 % u AA i $75,8 \pm 10,8$ %, mediana 77,2 % u GG. Ostatniego dnia analiz najwyższymi wartościami tego parametru charakteryzowały się osobniki o genotypie *PIWIL4/CC* ($45,6 \pm 17,3$ %, mediana 39,0 %) a najniższymi osobniki *DAZL/AA* ($35,1 \pm 17,8$ %, mediana 32,1 %). Stwierdzono, że czas konserwacji istotnie ($p \leq 0,01$) wpływał na procentowy udział plemników wykazujących ruch postępowy w każdej grupie. Istotne różnice między polimorficznymi wariantami zaobserwowano tylko w obrębie genu *ESR2*. Pierwszego ($p \leq 0,05$), trzeciego ($p \leq 0,01$) i piątego ($p \leq 0,05$) dnia badań osobniki o genotypie GG różniły się od pozostałych genotypów AA i AG.

Ma i wsp. (2013) w badaniach przeprowadzonych na knurach różnych ras zidentyfikowali mutację A>G w intronie 7 genu *DAZL* i stwierdzili, że osobniki heterozygotyczne AG różnią się istotnie wyższą ruchliwością plemników od osobników GG w obrębie rasy wielka biała i landrace. Zidentyfikowana przez nich kolejna mutacja C>A w intronie 9 wykazała, że heterozygotyczne knury duroc o genotypie AC charakteryzowały się istotnie niższą ruchliwością i koncentracją plemników w ejakulacie niż homozygoty CC i AA. W przedstawionych badaniach (tab. 20) heterozygoty *DAZL/AA* przedstawiały najniższe wartości dotyczące ruchu całkowitego na początku doświadczenia. Nie zaobserwowano jednak istotnych różnic między polimorficznymi wariantami. Gunawan i wsp. (2012) analizowali SNP w eksonie 5 genu *ESR2*, wśród osobników pietrain oraz pietrain $\times$ Hampshire i stwierdzili, że knury AA charakteryzowały się istotnie wyższą ruchliwością i mniejszą liczbą plemników z kroplą cytoplazmy ($p = 0,06$) niż osobniki o genotypie AG lub GG, które były powiązane z gorszymi cechami ejakulatów. W przeprowadzonych badaniach (tab. 20) potwierdzone zostały doniesienia ww. autorów. Osobniki o genotypie *ESR2/GG* charakteryzował najniższy procent plemników wykazujących ruch trzeciego dnia badań, gdzie odnotowano istotne różnice między wariantem GG a pozostałymi wariantami AA i AC ($p \leq 0,01$). Podobnie relacje zaobserwowano

w przypadku plemników o ruchu postępowym (tab. 22), gdzie istotnie najniższe wartości przyjmowały knury o genotypie *ESR2/GG*. Kaewmala i wsp. (2011) analizując nasienie knurów pietrain oraz pietrain $\times$ Hampshire wykazali istotny związek SNP w intronie 6 w przypadku genu *CD9*, stwierdzając, że osobniki o genotypie *AA* charakteryzowały się wyższym odsetkiem plemników ruchliwych niż osobniki *AT* i *TT*. Cho i wsp. (2015) u knurów rasy duroc, również stwierdzili istotne różnice w udziale plemników wykazujących ruch na korzyść genotypu *AA*. Kumar i wsp. (2015) analizując nasienie buhajów rasy frieswal (*hf* $\times$ *sahiwal*) również zaobserwowali istotny związek SNP w intronie 6 dla genu *CD9* z ruchliwością, tym razem jednak to heterozygoty *AB* wyróżniały się wyższą koncentracją oraz wyższym odsetkiem plemników ruchliwych. W badanej populacji nie zaobserwowano jednak genotypów *BB*.

Analizując ruch całkowity względem ras/grup genetycznych w kolejnych dniach przechowywania (tab. 21) najwyższy udział plemników ruchliwych zaobserwowano u knurów PIC (pierwszego dnia $95,1 \pm 4,4$ %, mediana 97,1 %; siódmego dnia $74,6 \pm 19,2$ %, mediana 81,2 %) a najniższy u knurów wbp (pierwszego dnia $88,6 \pm 8,1$ %, mediana 90,8 %; siódmego dnia $50,5 \pm 19,9$ %, mediana 48,0 %). Osobniki PIC różniły się istotnie ($p \leq 0,05$) od pozostałych; pierwszego dnia badań od duroc $\times$ pietrain, pbz oraz wbp; trzeciego dnia stwierdzono różnice między nimi a wszystkimi pozostałymi rasami/grupami genetycznymi; piątego dnia od wbp; a ostatniego od duroc i wbp. Rozpatrując ruch postępowy w odniesieniu do rasy/grupy genetycznej (tab. 23) pierwszego dnia przechowywania zaobserwowano, że knury PIC charakteryzowały się najwyższym procentowym udziałem na poziomie $82,7 \pm 9,2$ %, mediana 86,2 % a najniższe wartości przyjmowały mieszańce duroc $\times$ pietrain $73,8 \pm 12,1$ %, mediana 73,3 %. Różnice te zostały potwierdzone statystycznie ($p \leq 0,05$), dodatkowo samce PIC różniły się także od wbp ($74,8 \pm 11,2$ %, mediana 77,1 %, $p \leq 0,05$). Siódmego dnia najwyższe wartości tego parametru stwierdzono również u knurów PIC ($41,7 \pm 21,8$ %, mediana 37,1 %), które razem z knurami pbz ($40,9 \pm 20,4$ %, mediana 40,3 %) istotnie ($p \leq 0,05$) różniły się od wbp ($25,5 \pm 17,5$ %, mediana 25,9 %) przyjmujących najniższe wartości. U czystorasowych samców wbp w każdym dniu badań odnotowano najniższy udział plemników wykazujących ruch postępowy. Trzeciego dnia analiz istotnie ($p \leq 0,05$) różniły się od PIC i pbz, a piątego tylko od pbz.

Przeprowadzone badania wykazały, że czas konserwacji nasienia miał istotny ($p \leq 0,01$) wpływ na ruchliwość plemników. Wraz z upływem czasu przechowywania, w nasieniu sukcesywnie zmniejszał się udział plemników ruchliwych, plemników o ruchu postępowym a wzrastał udział plemników wykazujących ruch wolny lub niewykazujących ruchu. Podobne wyniki dotyczące ruchu całkowitego oraz zmniejszenia odsetka plemników o ruchu postępowym w czasie konserwacji uzyskało wielu autorów. Należy jednak podkreślić, że oprócz czynników związanych z użytkowaniem knura na parametry ruchu podczas konserwacji wpływ może mieć zastosowany rozcieńczalnik lub sposób przechowywania przygotowanych dawek a także emisja drgań podczas transportu. (Tejerina

i wsp., 2008; Bielas i wsp., 2017; Dziekońska i wsp., 2017a; Namuncura i wsp., 2020; Tamanini i wsp., 2022; Hafemeister i wsp., 2023).

W praktyce inseminacyjnej nadal podstawową metodą oceny prawidłowości ruchu plemników jest metoda mikroskopowa z użyciem stolika Bloma, która jest prosta i nie wymaga dużych nakładów finansowych. Jest to jednak metoda subiektywna i w dużym stopniu zależy od umiejętności i doświadczenia badającego. W niniejszych badaniach prawidłowość ruchu plemników oceniano obiema metodami, tradycyjną i za pomocą CASA. Oszacowane współczynniki korelacji zamieszczone w tabeli 32. wskazują na ścisłe zależności między wskaźnikami charakteryzującymi ruch plemników określany tymi dwoma metodami. Między ruchem postępowym ocenianym na stoliku Bloma a plemnikami ruchliwymi i plemnikami o ruchu postępowym ocenianym za pomocą systemu CASA wynosiły one odpowiednio $r_s = 0,81$ i $r_s = 0,86$ ($p \leq 0,001$). Uzyskane wyniki potwierdzałyby wcześniejsze spostrzeżenia niektórych autorów, że tradycyjna ocena mikroskopowa ruchu plemników pozwala na poprawne oszacowanie i selekcję ejakulatów, zwłaszcza w odniesieniu do nasienia charakteryzującego się dobrą lub złą jakością. Trudniej natomiast postawić dokładną diagnozę na podstawie tych badań w przypadku nasienia o obniżonych parametrach „*subfertility*”, co może dotyczyć 7 – 10 % knurów (Roca i wsp., 2015). W przypadku podejrzeń co do wartości biologicznej nasienia takich osobników celowym jest wykonanie badań za pomocą CASA.

Jakość nasienia na fermach, które zbierają, oceniają, rozcieńczają, pakują i dystrybuują dawki inseminacyjne jest oceniana głównie na podstawie koncentracji plemników, ich ruchliwości, a w niektórych przypadkach morfologii. Jest to podstawowa ocena stosowana dla knurów cechujących się wysokimi parametrami jakości nasienia. Na przestrzeni lat opracowano dodatkowe testy funkcjonalne, umożliwiające prowadzenie diagnostyki w celu odnotowania nawet subtelnych zmian na poziomie struktur subkomórkowych i funkcji poszczególnych organelli plemnika (Silva i Gadella, 2006; Kordan i wsp., 2013; Maside i wsp., 2023). Komputerowo wspomagana analiza nasienia wykorzystywana jest głównie do określania ruchliwości, koncentracji oraz morfologii plemników. Ocena ruchliwości plemników za pomocą systemów CASA uważana jest za szybką i bardziej obiektywną w porównaniu z rutynową metodą mikroskopową. Wprowadzenia odpowiednich ustawień wstępnych oraz standaryzacja procedury pomiarowej daje możliwość szczegółowej charakterystyki parametrów kinetycznych określanych na podstawie trajektorii i/lub prędkości plemników (Broekhuijse i wsp., 2012; Amann i wsp., 2014; Jung i wsp., 2015; Yániz i wsp., 2018)

Dane dotyczące prędkości krzywoliniowej (VCL, $\mu\text{m/s}$) plemników przedstawiono w tabeli 24. Najwyższe wartości tego parametru na początku i na końcu doświadczenia zaobserwowano dla genotypu *CD9/AT*, odpowiednio $75,2 \pm 12,7 \mu\text{m/s}$, mediana $78,8 \mu\text{m/s}$ i $65,8 \pm 14,5 \mu\text{m/s}$, mediana $63,1 \mu\text{m/s}$. Pierwszego dnia badań osobniki *DAZL/AA* przyjmowały najniższe wartości VCL na poziomie $70,3 \pm 14,5 \mu\text{m/s}$, mediana $69,2 \mu\text{m/s}$ a ostatniego dnia były to samce *ESR2/GG* ($44,7 \pm 14,0 \mu\text{m/s}$, mediana $14,5 \mu\text{m/s}$). Obliczenia statystyczne wykazały istotne ($p \leq 0,05$ lub $p \leq 0,01$)

różnice między polimorficznymi wariantami genu *CD9* i *ESR2* w trzecim, piątym i siódmym dniu testów a dla genu *DAZL* w dniu trzecim. W trakcie całego okresu przechowywania stwierdzono istotny ($p \leq 0,01$) wpływ czasu na wartość VCL. Zaobserwowano również istotne ($p \leq 0,01$) różnice międzyrasowe, występujące głównie między knurami duroc a pbz i wbp.

W przypadku prędkości liniowej (VSL, $\mu\text{m/s}$) obrazującej zmiany szybkości ruchu postępowego plemników w czasie przechowywania. (tab. 25) nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy genotypami w każdym z badanych genów. Najwyższe wartości tego parametru w pierwszym dniu przyjmowały knury *CD9/AT* ($31,0 \pm 6,6 \mu\text{m/s}$, mediana $29,0 \mu\text{m/s}$) a najniższe osobniki *DAZL/CC* ($26,3 \pm 6,5 \mu\text{m/s}$, mediana $25,6 \mu\text{m/s}$). Ostatniego dnia najwyższe wyniki uzyskały samce *PIWIL4/CC* ($24,1 \pm 8,2 \mu\text{m/s}$, mediana $26,7 \mu\text{m/s}$) a najniższe samce *ESR2/AG* ($19,0 \pm 6,1 \mu\text{m/s}$, mediana $18,4 \mu\text{m/s}$). Czas konserwacji nasienia istotnie ($p \leq 0,01$) wpływał na ten parametr pomiędzy każdym dniem przechowywania. Stwierdzono istotne ($p \leq 0,01$) różnice między knurami pbz a PIC w każdym dniu doświadczenia, siódmego dnia dodatkowe jeszcze z knurami wbp.

Analizując uśrednioną prędkość (VAP, $\mu\text{m/s}$) plemników w kolejnych dniach zaobserwowano istotny ($p \leq 0,01$) wpływ czasu na badany parametr (tab. 26). Pierwszego dnia najwyższe wartości przyjmowały osobniki *PIWIL4/CC* ($50,3 \pm 2,7 \mu\text{m/s}$, mediana $50,2 \mu\text{m/s}$) a najniższe osobniki *ESR2/GG* ($44,9 \pm 7,4 \mu\text{m/s}$, mediana $45,9 \mu\text{m/s}$). Ostatniego dnia najwyższe i najniższe wartości odnotowano dla genu *PIWIL4*, odpowiednio u homozygot *CC* ($34,7 \pm 6,5 \mu\text{m/s}$, mediana $32,0 \mu\text{m/s}$) i heterozygot *CT* ($28,0 \pm 9,2 \mu\text{m/s}$, mediana $28,4 \mu\text{m/s}$). Istotne różnice stwierdzono między wariantami genu *ESR2*, trzeciego dnia na poziomie $p \leq 0,01$ a piątego dnia przy $p \leq 0,05$. W przypadku tej prędkości stwierdzono również istotny ($p \leq 0,01$) wpływ czasu podczas konserwacji. Każdego dnia odnotowano różnice w obrębie ras/grup genetycznych. Istotnie ($p \leq 0,01$) różniły się: pierwszego dnia – PIC z duroc $\times$ pietrain i wbp, drugiego dnia – pbz z duroc $\times$ pietrain, trzeciego dnia – pbz z duroc, PIC i wbp, siódmego – pbz z wbp.

W trakcie konserwacji nasienia zaobserwowano zmiany szczegółowych parametrów kinetycznych. Wyrażna tendencja spadkowa wskaźników związanych z prędkością plemników pozwoliła na stwierdzenie istotnego ($p \leq 0,01$) oddziaływania czasu przechowywania na zmiany prędkości krzywoliniowej VCL – średniej prędkości plemników po rzeczywistej ścieżce ruchu, liniowej VSL – średniej prędkości plemnika w linii prostej od początku do końca ścieżki oraz uśrednionej VAP – średniej prędkości plemnika po ścieżce uśrednionej. Podobne wyniki związane z obniżeniem średnich wartości analizowanych parametrów prędkości w czasie konserwacji uzyskali inni autorzy. Zaobserwowali oni również występowanie dodatnich korelacji między VCL i VSL a odsetkiem plemników wykazujących ruch (Nizański i wsp., 2006; Bielas i wsp., 2017; Menegat i wsp., 2017; Pena i wsp., 2023).

Zaprezentowane dane w tabeli 27. wskazują na brak wpływu czasu konserwacji nasienia na liniowość ruchu plemników (LIN, %, stosunek VSL/VCL). W trakcie przechowywania obserwowano sukcesywny wzrost tego parametru z średniej wartości początkowej około 40,0 % do 44,0 %. Statystycznie istotne ($p \leq 0,01$) różnice odnotowano siódmego dnia badań między homozygotami *CD9/AA* a heterozygotami *CD9/AT*, trzeciego dnia istotnie ($p \leq 0,05$) różniły się osobniki *DAZL/AA* i *DAZL/AC*, w przypadku genu *ESR2* istotne ($p \leq 0,05$) różnice zaobserwowano piątego i siódmego dnia między homozygotami *GG* a heterozygotami *AG*. Istotne ($p \leq 0,01$) różnice między rasami stwierdzono piątego dnia przechowywania między knurami duroc a mieszańcami duroc $\times$ pietrain oraz czystorasowymi wbp oraz siódmego dnia między duroc a duroc $\times$ pietrain, pbz i wbp.

Czas konserwacji nasienia miał jednak istotny wpływ ($p \leq 0,01$) na prostotę ruchu plemników (STR, %, stosunek VSL/VAP). Zaobserwowano różnice między dniem pierwszym a pozostałymi oraz między dniem trzecim i piątym a siódmym. Średnia wartość tego parametru w czasie przechowywania wzrosła z 59,1 % do 68,3 %. Dane opisujące ten parametr w tabeli 28. wskazują na istotne ($p \leq 0,01$) różnice między wariantami genu *CD9* pierwszego dnia badań. W przypadku genu *DAZL* zaobserwowano różnice między osobnikami *AA* i *AC* w trzecim, piątym i siódmym dniu przy $p \leq 0,05$. W obrębie polimorficznych wariantów genu *ESR2* także odnotowano różnice między genotypami *AG* i *GG*, trzeciego dnia przy $p \leq 0,05$, piątego i siódmego – $p \leq 0,01$. W początkowym okresie badań stwierdzono istotne ($p \leq 0,05$) różnice między knurami PIC a duroc $\times$ pietrain, pbz i wbp, natomiast w końcowym między PIC a duroc.

Zaobserwowano także istotny wpływ ($p \leq 0,01$) czasu na parametry oscylacji toru rzeczywistego (WOB, %, stosunek VAP/VCL), stwierdzono różnice między dniem pierwszym a trzecim i siódmym. Średnia wartość tego parametru w czasie przechowywania zmalała z 66,5 % do 63,2 %. W tabeli 29. informującej o tym wskaźniku przedstawiono różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$ lub $p \leq 0,01$) między wariantami *AA* i *AT* genu *CD9* w każdym dniu przechowywania. W przypadku pozostałych genów nie zaobserwowano znaczących zmian. Stwierdzono natomiast istotne ($p \leq 0,05$) różnice między knurami wbp a knurami pozostałych ras/grup genetycznych w czasie trwania całego doświadczenia.

Czas przechowywania wpływał także na amplitudę bocznych wychyleń główki (ALH, μm). Odnotowano istotne ($p \leq 0,01$) różnice między dniem pierwszym a pozostałymi oraz między dniem trzecim a piątym i siódmym. Analizując dane zamieszczone w tabeli 30. dotyczące ALH stwierdzono różnice między genotypami *CD9/AA* a *CD9/AT* pierwszego dnia przy $p \leq 0,05$, w pozostałych dniach przy $p \leq 0,01$ oraz między *ESR2/AA* a *ESR2/AG* i *ESR2/GG* trzeciego i piątego dnia, a także siódmego dnia między *ESR2/AA* a *ESR2/GG* istotne na poziomie $p \leq 0,05$. Średnie wartości tego parametru wynosiły od 3,6 μm na początku konserwacji do 3,1 μm na końcu. Analizując wpływ rasy na ALH w kolejnych dniach przechowywania stwierdzono istotne ($p \leq 0,05$) różnice występujące pierwszego dnia między knurami PIC a pbz i wbp, w pozostałych dniach pomiędzy knurami duroc i PIC

a pozostałymi duroc × pietrain, pbz i wbp. W przypadku częstotliwości bocznych wychyleń główki plemnika (BCF, Hz) zaobserwowano różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) pomiędzy piątym a siódmym dniem przechowywania. Odnotowano także istotne ($p \leq 0,05$) różnice między homozygotami a heterozygotami genu *ESR2* każdego dnia przechowywania (tab. 31). Dodatkowo przez cały okres konserwacji stwierdzono istotne ($p \leq 0,05$) różnice między osobnikami PIC a pbz i duroc. Średnie wartości tego parametru były zbliżone przez cały czas trwania konserwacji, pierwszego dnia BFC wynosiła 6,2 μm a ostatniego 6,4 μm .

W badaniach własnych dotyczących wpływu czasu konserwacji na jakość nasienia stwierdzono wzrost wskaźników LIN, STR, BCF oraz spadek WOB i ALH. Tendencje wzrostowe parametrów LIN i STR są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Bielasa i wsp. (2017) oraz Pena i wsp. (2023), odwrotne jednak w przypadku wyników uzyskanych dla BCF, gdzie autorzy odnotowali obniżenie wartości tego parametru. Zaobserwowane tendencje spadkowe wskaźników WOB i ALH są zgodne z badaniami Bielasa i wsp. (2017), Dziekońskiej i wsp. (2017b), Menegat i wsp. (2017), Pena i wsp. (2023).

Zaburzenia ruchu plemników mogą wynikać z utraty stabilności błony komórkowej i/lub dysfunkcji mitochondriów. Podczas długoterminowego przechowywania nasienia utrzymanie przez plemniki zdolności do ruchu postępowego jest ściśle związane z aktywnością mitochondriów. Uwzględniając czas przechowywania analizowane parametry aktywności mitochondriów korespondowały ze zmianami ruchliwości plemników. Oszacowane wartości współczynników korelacji między parametrami charakteryzującymi ruch plemników a plemnikami o wysokim mitochondrialnym potencjale transbłonowym przyjmowały dosyć wysokie statystycznie istotne wartości dodatnie.

Reasumując należy stwierdzić, że w przypadku niektórych analizowanych wskaźników charakteryzujących integralność błony komórkowej, stopień uszkodzenia akrosomu, aktywność mitochondriów i ruchliwość plemników występowały istotne różnice między poszczególnymi wariantami polimorficznymi badanych genów co pozwala przypuszczać o genetycznym ich uwarunkowaniu i ewentualnych możliwościach wykorzystania w selekcji knurów do dalszego użytkowania rozłódowego. W przypadku niektórych jednak cech, stwierdzano jednocześnie istotny wpływ grupy genetycznej/rasowej co nie pozwala na tak jednoznaczne stwierdzenie i potrzebę uwzględnienia również tego czynnika. Skłania to również do dalszych prac i wyjaśnienia nasuwających się wątpliwości na większym liczebnie materiale.

7. Spostrzeżenia i wnioski

Przeprowadzone badania pozwalają na wyciągnięcie następujących stwierdzeń i wniosków:

1. W badaniach dowiedziono, że czas konserwacji ma znaczący wpływ na jakość nasienia knura przechowywanego przez 7 dni. W kolejnych dniach konserwacji stwierdzono istotne obniżenie ruchliwości, integralności błony komórkowej, integralności akrosomu oraz aktywności mitochondriów plemników. W celu efektywniejszego wykorzystania potencjału biologicznego nasienia przechowywanego w stanie płynnym zalecać można wykonywanie zabiegów inseminacyjnych nasieniem o ile to możliwe jak najkrócej konserwowanym.
2. Analizując polimorfizm poszczególnych genów najwięcej istotnych zależności odnotowano w przypadku genów *DAZL* i *ESR2*. Dotyczyły one głównie wskaźników oceny szacunkowej oraz szczegółowej wykonanej metodami tradycyjnymi pod mikroskopem. Sugeruje to możliwość wykorzystania tych genów w prognozowaniu przydatności nasienia do konserwacji w stanie płynnym, a powszechne wykorzystanie powyższych metod w praktyce laboratoryjnej powinno sprzyjać wykonaniu badań na licznych materiale.
3. Wykazano istotne różnice między wariantami genu *CD9* w przypadku wskaźników charakteryzujących kinetykę i żywotność plemników. Ze względu jednak na niską frekwencję genotypu *AT* oraz bardzo niską frekwencję genotypu *TT*, uniemożliwiającą uwzględnienie go w analizie statystycznej, należałoby kontynuować badania na większej grupie knurów, w której te genotypy byłby częściej reprezentowane. Pozwoliłoby to na zweryfikowanie przydatności genu *CD9* jako markera mogącego znaleźć zastosowanie w programach selekcyjnych zmierzających do poprawy efektywności konserwacji nasienia knurów w stanie płynnym.
4. W przypadku niektórych analizowanych wskaźników charakteryzujących ruch plemników ocenianych systemem CASA oraz integralność błony komórkowej i aktywność mitochondriów ocenianych metodami fluorescencyjnymi wykazano występowanie istotnych różnic w obrębie form polimorficznych analizowanych genów, z wyjątkiem genu *PIWIL4*. Stwierdzony jednocześnie istotny wpływ rasy/grupy genetycznej knurów na kształtowanie się tych cech, nie pozwala na jednoznaczną preferencję nasienia knurów z daną formą polimorficzną do konserwacji w stanie płynnym. Wykonanie prac na większej liczbie zwierząt w obrębie danej rasy/grupy genetycznej mogłoby przyczynić się do wyjaśnienia roli tych genów w determinacji cech jakości nasienia knurów.
5. Uzyskane wyniki wskazują, że na jakość nasienia w czasie jego przechowywania istotny wpływ wywiera rasa/grupa genetyczna. Ogólnie najwyższymi wartościami analizowanych wskaźników w czasie konserwacji, z wyjątkiem wysokiej aktywności mitochondriów, charakteryzowały się knury PIC, a najniższymi knury rasy wbp, u których między pierwszym a ostatnim dniem przechowywania wystąpiły największe różnice.

6. Wykazane pozytywne zależności między procentowym udziałem plemników o ruchu postępowym ocenianym szacunkowo pod mikroskopem a wskaźnikami ruchliwości plemników ocenianymi systemem CASA, wskaźnikami charakteryzującymi integralność ich błony komórkowej i aktywność mitochondriów wskazują na dużą wiarygodność i przydatność powszechnie wykorzystywanej metody w praktyce laboratoryjnej do określania jakości nasienia i kwalifikacji ejakulatów do dalszego wykorzystania w inseminacji.

8. Piśmiennictwo

1. Adamiak A., Kondracki S., Wysokińska A., 2010: Wpływ pory roku na właściwości ejakulatu knurów ras WBP i PBZ, *Rocz. Nauk. Zoot.*, 37 (2): 159-167.
2. Aitken R.J., Smith T.B., Jobling M.S., Baker M.A., De Iuliis G.N., 2014: Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl.*, 16 (1), 31-38.
3. Amann R.P., Waberski D., 2014: Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments, *Theriogenology*, 81 (1): 5-17.
4. Amman R.P., Katz D.F., 2004: Reflection on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, 25 (3): 317-325.
5. Andrade A.F.C., Knox R.V., M.A. Torres M.A., Pavaneli A.P.P., 2022: What is the relevance of seminal plasma from a functional and preservation perspective?, *Anim. Reprod. Sci.*, 246, doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.106946
6. Antończyk, 2012: Komputerowa analiza ruchliwości i morfologii plemników psa w nasieniu świeżym i poddanym kriokonserwacji, Rozprawa doktorska, Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu.
7. Babicz M., 2014: Hodowla i chów świń, Wyd, UP, Lublin.
8. Bailey J.L., Lessard Ch., Jacques J., Bregue Ch., Dobrinski I., Zeng W., Galantino-Homer H.L., 2008: Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*, 70 (8): 1251-1259.
9. Bajena M., Iwania M., Kondracki S., 2013: Wpływ czynników środowiskowych na jakość nasienia knurów inseminacyjnych, *Wiadomości Zootechniczne*, LI (2): 79-86.
10. Banaszewska D., Biesiada-Drzazga B., Andraszek K., 2015: Frequency of cytoplasmic droplets depends on the breed and age of insemination boars, *Folia Biologica (Kraków)*, 63 (1): 9-18.
11. Banaszewska D., Kondracki S., Wysokińska A., 2007: Wpływ sezonu na zmiany w budowie morfologicznej plemników wybranych ras knurów inseminacyjnych, *Acta Sci. Pol. Zootechnica*, 6 (2): 3-14.
12. Barranco I., Ortega M.D., Martinez-Alborcia M.J., Vazquez J.M., Martinez E.A., Roca J., 2013: Season of ejaculate collection influences the freezability of boar spermatozoa, *Cryobiology*, 67: 299-304.
13. Barranco I., Tvarijonaviciute A., Perez- Patiño C., Alkmin D.V., Ceron J.J., Martinez E.A., Rodriguez-Martinez H., Roca J., 2015: The activity of Paraoxonase type 1 (PON-1) in boar seminal plasma and its relationship with sperm quality, functionality and in vivo fertility, *Andrology* 3 (2): 315-320.
14. Bielański W., 1977: Ważniejsze metody badania nasienia, *Rozród zwierząt*, PWRiL, Warszawa: 437-455.

15. Bielas W., Niżański W., Partyka A., Rząsa A., Mordak R., 2017: Effect of long-term storage in SafeCell+ extender on boar sperm DNA integrity and other key sperm parameters, *Acta Vet Scand*, 59: 1-12.
16. Blom E., 1981: Ocena morfologiczna wad plemników buhaja II. Propozycja nowej klasyfikacji wad plemników, *Med. Weter.* 37 (4): 239-242
17. Blom, E., 1950: A One-Minute Live-Dead Sperm Stain by Means of Eosin-Nigrosin, *Fertility Sterility*, 1: 176-177, doi: 10.1016/S0015-0282(16)30125-X
18. Bochenek M., 1998: Ocena jakości nasienia za pomocą cytometrii przepływowej, *Medycyna Wet.*, 54 (2): 101-105.
19. Boe-Hansen G.B., Christensen P., Vibjerg D., Nielsen M.B.F., Hedeboe A.M., 2008: Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility, *Theriogenology*, 69 (6): 728-736.
20. Bogdzińska M., 2010: Badania molekularne i cytogenetyczne w ocenie cech użytkowości rozrodczej loch ras PBZ i WBP, Rozprawa habilitacyjna, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy, Bydgoszcz.
21. Bogr K. E., Lunstra D. D., Christenson R. K., 1993: Semen characteristics, testicular size and reproductive hormone concentrations in mature Duroc, Meishan, Fengjing and Minzhu boars, *Biol. Reprod.*, 49: 515-521.
22. Bresciani C., Bianchera A., Bettini R., Buschini A., Marchi L., Cabassi C.S., Sabbioni A., Righi F., Mazzoni C., Parmigiani E., 2017: Long-term liquid storage and reproductive evaluation of an innovative boar semen extender (Formula 12®) containing a non-reducing disaccharide and an enzymatic agent, *Anim Reprod Sci.*, 180: 10-16, doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.02.007.
23. Bresciani C., Morini G., Bettini R., Bigliardi E., Di Ianni F., Cabassi C.S., Sabbioni A., Parmigiani E., 2013: Reproductive efficiency of a new modified boar semen extender for liquid storage, *Livestock Sci.*, 157 (1): 384-388.
24. Broekhuijsen M.L., Gaustad A.H., Bolarin G., Knol E.F., 2015: Efficient boar semen production and genetic contribution: the impact of low-dose artificial insemination on fertility, *Reprod Domest Anim*, 50: 103-109.
25. Broekhuijsen M.L., Sostaric E., Feitsmad H., Gadella B.M., 2011: Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination, *Theriogenology*, 76: 1473-1486.
26. Broekhuijsen M.L., Sostaric E., Festima H., Gadella B.M., 2012: Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility, *Journal of Animal Science*, 90 (3): 779-789.
27. Brosseau C., Colas L., Magnan A., Brouard S., 2018: CD9 Tetraspanin: a new pathway for the regulation of inflammation?, *Frontiers in Immunology*, 9: 2316, doi: 10.3389/fimmu.2018.02316

28. Brouwers J.F., Silva P.F.N., Gadella B.M., 2005: New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing, *Theriogenology*, 63: 458-469.
29. Carpino A., Bilińska B., Siciliano M., Maggiolini M., Rago V., 2004: Immunolocalization of estrogen receptor β in the epididymis of mature and immature pigs, *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 42 (1): 13-17.
30. Casas I., Althouse G.C., 2013: The protective effect of a 17 °C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5 °C, *Cryobiology*, 66 (1): 69-75.
31. Cheuqueman C., Bravo P., Treulen F., Giojalas L., Villegas J., Sanchez R., Risopatron J., 2012: Sperm membrane functionality in the dog assessed by flow cytometry, *Reprod. Domest. Anim.*, 47 (1): 39-43.
32. Cho E.S., Sa S.J., Kim K.H., Lee M.J., Ko J.H., Kim Y.J., Seol K.H., Hong J.K., Kim K.S., Kim Y.M., Woo J.S., 2015: Association study analysis of cluster-of-differentiation antigen 9 (CD9) gene polymorphism (g.358 A>T) for duroc boar post-thawed semen motility and kinematic characteristics, *J. Emb. Trans.*, 30 (2): 109-114.
33. Cupperová P., Simon M., Antalíková J., Michalková K., Horovská L., Hluchý S., 2014: Distribution of tetraspanin family protein CD9 in bull reproductive system, *Czech J. Anim. Sci.*, 59 (3): 134-139.
34. Dziekońska A., Fraser L., Majewska A., Lecewicz M., Zasiadczyk Ł., Kordan W., 2013: Effect of commercial long-term extenders on metabolic activity and membrane integrity of boar spermatozoa stored at 17 °C, *Polish Journal of Veterinary Science*, 16: 517-525.
35. Dziekońska A., Kinder M., Fraser L., Strzeżek J., Kordan W., 2017a: Metabolic activity of boar semen stored in different extenders supplemented with ostrich egg yolk lipoproteins, *Journal of Veterinary Research*, 61 (1): 127-133.
36. Dziekońska A., Strzeżek J., 2011: Boar variability affects sperm metabolism activity in liquid stored semen at 5 °C, *Pol J Vet Sci*, 14: 21-27.
37. Dziekońska A., Świąder K., Koziorowska-Gilun M., Mitelska K., Zasiadczyk Ł., Kordan W., 2017b: Effect of boar ejaculate fraction, extender type and time of storage on quality of spermatozoa, *Polish Journal of Veterinary Science*, 20 (1): 77-84.
38. Eckert R., Oczkowicz M., 2010: Aktualne trendy w badaniach nad udoskonalaniem użytkowości trzody chlewnej w oparciu o metody genetyki molekularnej, *Roczniki Naukowe Zootechniki, Monografie i Rozprawy*, 44: 21-25.
39. Flowers W.L., 2002: Increasing fertilization rate of boars: influence of number and quality of spermatozoa inseminated, *J Anim Sci*, 80: 47-53.
40. Foxcroft G.R., Patterson J., Cameron A., Dyck M.K., 2010: Application of advanced AI technologies to improve the competitiveness of the pork industry, *Proc. 21st IPVS Cong, Vancouver, Canada, July 18-21*: 25-29.

41. Fraser L., Gorszczaruk K., Lecewicz M., Strzeżek J., 2003: Age-related changes and seasonal variations in boar sperm metabolism during liquid storage at 5 °C and 16 °C, *J Anim. And Food Sci.*, 12 (4): 803-811.
42. Fraser L., Strzeżek J., Filipowicz K., Mogielnicka-Brzozowska M., Zasiadczyk L., 2016: Age and seasonal-dependent variations in the biochemical composition of boar semen, *Theriogenology*, 86 (3): 806-816.
43. Fraser L., Zasiadczyk Ł., Strzeżek J., 2010: Interactions of egg yolk lipoprotein fraction with boar spermatozoa assessed with a fluorescent membrane probe, *Folia Histochem. Cytob.*, 48 (2): 292-298.
44. Frączek M., Kurpisz M., 2005: System redoks w nasieniu męskim i peroksydacyjne uszkodzenia plemników, *Post. Hig. Med. Dośw.*, 59: 523-534.
45. Frunza I., Cermescu H., Korodi G., 2008: Physical and chemical parameters of boar sperm, *Medicina Veterinaria*, 41: 634-640.
46. Fu X.-F., Cheng S.F., Wang L.Q., Yin S., De Felici M., Shen W., 2015: DAZ family proteins, key players for germ cell development, *Int. J. Biol. Sci.*, 11:1226-1235, doi: 10.7150/ijbs.11536.
47. Gadea J., 2003: Semen extenders used in artificial insemination of swine, *Span J Agric Res.*, 1 (2): 17-27.
48. Gadea J., 2005: Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility, *Theriogenology*, 63: 431-444.
49. Gao N., Chen Y., Liu X., Zhao X., Zhu L., Liu A., Jiang W., Peng X., Zhang C., Tang Z., Li X., Chen Y., 2019: Weighted single-step GWAS identified candidate genes associated with semen traits in a Duroc boar population, *BMC Genomics*, 20: 797, doi: 10.1186/s12864-019-6164-5.
50. Garner D.L., Johnson L. A., 1995: Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide, *Biol. Reprod.*, 53: 276-284.
51. Garner D.L., Thomas C.H.A., Joerg H.W., Mel Dejarnette J., Marshall C.E., 1997: Fluoremetric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa, *Biol. Reprod.*, 57: 1401-1406.
52. Gączarzewicz D., 2015: Influence of chamber type integrated with computer-assisted semen analysis (CASA) system on the results of boar semen evaluation, *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18 (4): 817-825.
53. Gączarzewicz D., Piasecka M., Udała J., Błaszczuk B., Stankiewicz T., Laszczynska M., 2010: Plasma membrane changes during the liquid storage of boar spermatozoa: a comparison of methods, *Acta Veterinaria Hungarica*, 58 (1): 105-116.
54. Gączarzewicz D., Udała J., Piasecka M., Błaszczuk B., Stankiewicz T., 2015: Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability, *Turkish Journal of Biology*, 39: 582-594.

55. Gillan L., Evans G., Maxwell W.M.C., 2005: Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential, *Theriogenology*, 63: 445-457.
56. Gonzalez-Castro R., Porflidt C., Patton T., Goins D., Herickhoff L., 2022: Effect of season, genetic line and temperature during transport on sperm motility of commercial insemination doses of pooled boar semen: A retrospective study, *Reprod Dom Anim.*, 57: 1363-1374.
57. Gotowiecka M., Nizański W., Partyka A., Strzeżek R., Koziorowska-Gilun N., 2015: Ocena wpływu stresu oksydacyjnego na nasienie zwierząt, *Medycyna weterynaryjna*, 71 (12): 743-747.
58. Górski K, Kondracki S, Iwanina M, Kordan W, Fraser L, 2021: Effects of breed and ejaculate volume on sperm morphology and semen parameters of boars. *Anim Sci J*, 92 (1): e13629, doi: 10.1111/asj.13629.
59. Guimarães D.B., Barros T.B., van Tilburg M.F., Martins J.A.M., Moura A.A., Moreno F.B., Monteiro-Moreira A.C., Moreira R.A., Toniolli R., 2017: Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation, *Anim. Reprod. Sci.*;183: 27-38.
60. Gunawan A., Cinar M.U., Uddin M. J., Kaewmala K., Tesfaye D., Phatsara C., Tholen E., Looft C., Schellander K., 2012: Investigation on association and expression of ESR2 as a candidate gen for boar sperm quality and fertility, *Reprod. Dom. Anim.*, 47: 782-790.
61. Gundogan M., 2007: Seasonal variation in serum testosterone. T3 and andrological parameters of two Turkish sheep breeds, *Small Rumin. Res.*, 67: 312-316.
62. Guthrie H.D., Welch G.R., 2012: Effects of reactive oxygen species on sperm function, *Theriogenology*, 78 (8): 1700-1708.
63. Hafemeister T., Schulze P., Simmet C., Fuchs-Kittowski F., Schultze M., 2023: Intensity and duration of vibration emissions during shipping as interacting factors on the quality of boar semen extended in Beltsville thawing solution, *Animals*, 13(5): 952, doi: 10.3390/ani13050952.
64. Henning H., Franz J., Batz-Schott J., Thi X.L., Waberski D., 2022a: Assessment of chilling injury in boar spermatozoa by kinematic patterns and competitive sperm-oviduct binding in vitro, *Animals*, 11;12 (6): 712, doi: 10.3390/ani12060712.
65. Henning H., Luther A. M., Höfner-Schmiing L., Waberski D., 2022b: Compensability of an enhanced incidence of spermatozoa with cytoplasmic droplets in boar semen for use in artificial insemination: a single cell approach, *Scientific Reports*, 12 (1): 21833, doi: 10.1038/s41598-022-26020-5.
66. Hernández M., Roca J., Calvete J.J., Sanz L., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J.A., Vázquez J.M., Martínez E.A., 2007: Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars, *J. Androl.*, 28: 689-697.
67. Jankovičová J., Neuerová Z., Sečová P., Bartóková M., Bubeníčková F., Komrsková K., Postlerová P., Antalíková J., 2020: Tetraspanins in mammalian reproduction: spermatozoa, oocytes and embryos, *Medical Microbiology and Immunology*, 209: 407-425.

68. Jankovičová J., Simon M., Antalíková J., Cupperová P., Michalková K., 2015: Role of tetraspanin CD9 molecule in fertilization of mammals, *Physiol. Res.*, 64: 279-293.
69. Jedlińska-Krakowska M., 2005: Stres oksydacyjny oraz wpływ reaktywnych form tlenowych na funkcję nasienia, *Med. Wet.*, 61(10): 1122-1123.
70. Jung M., Rudiger K., Schulz M., 2015: In Vitro Measures for Assessing Boar Semen Fertility, *Reprod Dom Anim*, 50 (2), 20-24.
71. Kaewmala K., Uddin M. J., Cinar M. U., Große-Brinkhaus C., Jonas E., Tesfaye D., Phatsara C., Tholen E., Looft C., Schellander K., 2012: Investigation into association and expression of PLC ζ and COX-2 as candidate genes of boar sperm quality and fertility, *Reprod. Dom. Anim.*, 47: 213-223.
72. Kaewmala K., Uddin M.J., Cinar M.U., Große-Brinkhaus C., Jonas E., Tesfaye D., Phatsara C., Tholen E., Looft C., Schellander K., 2011: Association study and expression analysis of CD9 as candidate gene for boar sperm quality and fertility traits, *Elsevier Animal Reproduction Science*, 125: 170-179.
73. Kamanova V., Nevrla P., Hadas Z., Lujka J., Filipcik R., 2021: Changes of sperm morphology in Duroc, Landrace and Large White boars depending on the ambient temperature during the year, *Veterinarni Medicina*, 66 (5): 189-196.
74. Keller A., Kerns K., 2023: Sperm capacitation as a predictor of boar fertility, *Mol. Reprod. Dev.*, 90: 594-600.
75. Klimowicz M.D., Niżański W., Savić M.A., Zbyryt I., Dubiel A., 2005: Ocena jakości nasienia psa przy zastosowaniu konwencjonalnej metody mikroskopowej, cytometru przepływowego oraz komputerowego analizatora jakości nasienia HTM IVOS, *Medycyna Weterynaryjna*, 61 (11): 1250-1255.
76. Kmiec M., Terman A., 2004: Polymorphism in the PRLR/AluI gene and its effect on litter size in Large White sows, *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 22: 523-527.
77. Kmiec M., Ziemak J., Dybus A., Matusiak S., 2002: Analysis of relation between polymorphism in steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) and quantitative and qualitative characters of boar semen, *Czech J. Anim. Sci.*, 47 (5): 194-199.
78. Knecht D., Jasek S., Procak A., Krzyżewski P., 2004: Skuteczność unasieniania loch knurami czystej rasy i mieszańcami, *Med. Wet.*, 60: 1208-1211.
79. Knox R.V., 2016: Artificial insemination in pigs today, *Theriogenology*, 85 (1): 83-93, doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.009
80. Kommisur E., Paulenz H., Sehested E., Grevle I.S., 2002: Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days, *Acta Vet. Scand.*, 43: 49-55.
81. Kondracki S., 2003: Breed differences in semen characteristics of boars used in artificial insemination in Poland, *Pig News Inf.*, 24 (4): 119-122.

82. Kondracki S., 2010: Znaczenie inseminacji w hodowli i produkcji świń, *Rocz. Nauk. Zoot.*, 44: 55-64.
83. Kondracki S., Banaszewska D., 1999: Jakość nasienia knurów inseminacyjnych, *Zesz. Nauk. AR w Krakowie*, 352: 145-150.
84. Kondracki S., Banaszewska D., Wysokińska A., Radomska M., 2004: Effect of age on semen traits of Duroc breed used in insemination, *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 22 (3): 281-288.
85. Kondracki S., Górski K., Iwanina M., Kordan W., Lecewicz M., 2023: Association between sperm morphology and sperm count of boar semen, *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 26 (4): 695-704.
86. Kondracki S., Wysokińska A., 2005: Charakterystyka zmian w budowie morfologicznej plemników knura, z uwzględnieniem wieku i rasy rozplodnika, *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis. Zootechnica*, 47: 97-104.
87. Kondracki S., Wysokińska A., Banaszewska D., Iwanina M., 2007: Zastosowanie metody klasyfikacji spermiogramów do oceny jakości morfologicznej nasienia knura lub grupy knurów, *Rocz. Nauk. PTZ*, 3 (1): 79-89.
88. Kondracki S., Wysokińska A., Banaszewska D., Woźniak E., 2004: Międzyrasowa zmienność cech fizycznych ejakulatu knurów inseminacyjnych, *Zesz. Nauk. Akademii Rolniczej we Wrocławiu*, 488: 179-183.
89. Kordan W., Fraser L., Wysocki P., Strzeżek R., Lecewicz M., Mogielnicka-Brzozowska M., Dziekońska A., Soliwoda D., Koziorowska-Gilun M., 2013: Semen quality assessments and their significance in reproductive technology, *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16 (4): 823-833.
90. Kowalczyk M., Szabelak A., Dylewska M., Jakubczak A., 2018: Markery molekularne wykorzystywane w selekcji zwierząt hodowlanych, *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 592: 37-49, doi: 10.22630/ZPPNR.2018.592.4.
91. Kowalczykiewicz D., Pawlak P., Lechniak D., Wrzesinski J., 2012: Altered Expression of Porcine Piwi Genes and piRNA during Development, *PLoS ONE*, 7 (8): e43816, doi: 10.1371/journal.pone.0043816.
92. Kozdrowski R., Dubiel A., 2004: The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa* L.) semen, *Anim. Reprod. Sci.*, 80: 281-289.
93. Kruit S.A., de Bruijn D.S., Broekhuijsen M.L.W.J., Olthuis W., Segerink L.I., 2022: Label-free microfluidic impedance cytometry for acrosome integrity assessment of boar spermatozoa, *Biosensors (Basel)*, 12 (9): 679.
94. Kumar S., Singh U., Deb R., Tyagi S., Mandal D.K., Kumar M., Sengar S., Sharma S., Singh R., Singh R., 2015: A SNP (g.358 A>T) at intronic region of CD9 molecule of crossbred bulls may associate with spermatozoal motility, *Meta Gene*, 5: 140-143.

95. Lemma A., 2011: Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility, *Artificial Insemination in Farm Animals*, edited by dr Milad Manafi, 191-216, doi: 10.5772/16563.
96. Li H., Liang Z., Yang J., Wang D., Wang H., Zhu M., Geng B., Xu E.Y. 2019: DAZL is a master translational regulator of murine spermatogenesis, *Natl. Sci. Rev.*, 6: 455-468.
97. Lin C.L., Ponsuksili S., Tholen E., Jennen D.G.J., Schellander K., Wimmers K., 2006a: Candidate gene markers for sperm quality and fertility of boar, *Animal Reproduction Science*, 92: 349-363.
98. Lin C.L., Tholen E., Jennen D., Ponsuksili S., Schellander K., Wimmers K., 2006b: Evidence for effects of testis and epididymis expressed genes on sperm quality and boar fertility traits, *Reprod. Dom. Anim.* 41: 538-543.
99. Lopez Rodriguez A., Rijsselaere T., Vyt P., Van Soom A., Maes D., 2012: Effect of dilution temperature on boar semen quality, *Reprod Domest Anim*, 47 (5): 63-66.
100. Lopez Rodriguez A., Van Soom A., Arsenakis I., Maes D., 2017: Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen, *Porcine Health Management*, 3: 15, doi: 10.1186/s40813-017-0062-5.
101. Lu J.C., Huang Y.F., Lu N.Q., 2013: Computer-aided sperm analysis: past, present and future, *Andrology*, 46: 329-338.
102. Lubarda Z., Strzeżek J. 1990. Wybrane aspekty peroksydacji lipidów w nasieniu, *Post. Nauk Rol.* 4/5/6, 95-106.
103. Luter A.M., Nguyen T.Q., Verpohl J., Waberska D., 2021: Antimicrobially active semen extenders allow the reduction of antibiotic use in pig insemination, *Antibiotics*, 10: 1319-1322.
104. Ma C., Li J., Tao H., Lei B., Li Y., Tong K., Zhang X., Guan K., Shi Y., Li F., 2013: Discovery of two potential DAZL gene markers for sperm quality in boars by population association studies, *Animal Reproduction Science*, 143: 97-101.
105. Madeja Z., Warkoczek M., Strabel T., Lechniak D., 2003: Przydatność testu hipoosmotycznego pęcznienia plemników do oceny jakości nasienia buhajów i knurów, *Medycyna Weterynaryjna*, 59 (12): 1115-1118.
106. Maes D., Van Soom A., Appeltant R., Arsenakis I., Nauwynck R., 2016: Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens, *Theriogenology*, 85: 27-38.
107. Maleszewski M., 2011: Zapłodnienie i zapłodnienie in vitro, *Kosmos, Problemy Nauk Biologicznych*, 60 (1): 5-16.
108. Martinez E.A., Cuello C., Parrilla I., Martinez C.A., Nohalez A., Vazquez J.L., Vazquez J.M., Roca J., Gil M.A., 2016: Recent advances toward the practical application of embryo transfer in pigs, *Theriogenology*, 85 (1): 152-61.
109. Martinez-Alborcia M.J., Valverde A., Parrilla I., Vazquez J.M., Martinez E.A., Roca J., 2012: Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate, *PLoS ONE*, 7 (5): e36550, doi: 10.1371/journal.pone.0036550.

110. Maside C., Recuero S., Huetos-Salas A., Ribas-Maynou J., Yeste M., 2023, Animal board invited review: An update on the methods for semen quality evaluation in swine – from farm to the lab, *Animal*, 3: 7-20.
111. Maxwell W.M.C., Johnson L.A., 1997: Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation, *Mol. Reprod. Dev.*, 46: 408-418.
112. May N., Patterson J.L., Pinilla J.C., Carpenter A., Werner T., Triemert E., Holden N., Foxcroft G.R., Dixon W.T., Dyck M.K., 2015: Seminal plasma proteins associated with boar fertility, *Reprod Dom Anim*, 50 (2): 110-118.
113. Mellagi A.P.G., Will K.J., Quirino M., Bustamante-Filho I.C., Ulguim R. da R., Bortolozzo F.P., 2023: Update on artificial insemination: semen, techniques, and sow fertility, *Mol. Reprod. Dev.*, 90: 601-611.
114. Menegat M.B., Mellagi A.P.G., Bortolin R.C., Menezes T.A., Vargas A.R., Bernardi M.L., Wentz I., Gelain D.P., Moreira J.C.F., Bortolozzo F.P., 2017: Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short- and long-term extenders, *Anim Reprod Sci*, 179: 67-79.
115. Mikedis M.M., Fan Y., Nicholls P.K., Endo T., Jackson E.K., Cobb S.A., de Rooij D.G., Page D.C. 2020: DAZL mediates a broad translational program regulating expansion and differentiation of spermatogonial progenitors, *Elife*, 9: e56523, doi: 10.7554/eLife.56523.
116. Morales P., Katz D.F., Overstreet J.W., Samuels S.J., Chang R.J., 1988: The relationship between the motility and morphology of spermatozoa in human semen, *J. Androl.*, 9 (4); 241-247.
117. Mortimer S.T., 2000: CASA – practical aspects, *Journal of Andrology*, 21: 515-524.
118. Muczyńska E., Kondracki S., Wysokińska A., 2010: Zmienność międzyrasowa cech fizycznych ejakulatów knurów użytkowanych w stacji unasienniania loch, *Rocz. Nauk. Zoot.*, 37 (2): 151-157.
119. Namuncura C., Sanchez R., Pezo F., Uribe P., Navarro P., Zambrano F., 2020: Rest days and storage of boar semen at 17 °C: Effect on motility and sperm concentration, *Andrology*, 52: 6-12.
120. Nesci S., Spinaci M., Galeati G., Nerozzi C., Pagliarani A., Algieri C., Tamanini C., Bucci D., 2020: Sperm function and mitochondrial activity: An insight on boar sperm metabolism, *Theriogenology*, 144: 82-88.
121. Nicholls P.K., Schorle H., Naqvi S., Hu Y.-C., Fan Y., Carmell M.A., Dobrinski I., Watson A.L., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Page D.C., 2019: Mammalian germ cells are determined after PGC colonization of the nascent gonad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116: 25677–25687, doi: 10.1073/pnas.1910733116.

122. Nizański W., Twardoń J., Klimowicz M., 2006: Wykorzystanie komputerowej analizy jakości nasienia (CASA system) w ocenie nasienia knurów, *Trzoda Chlewna*, 44 (2): 43-44.
123. Nosková A., Wurmser C., Crysanto D., Sironen A., Uimari P., Fries R., Andresson M., Pausch H., 2020: Deletion of porcine BOLL is associated with defective acrosomes and subfertility in Yorkshire boars, *Anim Genet*, 51 (6): 945-949.
124. Novak S., Ruiz-Sánchez A., Dixon W.T., Foxcroft G.R., Dyck M.K., 2010: Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars, *J Androl.*, 31: 188-200.
125. Ogura Y., Takagishi Y., Harayama H., 2016: Changes in the distribution and molecular mass of boar sperm acrosome-associated 1 proteins during the acrosome reaction; their validity as indicators for occurrence of the true acrosome reaction, *Anim Reprod Sci*, 172: 94-104.
126. Padilla L., Barranco I., Martínez-Hernández J., Parra A., Parrilla I., Pastor L.M., Rodriguez-Martinez H., Lucas X., Roca J., 2023: Extracellular vesicles would be involved in the release and delivery of seminal TGF- β isoforms in pigs, *Front. Vet. Sci.*, 10, doi: 10.3389/fvets.2023.1102049.
127. Park C.S., Yi Y. J., 2002: Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons, *Anim. Reprod. Sci.*, 73: 53-61.
128. Pedrosa A.C., Andrade Torres M., Vilela Alkmin D., Pinzon J.E.P., Kitamura Martins S.M.M., Coelho da Silveira J., Furugen Cesar de Andrade A., 2021: Spermatozoa and seminal plasma small extracellular vesicles miRNAs as biomarkers of boar semen cryotolerance, *Theriogenology*, 174: 60-72.
129. Pena F., Rodriguez-Martinez H., 2023: Clinical applications of flow cytometric sperm analyses, *Clin. Theriogenology*, 15 (Review Raport), doi: 10.58292/ct.v15.9406.
130. Pezo F., Romero F., Zambrano F., Sánchez RS., 2019: Preservation of boar semen: An update, *Reprod. in Dom. Anim.*, 54 (3): 423-434.
131. Piomboni P., Focarelli R., Stendardi A., Ferramosca A., Zara V., 2012: The role of mitochondria in Energy production for human sperm motility, *Int J Androl.*, 35 (2): 109-124.
132. Pokrywka K., Ruda M., Tereszkiewicz K., 2009: Jakość nasienia knurów czystorasowych urodzonych w różnych porach roku, *Acta Sci. Pol., Zootechnica*, 8: 33-40.
133. Popova D., Bhide P., D'Antonio F., Basnet P., Acharya G., 2022: Sperm mitochondrial DNA copy numbers in normal and abnormal semen analysis: A systematic review and meta-analysis, *BJOG*, 129 (9): 1434-1446, doi: 10.1111/1471-0528.17078.
134. Poterała A., Rzeszowska-Wolny J., 2016: Klasyfikacja, budowa i funkcjonowanie białek Ago u Eukariontów, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 70: 1005-1016.
135. Ramio-Lluch, Fernandez-Novell J.M., Pena A., Bucci D., Rigau T., Rodriguez-Gil J.E., 2012: In vitro capacitation and subsequent acrosome reaction are related to changes in the expression

- and location of midpiece actin and mitofusin-2 in boar spermatozoa, *Theriogenology*, 77 (5): 979-978.
136. Reyer H., Abou-Soliman I., Schulze M., Henne H., Reinsch N., Schoen J., Wimmers K., 2024: Genome-wide association analysis of semen characteristics in piétrain boars, *Genes*, 15 (3): 382, doi: 10.3390/genes15030382.
 137. Roca J., Broekhuijse M.L.W.J., Parrilla I., Rodriguez-Martinez H., Martinez E.A., Bolarin A., 2015: Boar differences in artificial insemination outcomes: can they be minimized?, *Reprod. Domest. Anim.*, 50 (2): 48-55, doi: 10.1111/rda.12530.
 138. Roca J., Parrilla I., Bolarin A., Martinez E.A., Rodriguez-Martinez H., 2016: Will AI in pigs become more efficient?, *Theriogenology*, 86 (1): 187-193, doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.11.026
 139. Rodriguez-Martinez H., 2019: Semen evaluation: can we forecast fertility?, *Vet. Stanica*, 50: 293-305.
 140. Rodriguez-Martinez H., Martinez-Serrano C.A., Alvarez-Rodriguez M., Martinez E.A., Roca J., 2024: Reproductive physiology of the boar: What defines the potential fertility of an ejaculate?, *Anim. Reprod. Sci.*, doi: 10.1016/j.anireprosci.2024.107476.
 141. Rodriguez-Martinez H., Roca J., 2022: Extracellular vesicles in seminal plasma: a safe and relevant tool to improve fertility in livestock?, *Anim. Reprod. Sci.*, 244, doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.107051.
 142. Różycki M., 2002: Rola i miejsce nauki w nowoczesnej hodowli świń, *Mat. konf. Zastosowanie osiągnięć naukowych z zakresu genetyki, rozrodu i żywienia w nowoczesnej produkcji świń*, ATR Bydgoszcz, 13-17.
 143. Sancho S., Pinart E., Briz M., Garcia-Gil N., Badia N., Bassois J., Kadar E., Pruneda A., Bussaileu E., Yeste M., Coil M.G., Bonet S., 2004: Semen quality of postpubertal boars during: Increasing natural photoperiods, *Theriogenology*, 62: 1271-1282.
 144. Schilling E., Vengust M., 1987: Frequency of semen collection in boars and quality of ejaculates as evaluated by the osmotic resistance of acrosomal membranes, *Anim. Reprod. Sci.* 12: 283-290.
 145. Schmid S., Henning H., Petrunkina A.M., Weitze K.F., Waberski D., 2013: Response to capacitating stimuli indicates extender-related differences in boar sperm function, *J. Anim. Sci.* 91 (10): 5018-5025.
 146. Schulze M., Jung M., Hensel B., 2023: Science-based quality control in boar semen production, *Molecular Reproduction Development*, 90 (7): 612-620.
 147. Selva D.M., Tirado O.M., Toran N., Suarez-Quian C.A., Reventos J., Munell F., 2004: Estrogen Receptor β expression and apoptosis of spermatocytes of mice overexpressing a rat androgen-binding protein transgene, *Biology of Reproduction*, 71: 1461-1468.

148. Siemieniuch M.J., Bielas W., Dubiel A., 2004: Cytometria przepływowa jako metoda oceny jakości nasienia, *Medycyna Wet.*, 60 (12): 1274-1277.
149. Silva P.F., Gadella B.M., 2006: Detection of damage in mammalian sperm cells, *Theriogenology*, 65: 958-978.
150. Sironen A., Thomsen B., Andersson M., Ahola V., Vilkki J., 2006: An intronic insertion in KPL2 results in aberrant splicing and causes the immotile short-tail sperm defect in the pig, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (13): 5006-5011.
151. Sironen A., Uimari P., Nagy S., Paku S., Andersson M., Vilkki J., 2010: Knobbed acrosome defect is associated with a region containing the genes STK17b and HECW2 on porcine chromosome 15, *BMC Genom*, 11: 699, doi: 10.1186/1471-2164-11-699.
152. Skibińska I., Andrusiewicz M., Jendraszak M., Żbikowska A., Jędrzejczak P., Kotwicka M., 2023: Expression of estrogen receptors, PELP1, and SRC in human spermatozoa and their associations with semen quality, *Human Cell*, 36: 554-567.
153. Smardzija M., Dobranić T., Kruslin S., Cergolj M., Prvanović N., Grizelj J., 2008: The use of hypoosmotic swelling test and supravital staining in evaluation of sperm quality in boars, *Veterinarski Arhiv*, 78 (4): 279-287.
154. Song C., Zhang A., Wei Y., Dou Y., Oi K., Li X., Yang F., Li X., Wang K., Oiao R., Han X., 2024: Proteomic analysis of boar sperm with differential ability of liquid preservation at 17 °C, *Theriogenology*, 215: 103-112, doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.11.017.
155. Song H., Zhu L., Li Y., Ma C., Guan K., Xia X., Li F., 2015: Exploiting RNA-sequencing data from the porcine testes to identify the key genes involved in spermatogenesis in Large White pigs, *Gene*, 573: 303-309.
156. Strzeżek J. 1999: Plazma nasienia a niektóre funkcje biologiczne plemników, *Post. Biol. Kom.* 26 (12): 59-68.
157. Strzeżek J., 2007: *Biologia rozrodu zwierząt. Cz. II. Biologiczne uwarunkowania wartości rozplodowej samca*, Wyd. UWM, Olsztyn.
158. Strzeżek J., Fraser L., Kulkińska M., Dziekońska A., Lecewicz M., 2004: Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on Biochemical characteristics of boar semen, *Reproductive Biology*, 4 (3): 271-287.
159. Strzeżek J., Wysocki P., Kordan W., Kuklińska M., Mogielnicka M., Soliwoda d., Fraser L., 2005: Proteomics of boar seminal plasma-current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction, *Reprod Biol*, 5 (3): 249-290.
160. Sultan O.A.A., Eidan S.,M., 2020: Association of CD9 gene with semen quality of holstein bulls : 1 fresh semen, *Biochem. Cell. Arch.*, 20 (1): 2721-2725.
161. Sutovsky P., 2015: New approaches to boar semen evaluation, processing and improvement, *Reprod Dom Anim*, 50 (2): 11-19, doi: 10.1111/rda.12554.

162. Sysa P.S., Karbowicz M., 2007: Patogenetyka samców. Eliminacja obciążeń genetycznych, red. Strzeżek J., *Biologia rozrodu zwierząt*, Wyd. UWM, Olsztyn, 338-341.
163. Szablicka D., Wysokinska A., Pawlak A., Roman K., 2022: Morphometry of boar spermatozoa in semen stored at 17 °C – the influence of the staining technique, *Animals*, 12 (15): 1888, doi: 10.3390/ani12151888.
164. Szczęśniak-Fabiańczyk B., Bochenek M., Smorąg Z., Ryszka F., 2002: Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure, *Reproductive Biology*, 3 (1): 81-87.
165. Szostak B., Sarzyńska J., 2010: Wpływ rasy i wieku na obecność wybranych wad morfologicznych plemników w nasieniu knurów, *Acta Sci. Pol., Zootechnica*, 9 (4): 231-238.
166. Szymanowicz J., Schwarz T., Murawski M., Małopolska M., Oszczęda Z., Tuz R., Nowicki, Bartlewski P.M., 2019: Storage of boar semen at 16 - 18 °C in the long-term commercial extender prepared with deionized water or nanowater, *Anim Reprod.*, 16(4): 864-870.
167. Tamanini M.S.C., Dos Santos G., Leal L.A., Wolf L.M., Schulze M., Christ T.S., Bortolozzo F.P., Ulguim R.R., Wentz I., Mellagi A.P.G., 2022: Impact of agitation time of boar semen doses on sperm traits in short- and long-term extenders, *Animal Reproduction Science*, 247: 107159, doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.107159.
168. Tang Y., Zhang B., Shi H., Yan Z., Wang P., Yang Q., Huang X., Li J., Wang Z., Gun S., 2023: DAZL gene implicated in germ cell development of male Hezuo pig, *Animal Biotechnology*, 34 (8): 4000-4014.
169. Tejerina F., Buranaamnuay K., Saravia F., Wallgren M., Rodriguez-Martinez H., 2008: Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. *Theriogenology*, 69: 1129-1138.
170. Terman A., Kmiec M., Polasik D., 2006: Estrogen receptor gene (ESR) and semen characteristics of boars, *Arch. Tierz. Dummerstorf*, 49 (1): 71-76.
171. Thurston L.M., Siggins K., Mileham A.J., Watson P.F., Holt W.V., 2002: Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation, *Biol. Reprod.*, 66 (3): 545-554.
172. Tremoen N.H., Gaustad A.H., Andersen-Ranberg I., van Son M., Zeremichael T.T., Frydenlund K., Grindflek E., Vage D.I., Myromslien F.D., 2018: Relationship between sperm motility characteristics and ATP concentrations, and association with fertility in two different pig breeds, *Animal Reproduction Science*, 193: 25-38.
173. Trzcińska M., Bryła M., 2017: Wybrane metody oceny kriokonserwowanego nasienia knura, *Wiadomości Zootechniczne*, 55 (5): 80-85.
174. Trzcińska M., Bryła M., 2020: Kierunki i możliwości modyfikacji metod kriokonserwacji oraz oceny jakości nasienia knura, *Monografia, Instytut Zootechniki, Państwowy Instytut Badawczy, Kraków*.

175. Trzcińska M., Bryła M., Smorąg Z., 2008: Effect of liquid storage on membrane integrity and mitochondrial activity: a new diagnostic method of evaluating boar sperm quality. *J Anim Feed Sci*, 17: 372-380.
176. Udała J., Krasnosielska-Warchol D., Rozen J., Radon W., 1996: Przydatność testu oporności osmotycznej [ORT] w ocenie zdolności zapładniającej nasienia knura, *Zeszyty Naukowe, Przegląd Hodowlany*, 26: 83-90.
177. Udała J., Gączarzewicz D., Lasota B., Błaszczuk B., Seremak B., Stankiewicz T., 2005: Charakterystyka zmian budowy morfologicznej plemników knurów użytkowanych w inseminacji, *Folia Univ. Agric. Stetin., Zootechnica* 243 (47): 161-172.
178. Udała J., Kwita E., Gączarzewicz D., Kuba J., Stankiewicz T., Błaszczuk B., Pilarczyk B., Tomza-Marciniak A., Bąkowska M., 2015: Selected meat and fattening features and sperm quality in young purebred and hybrid boars, *Acta Sci. Pol. Zootechnica* 14(2): 165-174.
179. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G., 2012: Primer3--new capabilities and interfaces, *Nucleic Acids Res.*, 40 (15): e115, doi: 10.1093/nar/gks596.
180. VanGompel M.J.W., Xu E.Y., 2011: The roles of the DAZ family in spermatogenesis, *Spermatogenesis*, 1: 36-46, doi: 10.4161/spmg.1.1.14659.
181. Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K., 2002: Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice, *Theriogenology*, 57: 149-179.
182. Waberski D., Riesenbeck A., Schulze N., Weitze K.F., Johnson L., 2019: Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges, *Theriogenology*, 137: 2-7, doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.030.
183. Waberski D., Schapmann E., Henning H., Riesenbeck A., Brandt H., 2011: Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI, *Theriogenology*, 75 (2): 337-345.
184. Wierzbowski S., 1996: *Andrologia*, Wydawnictwo PLATAN – Kryspinów, Kraków.
185. Wilczyńska E., Kondracki S., Wyskonińska A., Kowalewski D., Gajownik K., 2013: Jakość nasienia knurów ras wbp, pbz, duroc i pietrain w poszczególnych miesiącach roku, *Rocz. Nauk. PTZ*, 9 (1): 49-56.
186. Wimmers K., Lin C.L., Tholen E., Jennen D.G.J., Schellander K., Ponsuksili S., 2005: Polymorphisms in candidate genes as markers for sperm quality and boar fertility, *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*, 36: 152-155.
187. Wysocki P., Orzolek A., Strzeżek J., Koziorowska-Gilun M., Zasiadczyk L., Kordan W., 2015: The activity of N-acetyl- β -hexosaminidase in boar seminal plasma is linked with semen quality and its suitability for cryopreservation, *Theriogenology*, 83: 1194-1202.

188. Wysokińska A., Kondracki S., 2019: Heterosis for morphometric characteristics of sperm cells from Duroc x Pietrain crossbred boars, *Anim Reprod Sci*, 211: 106217, doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.106217.
189. Wysokińska A., 2020: Effect of sperm concentration on boar spermatozoa mitochondrial membrane potential and motility in semen stored at 17 °C, *Acta Vet. Brno*, 89: 333-340.
190. Wysokińska A., Kondracki S., Banaszewska D., 2005: Wpływ pory roku na cechy fizyczne ejakulatu knurów mieszańców duroc × pietrain i hampshire × pietrain oraz czysto rasowych knurów duroc, hampshire i pietrain, *Rocz. Nauk. PTZ*, 1 (3): 535-544.
191. Wysokińska A., Kondracki S., Banaszewska D., Kondracka D., 2006: Frequency of morphological changes in spermatozoa from the boar semen of different breeds, *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 22 (3): 327-334.
192. Wysokińska A., Kondracki S., Banaszewska D., Zajda J., 2008: Cechy ejakulatu knurów inseminacyjnych w zależności od rasy i pory roku, *Rocz. Nauk. PTZ*, 4 (3): 233-242.
193. Wysokińska A., Szablicka D., 2021: Integrity of sperm cell membrane in the semen of crossbred and purebred boars during storage at 17 °C: heterosis effects, *Animals*, 11 (12): 3337, doi: 10.3390/ani11123373.
194. Wysokińska A., Kondracki S., 2014: Assessment of changes in sperm cell membrane integrity occurring during the storage of semen from genetically different males using two diagnostic methods, *Can. J. Anim. Sci.*, 94: 601-606.
195. Xu Z., Xie Y., Zhou C., Hu Q., Gu T., Yang J., Zheng E., Huang S., Zheng Xu, Cai G., Liu D., Wu Z, Hong L., 2020: Expression Pattern of Seminal Plasma Extracellular Vesicle Small RNAs in Boar Semen, *Front. Vet. Sci.*, 7: 585276, doi: 10.3389/fvets.2020.585276.
196. Yániz J.L., Silvestre M.A., Santolaria P., Soler C., 2018: CASA-Mot in mammals: an update, *Reproduction, Fertility and Development*, 30 (6): 799-809.
197. Yeste M., 2017: State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state, *Animal Reproduction*, 14: 69-81, doi: 10.21451/1984-3143-AR895.
198. Yeste M., Estrada E., Casas I., Bonet S., Rodriguez-Gil J.E., 2013: Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels, *Theriogenology*, 79 (6): 929-939.
199. Zasiadczyk L., Freaser L., Kordan W., Wasilewska K., 2015: Individual and seasonal variations in the quality of fractionated boar ejaculates, *Theriogenology*, 83: 1287-1303.
200. Zhang Y.H., Mei S.Q., Peng X.W., Niu B.Y., Ren Z.Q., Zuo B., Xu D.Q., Lei M.G., Zheng R., Jiang S.W., Deng C.Y., Xiong Y.Z., Li F.E., 2009: Molecular characterization and SNPs analysis of the porcine Deleted in AZoospermia Like (pDAZL) gene, *Animal Reproduction Science*, 112 (3-4): 415-422.

9. Spis tabel i rycin

Tab. 1. Przykładowe geny kandydujące związane z cechami jakości nasienia	27
Tab. 2. Wykaz starterów użytych do amplifikacji badanych fragmentów genów	37
Tab. 3. Skład mieszaniny do reakcji amplifikacji fragmentów analizowanych genów	37
Tab. 4. Profile termiczne reakcji PCR	38
Tab. 5. Długości fragmentów restrykcyjnych dla analizowanych miejsc polimorficznych.....	38
Tab. 6. Frekwencja genotypów i alleli analizowanych polimorfizmów w badanej grupie zwierząt	41
Tab. 7. Liczba osobników w poszczególnych rasach/grupach genetycznych względem wariantów polimorficznych	41
Tab. 8. Wartości analizowanych cech nasienia po pobraniu od knurów dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów	75
Tab. 9. Wartości analizowanych cech nasienia po pobraniu od knurów w poszczególnych grupach genetycznych.....	77
Tab. 10. Wskaźniki analizowanych cech nasienia oceniane na podstawie barwienia różnicowego (eozyna-nigrozyna) w pierwszym dniu przechowywania dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów	78
Tab. 11. Wskaźniki analizowanych cech nasienia oceniane na podstawie barwienia różnicowego (eozyna-nigrozyna) w pierwszym dniu przechowywania w poszczególnych grupach genetycznych..	80
Tab. 12. Odsetek plemników z integralną błoną komórkową ocenianą testem fluoroscencyjnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów.....	81
Tab. 13. Odsetek plemników z integralną błoną komórkową ocenianą testem fluoroscencyjnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia w poszczególnych grupach genetycznych	83
Tab. 14. Odsetek plemników z nieuszkodzonym akrosomem ocenianym testem fluorescencyjnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów.....	84
Tab. 15. Odsetek plemników z nieuszkodzonym akrosomem ocenianym testem fluorescencyjnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia w poszczególnych grupach genetycznych	86
Tab. 16. Odsetek plemników o wysokim transbłonowym potencjale mitochondrialnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów..	87
Tab. 17. Odsetek plemników o wysokim transbłonowym potencjale mitochondrialnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia w poszczególnych grupach genetycznych.....	89
Tab. 18. Odsetek plemników o niskim transbłonowym potencjale mitochondrialnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów..	90
Tab. 19. Odsetek plemników z nieaktywnymi mitochondriami w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów	92

Tab. 20. Procentowy udział plemników ruchliwych w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów	94
Tab. 21. Procentowy udział plemników ruchliwych w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych grup genetycznych.....	96
Tab. 22. Procentowy udział plemników o ruchu postępowym w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów	97
Tab. 23. Procentowy udział plemników o ruchu postępowym w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych grup genetycznych.....	99
Tab. 24. Prędkość krzywoliniowa (VCL, $\mu\text{m/s}$) plemników w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów	100
Tab. 25. Prędkość liniowa (VSL, $\mu\text{m/s}$) plemników w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów	102
Tab. 26. Prędkość uśredniona (VAP, $\mu\text{m/s}$) plemników w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów	104
Tab. 27. Liniowość ruchu plemników (LIN, %) w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów	106
Tab. 28. Prostość ruchu plemników (STR, %) w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów	108
Tab. 29. Oscylacja toru rzeczywistego plemników (WOB, %) w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów	110
Tab. 30. Amplituda bocznych wychyleń główki plemników (ALH, μm) w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów	112
Tab. 31. Częstotliwość bocznych wychyleń główki plemników (BCF, Hz) w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów	114
Tab. 32. Wartości współczynników korelacji rang Spearmana (r_s) między wybranymi parametrami przechowywanego nasienia.....	116
Ryc. 1. Elektroforegramy przedstawiające poszczególne genotypy analizowanych SNP	40

10. Tabele

Tab. 8. Wartości analizowanych cech nasienia po pobraniu od knurów dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Objętość [cm ³]	Koncentracja [tys./mm ³]	Liczba plemników [mld]	Ruch postępowy plemników [%]	¹ Ruch postępowy plem. dzień 1. [%]
CD9	AA	167	$\bar{x} \pm SD$	252,0 ± 93,0	403,3 ± 143,6	74,9 ± 25,3	79,8 ± 5,4	75,3 ± 11,9
			mediana	245,0	363,0	71,4	80,0	75,0
			min – max	100,0 – 620,0	140,0 – 906,0	31,7 – 176,1	70,0 – 90,0	40,0 – 95,0
	AT	18	$\bar{x} \pm SD$	220,4 ± 74,8	428,4 ± 181,4	67,4 ± 23,3	75,6 ± 7,8	76,2 ± 9,4
			mediana	218,0	373,0	62,8	80,0	80,0
			min – max	113,0 – 359,0	230,0 – 954,0	39,0 – 114,6	50,0 – 80,0	50,0 – 85,0
		185	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	248,9 ± 91,7	405,7 ± 147,3	74,2 ± 25,2	79,4 ± 5,8	75,4 ± 11,6
DAZL	AA	89	$\bar{x} \pm SD$	234,9 ± 87,1	442,01 ± 164,7	76,9 ± 27,6	80,4 ± 5,4	73,4 ± 13,1
			mediana	229,0	408,0^a	73,6	80,0	75,0
			min – max	100,0 – 475,0	163,0 – 906,0	31,7 – 176,1	70,0 – 90,0	40,0 – 95,0
	AC	61	$\bar{x} \pm SD$	258,2 ± 90,7	384,0 ± 163,7	72,7 ± 25,0	78,0 ± 6,2	75,9 ± 11,2
			mediana	259,0	355,0	67,5	80,0	80,0
			min – max	110,0 – 530,0	140,0 – 954,0	32,3 – 150,9	50,0 – 90,0	40,0 – 95,0
	CC	39	$\bar{x} \pm SD$	277,1 ± 102,7	363,9 ± 102,1	75,3 ± 23,6	79,1 ± 5,4	78,2 ± 8,4
			mediana	250,0	350,0^b	72,2	80,0	80,0
			min – max	128,0 – 620,0	153,0 – 655,0	39,0 – 167,1	70,0 – 90,0	50,0 – 90,0
		189	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	251,1 ± 92,7	407,2 ± 148,0	75,2 ± 25,9	79,3 ± 5,7	75,2 ± 11,8

Cd. Tab. 8.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Objętość [cm ³]	Koncentracja [tys./mm ³]	Liczba plemników [mld]	Ruch postępowy plemników [%]	¹ Ruch postępowy plem. dzień 1. [%]
ESR2	AA	29	$\bar{x} \pm SD$	291,4 ± 129,8	351,5 ± 117,6	70,3 ± 21,5	78,6 ± 4,3	76,1 ± 10,9
			mediana	268,0^A	331,0^A	69,6	80,0	75,0
			min – max	118,0 – 620,0	140,0 – 588,0	33,6 – 110,2	70,0 – 89,0	40,0 – 95,0
	AG	64	$\bar{x} \pm SD$	271,7 ± 77,4	386,5 ± 144,5	78,4 ± 26,9	79,1 ± 4,4	77,2 ± 12,0
			mediana	264,0^A	349,5	73,4	80,0	80,0
			min – max	113,0 – 480,0	150,0 – 954,0	42,2 – 176,1	70,0 – 90,0	40,0 – 95,0
	GG	95	$\bar{x} \pm SD$	225,1 ± 81,7	438,1 ± 153,3	74,5 ± 26,6	79,7 ± 6,9	73,5 ± 11,9
			mediana	217,0^B	410,0^B	71,3	80,0	75,0
			min – max	100,0 – 440,0	199,0 – 906,0	31,7 – 150,9	50,0 – 90,0	40,0 – 95,0
		188	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	251,2 ± 92,9	407,2 ± 148,4	75,2 ± 26,0	79,3 ± 5,8	75,2 ± 11,8
PIWIL4	CC	8	$\bar{x} \pm SD$	199,8 ± 33,2	508,5 ± 215,9	78,3 ± 31,7	78,8 ± 6,4	76,0 ± 14,7
			mediana	195,0	440,5	64,9	80,0	80,0
			min – max	148,0 – 260,0	306,0 – 906,0	53,1 – 142,7	70,0 – 90,0	50,0 – 85,0
	CT	26	$\bar{x} \pm SD$	246,8 ± 100,2	435,7 ± 174,9	79,4 ± 30,9	80,8 ± 7,4	73,9 ± 12,6
			mediana	229,5	400,0	77,8	80,0	75,0
			min – max	100,0 – 524,0	163,0 – 812,0	31,7 – 150,9	70,0 – 90,0	45,0 – 90,0
	TT	154	$\bar{x} \pm SD$	254,3 ± 93,3	397,3 ± 137,9	74,3 ± 24,9	79,1 ± 5,4	75,3 ± 11,6
			mediana	245,5	359,5	71,4	80,0	75,0
			min – max	102,0 – 620,0	140,0 – 954,0	32,3 – 176,1	50,0 – 90,0	40,0 – 95,0
		188	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	250,9 ± 92,9	407,4 ± 148,4	75,2 ± 26,0	79,3 ± 5,8	75,1 ± 11,8

Objaśnienia: ¹ procent plemników o ruchu postępowym określany na stoliku Bloma w pierwszym dniu badań; a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test Kruskala-Wallisa).

Tab. 9. Wartości analizowanych cech nasienia po pobraniu od knurów w poszczególnych grupach genetycznych

Grupa genetyczna	n	Miara statystyczna	Objętość [cm ³]	Koncentracja [tys./mm ³]	Liczba plemników [mld]	Ruch postępowy plemników [%]	¹ Ruch postępowy plem. dzień 1. [%]
duroc	50	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	186,2 ± 60,8 175,0^A 100,0 – 353,0	508,8 ± 160,0 487,5^A 269,0 – 906,0	76,1 ± 28,2 69,0 33,9 – 150,9	83,2 ± 4,7 80,0^A 80,0 – 90,0	75,8 ± 11,5 75,0 50,0 – 95,0
duroc × pietrain	25	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	256,1 ± 87,4 240,0^B 113,0 – 434,0	424,5 ± 176,4 376,0 163,0 – 954,0	75,1 ± 24,5 76,0 43,2 136,9	74,8 ± 7,1 80,0^B 50,0 – 80,0	72,2 ± 11,0 75,0 45,0 – 85,0
pbz	52	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	286,5 ± 106,8 264,5^B 116,0 – 620,0	352,5 ± 104,1 333,5^B 140,0 – 624,0	73,5 ± 21,0 71,4 33,6 – 136,8	78,6 ± 4,4 80,0^B 70,0 – 90,0	75,1 ± 11,3 75,0 40,0 – 95,0
PIC	32	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	268,4 ± 75,0 265,0^B 110,0 – 421,0	354,5 ± 102,7 325,5^B 199,0 – 600,0	75,6 ± 32,5 68,8 31,7 – 176,1	79,8 ± 5,6 80,0 70,0 – 90,0	79,5 ± 10,9 80,0^A 45,0 – 90,0
wbp	30	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	275,4 ± 81,2 277,5^B 128,0 – 448,0	374,8 ± 123,2 344,0^B 150,0 – 590,0	76,3 ± 24,6 73,2 40,6 – 140,4	77,5 ± 4,3 80,0^B 70,0 – 80,0	69,8 ± 13,4 75,0^B 40,0 – 85,0
	189	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	251,1 ± 92,7	407,2 ± 148,0	75,2 ± 25,9	79,3 ± 5,7	75,2 ± 11,8

Objaśnienia: ¹ procent plemników o ruchu postępowym określany na stoliku Bloma w pierwszym dniu badań; A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami genetycznymi - p ≤ 0,01 (test Kruskala-Wallisa)

Tab. 10. Wskaźniki analizowanych cech nasienia oceniane na podstawie barwienia różnicowego (eozyna-nigrozyna) w pierwszym dniu przechowywania dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Plemniki prawidłowe [%]	Plemniki z wadami głównymi [%]	Plemniki z wadami podrzędnymi [%]	Plemniki z nieuszkodzonym akrosomem [%]	Plemniki żywe [%]
<i>CD9</i>	<i>AA</i>	171	$\bar{x} \pm SD$	$92,0 \pm 5,9$	$3,4 \pm 3,4$	$4,5 \pm 4,5$	$84,7 \pm 9,1$	$88,9 \pm 6,5$
			mediana	94,0	2,0	3,5	86,0	90,0
			min – max	70,0 – 99,0	0,0 – 18,0	0,0 – 24,0	56,0 – 100,0	60,0 – 99,0
	<i>AT</i>	19	$\bar{x} \pm SD$	$92,6 \pm 3,7$	$3,0 \pm 2,8$	$4,4 \pm 3,5$	$86,7 \pm 9,3$	$87,7 \pm 5,8$
			mediana	92,0	3,5	3,5	87,0	90,0
			min – max	87,0 – 99,0	0,0 – 9,0	0,0 – 12,0	68,0 – 99,5	72,0 – 96,0
		190	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	$92,1 \pm 5,7$	$3,4 \pm 3,4$	$3,4 \pm 3,4$	$84,9 \pm 9,1$	$88,8 \pm 6,5$
<i>DAZL</i>	<i>AA</i>	92	$\bar{x} \pm SD$	$91,9 \pm 5,1$	$3,9 \pm 3,6$	$4,2 \pm 3,5$	$84,4 \pm 9,3$	$87,9 \pm 6,1$
			mediana	93,0	3,0^a	4,0	84,0	88,0
			min – max	70,0 – 99,0	0,0 – 14,0	0,0 – 16,0	64,0 – 100,0	65,0 – 98,0
	<i>AC</i>	62	$\bar{x} \pm SD$	$93,0 \pm 5,3$	$2,8 \pm 3,4$	$4,2 \pm 3,9$	$86,6 \pm 8,7$	$90,0 \pm 6,6$
			mediana	94,5	2,0^b	3,0	88,0	90,0
			min – max	73,0 – 99,0	0,0 – 18,0	0,0 – 22,0	56,0 – 100,0	60,0 – 99,0
	<i>CC</i>	40	$\bar{x} \pm SD$	$91,1 \pm 7,1$	$3,2 \pm 2,8$	$5,8 \pm 6,4$	$84,0 \pm 9,2$	$88,6 \pm 6,9$
			mediana	94,0	3,3	4,0	86,0	88,0
			min – max	70,0 – 99,0	0,0 – 10,0	0,0 – 24,0	65,0 – 100,0	72,0 – 99,0
		194	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	$92,0 \pm 5,7$	$3,4 \pm 3,4$	$4,5 \pm 4,4$	$85,0 \pm 9,1$	$88,7 \pm 6,5$

Cd. Tab. 10.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Plemniki prawidłowe [%]	Plemniki z wadami głównymi [%]	Plemniki z wadami podrzędnymi [%]	Plemniki z nieuszkodzonym akrosomem [%]	Plemniki żywe [%]
<i>ESR2</i>	<i>AA</i>	30	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	92,1 ± 6,8 94,0 73,0 – 99,0	2,3 ± 2,7 2,0^a 0,0 – 13,0	5,6 ± 5,9 4,0 0,0 – 23,0	87,4 ± 8,1 87,5^A 70,0 – 100,0	90,3 ± 5,6 91,8 74,0 – 98,0
	<i>AG</i>	67	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	93,3 ± 4,6 94,0^a 82,5 – 99,0	2,9 ± 2,7 2,0 0,0 – 10,0	3,8 ± 3,4 2,5 0,0 – 13,0	86,8 ± 8,7 88,0^A 65,0 – 100,0	89,2 ± 6,7 90,0 65,0 – 99,0
	<i>GG</i>	96	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	91,1 ± 5,8 92,0^b 70,0 – 99,0	4,1 ± 3,9 3,3^b 0,0 – 18,0	4,8 ± 4,4 4,0 0,0 – 24,0	82,9 ± 9,2 82,0^B 56,0 – 100,0	88,0 ± 6,5 88,0 60,0 – 98,0
		193	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	92,0 ± 5,7	3,4 ± 3,4	4,6 ± 4,4	85,0 ± 9,1	88,7 ± 6,5
<i>PIWIL4</i>	<i>CC</i>	8	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	92,3 ± 5,1 92,0 84,0 – 98,0	4,3 ± 3,2 3,8 0,0 – 10,0	3,5 ± 2,9 3,8 0,0 – 8,5	82,2 ± 13,9 83,0 56,0 – 99,0	84,1 ± 10,4 85,0 60,0 – 94,0
	<i>CT</i>	26	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	92,8 ± 5,5 94,0 78,0 – 99,0	3,5 ± 4,4 2,0 0,0 – 18,0	3,7 ± 3,1 2,8 0,0 – 10,0	85,6 ± 8,6 86,0 72,0 – 100,0	88,9 ± 5,4 88,0 76,0 – 98,0
	<i>TT</i>	158	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	91,9 ± 5,8 94,0 70,0 – 99,0	3,3 ± 3,2 2,0 0,0 – 14,0	4,7 ± 4,7 4,0 0,0 – 24,0	84,9 ± 8,8 86,0 64,0 – 100,0	88,9 ± 6,4 90,0 65,0 – 99,0
		192	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	92,0 ± 5,7	3,4 ± 3,4	4,5 ± 4,4	84,9 ± 9,0	88,7 ± 6,5

Objaśnienia: a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test Kruskala-Wallis).

Tab. 11. Wskaźniki analizowanych cech nasienia oceniane na podstawie barwienia różnicowego (eozyna-nigrozyna) w pierwszym dniu przechowywania w poszczególnych grupach genetycznych

Grupa genetyczna	n	Miara statystyczna	Plemniki prawidłowe [%]	Plemniki z wadami głównymi [%]	Plemniki z wadami podrzędnymi [%]	Plemniki z nieuszkodzonym akrosomem [%]	Plemniki żywe [%]
duroc	50	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	91,2 ± 6,0 93,5 73,0 – 99,0	4,8 ± 4,1 4,0^A 0,0 – 18,0	4,0 ± 4,4 2,0 0,0 – 22,0	79,7 ± 7,2 80,0^A 56,0 – 94,0	87,3 ± 7,0 88,0 60,0 – 98,0
duroc × pietrain	28	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	91,0 ± 4,9 91,5 80,5 – 99,0	4,1 ± 3,7 4,0 0,0 – 14,0	4,8 ± 3,1 4,0 0,0 – 10,0	90,0 ± 10,2 91,0^B 68,0 – 100,0	86,6 ± 5,8 86,8^a 72,0 – 96,0
pbz	51	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	92,8 ± 6,4 95,0 70,0 – 99,0	2,0 ± 2,3 2,0^B 0,0 – 10,0	5,2 ± 5,4 3,5 0,0 – 24,0	85,9 ± 8,1 86,0^B 70,0 – 100,0	89,5 ± 5,6 90,0 72,0 – 98,0
PIC	34	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	94,1 ± 4,2 95,0^A 78,0 – 99,0	2,4 ± 1,8 2,0 0,0 – 5,0	3,5 ± 4,1 2,5 0,0 – 20,0	84,7 ± 10,1 88,0^B 65,0 – 99,5	90,4 ± 7,8 91,8^b 65,0 -99,0
wbp	31	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	90,7 ± 5,3 92,0^B 70,0 – 96,0	4,0 ± 3,5 4,0 0,0 – 14,0	5,2 ± 3,9 4,0 0,0 – 16,0	88,0 ± 7,1 88,0^B 76,0 – 100,0	89,9 ± 4,9 90,0 81,0 – 98,0
	194	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	92,0 ± 5,7	3,4 ± 3,4	4,5 ± 4,4	85,0 ± 9,1	88,7 ± 6,5

Objaśnienia: a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami genetycznymi odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test Kruskala-Wallis).

Tab. 12. Odsetek plemników z integralną błoną komórkową ocenianą testem fluoroscencyjnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
<i>CD9</i>	<i>AA</i>	133	$\bar{x} \pm SD$	82,1 ± 6,3	77,0 ± 8,4	70,9 ± 10,0	64,1 ± 13,2
			mediana	82,0^{A'}	77,5^{B'}	71,0^{A, C'}	65,0^{a, D'}
			min – max	70,0 – 98,5	43,0 – 96,5	23,0 – 92,0	17,0 – 100,0
	<i>AT</i>	13	$\bar{x} \pm SD$	81,3 ± 5,9	74,6 ± 7,8	64,3 ± 11,0	55,8 ± 13,9
			mediana	81,5^{A'}	72,0^{AA'}	67,0^{B, B'}	56,0^{b, B', BB'}
			min – max	74,0 – 95,5	64,0 – 90,0	41,0 – 82,0	32,0 – 81,0
		146	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	82,0 ± 6,2	76,8 ± 8,4	70,3 ± 10,2	63,4 ± 13,4
<i>DAZL</i>	<i>AA</i>	70	$\bar{x} \pm SD$	81,4 ± 6,3	75,3 ± 9,0	69,1 ± 11,8	61,5 ± 13,9
			mediana	81,0^{A'}	74,5^{B'}	69,5^{C'}	62,5^{D'}
			min – max	70,0 – 98,5	43,0 – 92,0	23,0 – 90,0	17,0 – 86,5
	<i>AC</i>	47	$\bar{x} \pm SD$	83,0 ± 6,2	78,6 ± 8,1	70,6 ± 9,6	63,6 ± 14,2
			mediana	83,0^{A'}	80,0^{B'}	71,5^{C'}	64,0^{D'}
			min – max	70,0 – 98,5	64,0 – 96,5	50,0 – 92,0	30,0 – 100,0
	<i>CC</i>	30	$\bar{x} \pm SD$	81,9 ± 6,1	77,3 ± 7,0	71,9 ± 7,2	66,9 ± 10,5
			mediana	82,5^{A'}	72,3^{B'}	72,3^{C'}	69,8^{D'}
			min – max	70,0 – 94,5	55,0 – 85,0	55,0 – 85,0	39,0 – 84,0
		147	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	82,0 ± 6,2	76,7 ± 8,4	70,1 ± 10,3	63,3 ± 13,4

Cd. Tab. 12.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	23	$\bar{x} \pm SD$	83,1 ± 7,9	79,1 ± 9,4	71,8 ± 9,7	62,6 ± 17,4
			mediana	83,5^{A'}	80,0^{A'}	72,0^{B'}	64,0^{B'}
			min – max	70,0 – 94,5	62,0 – 96,5	55,0 – 92,0	24,0 – 100,0
	AG	55	$\bar{x} \pm SD$	82,8 ± 5,5	77,1 ± 7,8	70,2 ± 10,3	63,8 ± 12,4
			mediana	82,5^{A'}	78,5^{B'}	71,0^{C'}	65,0^{D'}
			min – max	71,0 – 98,5	43,0 – 92,0	23,0 – 86,0	17,0 – 82,5
	GG	68	$\bar{x} \pm SD$	81,0 ± 6,1	75,7 ± 8,6	69,6 ± 10,7	63,1 ± 13,0
			mediana	81,0^{A'}	74,5^{B'}	69,5^{C'}	63,0^{D'}
			min – max	70,0 – 95,5	53,0 – 92,5	41,0 – 90,0	21,0 – 86,5
		146	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	82,0 ± 6,2	76,8 ± 8,5	70,2 ± 10,4	63,3 ± 13,5
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	79,7 ± 4,3	73,7 ± 10,1	64,0 ± 12,7	55,6 ± 7,9
			mediana	79,0^{A'}	75,0	64,0	55,0^{B'}
			min – max	75,0 – 86,0	58,0 – 84,0	49,0 – 81,0	46,0 – 64,0
	CT	18	$\bar{x} \pm SD$	81,7 ± 7,3	75,3 ± 13,8	68,4 ± 16,2	65,4 ± 19,0
			mediana	81,0^{A'}	76,0^{AA'}	70,0^{B'}	67,0^{B', BB'}
			min – max	72,0 – 94,5	43,0 – 96,5	23,0 – 92,0	17,0 – 100,0
	TT	123	$\bar{x} \pm SD$	82,0 ± 6,0	77,0 ± 7,3	70,5 ± 9,1	63,1 ± 12,6
			mediana	82,0^{A'}	77,0^{B'}	70,0^{C'}	64,0^{D'}
			min – max	70,0 – 98,5	57,5 – 92,5	41,0 – 90,0	21,0 – 86,5
		146	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	81,9 ± 6,1	76,7 ± 8,4	70,1 ± 10,3	63,1 ± 13,4

Objaśnienia: a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test U Manna-Whitneya, test Kruskala-Wallisa); A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 13. Odsetek plemników z integralną błoną komórkową ocenianą testem fluoroscencyjnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia w poszczególnych grupach genetycznych

Grupa genetyczna	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
			1.	3.	5.	7.
duroc	38	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	79,2 ± 5,3 79,0^{A'} 70,0 – 88,0	73,4 ± 7,8 72,5^{B'} 53,0 – 86,0	68,1 ± 9,6 69,0^{C'} 49,0 – 86,0	61,1 ± 11,5 62,5^{a, D'} 21,0 – 83,5
duroc × pietrain	18	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	84,6 ± 7,4 83,8^{A'} 73,0 – 98,5	76,7 ± 12,3 76,8^{AA'} 43,0 – 92,5	67,9 ± 16,3 69,0^{B'} 23,0 – 90,0	62,9 ± 17,2 61,5^{B', BB'} 17,0 – 86,5
pbz	38	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	81,7 ± 6,6 82,0^{A'} 70,0 – 94,5	77,3 ± 8,0 77,8^{B'} 60,0 – 96,5	69,5 ± 9,4 67,5^{C'} 50,0 – 92,0	61,9 ± 14,1 61,0^{D'} 30,0 – 100,0
PIC	32	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	83,5 ± 4,6 83,5^{A'} 71,0 – 94,5	79,9 ± 5,3 81,0^{B'} 67,0 – 90,0	75,4 ± 5,5 76,0^{C'} 64,0 – 88,5	70,0 ± 8,1 71,5^{b, D'} 50,0 – 84,0
wbp	21	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	83,3 ± 6,5 83,0^{A'} 70,0 – 98,5	77,0 ± 8,7 77,0^{A'} 57,5 – 92,0	68,9 ± 10,9 68,0^{B'} 45,0 – 86,0	59,8 ± 16,1 58,5^{a, B'} 24,0 – 82,5
	147	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	82,0 ± 6,2	76,7 ± 8,4	70,1 ± 10,3	63,3 ± 13,4

Objaśnienia: a, b - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami genetycznymi - $p \leq 0,05$ (test Kruskala-Wallisa); A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie grupy genetycznej - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 14. Odsetek plemników z nieuszkodzonym akrosomem ocenianym testem fluorescencyjnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
<i>CD9</i>	<i>AA</i>	132	$\bar{x} \pm SD$	77,5 ± 6,9	72,5 ± 8,6	66,3 ± 10,6	59,7 ± 14,0
			mediana	78,3^{A'}	73,3^{B'}	67,0^{A, C'}	62,0^{a, D'}
			min – max	60,0 – 93,0	30,0 – 93,0	20,0 – 86,0	7,0 – 85,5
	<i>AT</i>	13	$\bar{x} \pm SD$	77,6 ± 6,1	70,7 ± 8,5	56,5 ± 15,1	51,5 ± 16,1
			mediana	77,5^{A'}	70,0^{A'}	60,0^{B, B'}	52,0^{b, B'}
			min – max	66,0 – 91,0	55,0 – 87,0	19,0 – 74,0	19,0 – 81,0
		145	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	77,5 ± 6,8	72,3 ± 8,6	65,4 ± 11,4	59,0 ± 14,3
<i>DAZL</i>	<i>AA</i>	70	$\bar{x} \pm SD$	76,8 ± 7,3	70,5 ± 9,4	64,6 ± 12,6	57,4 ± 15,8
			mediana	77,0^{A'}	70,5^{B'}	65,0^{C'}	59,0^{D'}
			min – max	60,0 – 91,0	30,0 – 86,5	20,0 – 86,0	7,0 – 85,5
	<i>AC</i>	46	$\bar{x} \pm SD$	78,2 ± 6,2	74,3 ± 7,9	65,3 ± 11,6	58,4 ± 13,4
			mediana	79,0^{A', AA'}	74,0^{A', AA'}	66,5^{A', BB'}	59,5^{B'}
			min – max	60,0 – 89,0	55,0 – 93,0	19,0 – 84,5	19,0 – 78,5
	<i>CC</i>	30	$\bar{x} \pm SD$	78,3 ± 6,6	73,2 ± 7,0	66,8 ± 8,1	63,2 ± 11,5
			mediana	79,3^{A'}	73,8^{A'}	66,5^{B'}	65,0^{B'}
			min – max	64,0 – 93,0	58,0 – 84,5	44,0 – 80,5	39,0 – 80,5
		146	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	77,5 ± 6,8	72,3 ± 8,6	65,3 ± 11,5	58,9 ± 14,3

Cd. Tab. 14.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	22	$\bar{x} \pm SD$	77,7 ± 8,0	73,7 ± 9,4	67,3 ± 10,3	56,4 ± 15,9
			mediana	80,0^{A'}	71,8^{A'}	66,0^{B'}	60,5^{B'}
			min – max	60,0 – 91,0	58,0 – 93,0	44,0 – 84,5	11,0 – 78,0
	AG	55	$\bar{x} \pm SD$	78,1 ± 6,2	72,0 ± 8,5	64,8 ± 12,3	59,1 ± 13,9
			mediana	78,5^{A'}	74,0^{B'}	65,0^{C'}	62,0^{D'}
			min – max	63,0 – 89,5	30,0 – 86,0	19,0 – 83,5	13,0 – 80,5
	GG	68	$\bar{x} \pm SD$	77,1 ± 7,0	72,1 ± 8,5	65,1 ± 11,3	59,6 ± 14,4
			mediana	78,0^{A'}	71,8^{B'}	66,0^{C'}	59,5^{D'}
			min – max	60,0 – 93,0	51,0 – 87,0	33,0 – 86,0	7,0 – 85,5
	145	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	77,5 ± 6,8	72,3 ± 8,6	65,3 ± 11,5	58,9 ± 14,4	
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	75,8 ± 7,2	68,6 ± 11,3	60,7 ± 14,0	51,5 ± 12,1
			mediana	78,0^{A'}	73,0^{A'}	59,0	54,0^{B'}
			min – max	66,0 – 85,0	53,0 – 87,0	46,0 – 80,5	34,0 – 63,0
	CT	17	$\bar{x} \pm SD$	76,0 ± 6,7	69,3 ± 14,2	64,6 ± 15,9	58,5 ± 16,2
			mediana	75,5^{A'}	71,0^{AA'}	68,0^{B'}	62,0^{B', BB'}
			min – max	63,0 – 88,0	30,0 – 93,0	20,0 – 84,5	13,0 – 77,0
	TT	123	$\bar{x} \pm SD$	77,7 ± 6,8	72,8 ± 7,4	65,5 ± 10,7	59,2 ± 14,2
			mediana	79,0^{A'}	73,0^{B'}	65,0^{C'}	60,0^{D'}
			min – max	60,0 – 93,0	55,0 – 87,0	19,0 – 86,0	7,0 – 85,5
	145	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	77,5 ± 6,8	72,2 ± 8,6	65,2 ± 11,5	58,8 ± 14,3	

Objaśnienia: a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test U Manna-Whitneya, test Kruskala-Wallisa); A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 15. Odsetek plemników z nieuszkodzonym akrosomem ocenianym testem fluorescencyjnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia w poszczególnych grupach genetycznych

Grupa genetyczna	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
			1.	3.	5.	7.
duroc	38	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	75,4 ± 6,2 74,8^{A'} 62,0 – 86,0	69,4 ± 8,2 69,0^{B'} 51,0 – 83,0	63,9 ± 10,1 65,0^{C'} 46,0 – 81,0	57,6 ± 13,2 58,0^{D'} 7,0 – 78,0
duroc × pietrain	18	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	79,3 ± 7,4 80,3^{A'} 63,0 – 91,0	70,5 ± 13,0 70,5^{A'} 30,0 – 86,5	62,7 ± 16,1 64,5^{B'} 20,0 – 86,0	57,4 ± 18,3 58,0^{B'} 13,0 – 85,5
pbz	37	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	77,1 ± 7,2 78,0^{A'} 60,0 – 91,0	73,1 ± 7,9 73,5^{A'} 55,0 – 93,0	64,3 ± 12,2 63,0^{B'} 19,0 – 85,0	56,4 ± 13,0 55,5^{B'} 19,0 – 78,5
PIC	32	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	79,4 ± 5,8 79,8^{A'} 64,0 – 93,0	75,3 ± 6,0 75,8^{A'} 64,0 – 85,0	70,5 ± 6,9 72,0^{B'} 54,0 – 83,5	66,3 ± 9,9 67,5^{B'} 43,0 – 80,5
wbp	21	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	77,8 ± 7,4 77,5^{A'} 60,0 – 89,5	72,8 ± 8,1 72,5^{A'} 57,5 – 87,0	63,7 ± 12,2 64,5^{B'} 38,0 – 82,5	55,5 ± 17,4 53,0^{B'} 11,0 – 80,5
	146	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	77,5 ± 6,8	72,3 ± 8,6	65,3 ± 11,5	58,9 ± 14,3

Objaśnienia: A', B', C', D' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie grupy genetycznej - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 16. Odsetek plemników o wysokim transbłonowym potencjale mitochondrialnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
<i>CD9</i>	<i>AA</i>	124	$\bar{x} \pm SD$	64,3 ± 17,8	50,0 ± 21,5	41,3 ± 17,5	29,8 ± 18,9
			mediana	67,8^{a, A'}	51,0^{a, B'}	40,0^{C'}	26,5^{D'}
			min – max	4,0 – 88,5	0,0 – 82,5	4,0 – 81,5	0,0 – 70,0
	<i>AT</i>	11	$\bar{x} \pm SD$	75,6 ± 4,0	63,7 ± 10,4	47,5 ± 13,1	38,9 ± 10,1
			mediana	74,0^{b, A'}	65,0^{b, AA'}	47,0^{B'}	40,0^{B', BB'}
			min – max	71,0 – 84,0	47,0 – 76,0	26,0 – 65,0	19,0 – 56,0
		135	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	65,3 ± 17,4	51,1 ± 21,1	41,8 ± 17,2	30,5 ± 18,4
<i>DAZL</i>	<i>AA</i>	64	$\bar{x} \pm SD$	63,4 ± 17,0	51,4 ± 20,6	42,1 ± 16,6	32,7 ± 18,2
			mediana	67,0^{A'}	50,0^{B'}	40,0^{C'}	30,5^{D'}
			min – max	6,0 – 85,5	0,0 – 81,0	7,0 – 81,5	0,0 – 70,0
	<i>AC</i>	43	$\bar{x} \pm SD$	66,0 ± 17,1	50,4 ± 21,8	41,6 ± 17,2	28,2 ± 17,2
			mediana	72,0^{A', AA'}	56,5^{A', BB'}	40,0^{A', BB'}	25,0^{B'}
			min – max	11,5 – 87,0	1,0 – 82,5	4,0 – 72,5	0,0 – 57,0
	<i>CC</i>	29	$\bar{x} \pm SD$	68,4 ± 18,4	51,4 ± 21,5	41,3 ± 18,7	28,8 ± 20,4
			mediana	73,0^{A'}	56,0^{B', AA'}	40,5^{B'}	26,0^{B', BB'}
			min – max	4,0 – 88,5	4,0 – 78,0	9,5 – 74,0	0,0 – 70,0
		136	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	65,3 ± 17,3	51,1 ± 21,0	41,8 ± 17,1	30,5 ± 18,4

Cd. Tab. 16.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	20	$\bar{x} \pm SD$	66,4 ± 18,5	56,2 ± 20,9	48,5 ± 16,3	31,3 ± 17,1
			mediana	70,5^{A', AA'}	64,0^{A'}	50,0^{A', BB'}	27,3^{B'}
			min – max	18,0 – 85,5	18,0 – 82,5	15,0 – 72,0	3,0 – 61,0
	AG	49	$\bar{x} \pm SD$	66,8 ± 15,5	48,5 ± 21,8	42,1 ± 18,9	28,3 ± 21,5
			mediana	72,0^{A', AA'}	51,0^{A', BB'}	40,5^{A', BB'}	24,0^{B'}
			min – max	28,0 – 87,0	0,0 – 78,0	4,0 – 74,0	0,0 – 70,0
	GG	66	$\bar{x} \pm SD$	64,6 ± 17,7	51,9 ± 20,3	39,8 ± 15,6	32,1 ± 16,2
			mediana	68,0^{A'}	51,5^{B'}	39,5^{C'}	30,5^{D'}
			min – max	4,0 – 88,5	1,0 – 81,0	4,0 – 81,5	0,0 – 70,0
	135	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	65,6 ± 17,0	51,3 ± 21,0	41,9 ± 17,1	30,6 ± 18,3	
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	68,6 ± 7,0	44,3 ± 28,9	47,8 ± 18,9	38,1 ± 17,2
			mediana	65,0^{a'}	47,0	40,0	27,0^{b'}
			min – max	62,0 – 78,0	1,0 – 79,5	38,0 – 81,5	25,0 – 60,0
	CT	17	$\bar{x} \pm SD$	61,7 ± 14,8	46,0 ± 22,0	38,6 ± 18,5	30,6 ± 20,0
			mediana	63,0^{A'}	45,0^{B'}	38,0^{B'}	22,0^{B'}
			min – max	32,5 – 79,0	3,5 – 78,5	7,0 – 71,0	0,0 – 63,0
	TT	114	$\bar{x} \pm SD$	65,7 ± 18,0	52,1 ± 20,6	42,0 ± 16,9	30,1 ± 18,3
			mediana	71,0^{A'}	56,3^{B'}	40,3^{C'}	28,8^{D'}
			min – max	4,0 – 88,5	0,0 – 82,5	4,0 – 74,0	0,0 – 70,0
	136	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	65,3 ± 17,3	51,1 ± 21,0	41,8 ± 17,1	30,5 ± 18,4	

Objaśnienia: a, b - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania - $p \leq 0,05$ (test U Manna-Whitneya, test Kruskala-Wallisa); a', b' i A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 17. Odsetek plemników o wysokim transbłonowym potencjale mitochondrialnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia w poszczególnych grupach genetycznych

Grupa genetyczna	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
			1.	3.	5.	7.
duroc	44	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	60,4 ± 16,3 63,5^{a, A'} 6,0 – 83,0	47,7 ± 19,8 48,5^{B', AA'} 1,0 – 81,0	37,0 ± 15,6 37,0^{a, B', AA'} 9,5 – 81,5	29,3 ± 16,5 26,5^{B', BB'} 0,0 – 63,5
duroc × pietrain	12	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	77,2 ± 7,5 78,8^{b, A'} 59,0 – 85,5	61,8 ± 16,1 65,8^a 23,0 – 78,0	46,2 ± 18,7 45,5^{B'} 7,0 – 68,5	43,6 ± 17,6 44,5^{a, B'} 13,0 – 70,0
pbz	33	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	70,2 ± 11,1 72,0^{A'} 37,0 – 85,5	59,9 ± 15,7 65,0^{a, B'} 22,0 – 82,5	47,9 ± 16,1 49,0^{b, C'} 11,0 – 74,0	31,7 ± 17,5 31,0^{D'} 2,0 – 64,0
PIC	31	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	61,1 ± 22,7 67,5^{A'} 4,0 – 88,5	39,5 ± 24,5 41,0^{b, B', AA'} 0,0 – 77,0	38,5 ± 18,3 38,0^{B', AA'} 4,0 – 71,0	25,4 ± 22,0 20,0^{b, B', BB'} 0,0 – 70,0
wbp	16	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	68,2 ± 17,8 75,5^{A'} 22,0 – 82,5	56,8 ± 19,0 64,0^{AA'} 20,0 – 76,0	45,4 ± 16,5 48,5^{B'} 12,5 – 72,5	31,1 ± 14,7 30,5^{B', BB'} 7,0 – 56,0
	136	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	65,3 ± 17,3	51,1 ± 21,0	41,8 ± 17,1	30,5 ± 18,4

Objaśnienia: a, b - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami genetycznymi - $p \leq 0,05$ (test Kruskala-Wallisa); A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie grupy genetycznej - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 18. Odsetek plemników o niskim transbłonowym potencjale mitochondrialnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
<i>CD9</i>	<i>AA</i>	124	$\bar{x} \pm SD$	14,5 ± 17,6	22,7 ± 20,0	25,2 ± 16,1	29,9 ± 19,4
			mediana	7,0^{A, A'}	18,0^{A, B', AA'}	21,8^{a, B'}	27,0^{A, B', BB'}
			min – max	0,0 – 81,5	0,0 – 77,0	1,0 – 64,0	2,0 – 74,0
	<i>AT</i>	11	$\bar{x} \pm SD$	3,1 ± 3,2	7,2 ± 4,8	13,8 ± 6,8	13,4 ± 9,0
			mediana	2,5^{B, A'}	8,0^B	15,0^{b, B'}	11,0^{B, B'}
			min – max	0,0 – 10,0	0,0 – 15,0	5,0 – 24,0	3,0 – 34,5
		135	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	13,6 ± 17,2	21,5 ± 19,7	24,3 ± 15,8	28,6 ± 19,3
<i>DAZL</i>	<i>AA</i>	64	$\bar{x} \pm SD$	15,2 ± 17,5	20,5 ± 18,3	22,1 ± 13,4	24,9 ± 17,5
			mediana	8,0^{A'}	16,8^{AA'}	18,5^{B'}	21,0^{B', BB'}
			min – max	0,0 – 79,5	0,0 – 76,0	1,0 – 57,0	2,0 – 73,5
	<i>AC</i>	43	$\bar{x} \pm SD$	13,1 ± 16,2	21,6 ± 19,7	24,5 ± 16,2	28,9 ± 17,8
			mediana	7,0^{A'}	15,0^{A'}	20,0^{A'}	27,0^{B'}
			min – max	0,0 – 75,0	1,0 – 67,0	1,0 – 63,0	2,0 – 65,0
	<i>CC</i>	29	$\bar{x} \pm SD$	10,6 ± 17,9	23,0 ± 22,7	28,4 ± 19,4	36,2 ± 23,0
			mediana	4,0^{A'}	18,0^{B', AA'}	29,0^{B'}	33,0^{B', BB'}
			min – max	0,0 – 81,5	0,0 – 77,0	2,0 – 64,0	3,0 – 74,0
		136	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	13,6 ± 17,1	21,4 ± 19,6	24,2 ± 15,8	28,6 ± 19,2

Cd. Tab. 18.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	20	$\bar{x} \pm SD$	12,8 ± 16,9	18,7 ± 18,0	20,5 ± 12,8	25,6 ± 14,7
			mediana	5,5^{A'}	10,5	19,5	21,3^{B'}
			min – max	0,0 – 58,0	1,0 – 57,0	6,0 – 47,0	5,0 – 56,0
	AG	49	$\bar{x} \pm SD$	12,5 ± 15,3	22,9 ± 21,1	24,7 ± 16,3	31,9 ± 21,9
			mediana	6,0^{A'}	17,0^{B', AA'}	21,0^{B'}	29,0^{B', BB'}
			min – max	0,0 – 59,0	0,0 – 72,0	1,0 – 60,0	2,0 – 70,0
	GG	66	$\bar{x} \pm SD$	13,9 ± 17,9	20,6 ± 18,8	24,7 ± 16,3	26,9 ± 18,3
			mediana	6,8^{A'}	16,8^{B', AA'}	21,0^{B'}	25,5^{B', BB'}
			min – max	0,0 – 81,5	0,0 – 77,0	1,0 – 64,0	2,0 – 74,0
	135	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	13,2 ± 16,8	21,2 ± 19,5	24,1 ± 15,8	28,5 ± 19,3	
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	7,2 ± 9,1	27,1 ± 25,3	10,7 ± 7,6	15,4 ± 9,0
			mediana	5,0	19,0	11,0	19,0
			min – max	0,0 – 23,0	5,5 – 67,0	1,0 – 21,5	5,5 – 26,0
	CT	17	$\bar{x} \pm SD$	18,0 ± 13,6	22,5 ± 17,9	23,1 ± 14,1	25,6 ± 16,8
			mediana	15,0^{a'}	17,0	24,0	29,0^{b'}
			min – max	0,0 – 51,0	0,0 – 61,5	5,0 – 63,0	2,0 – 54,5
	TT	114	$\bar{x} \pm SD$	13,2 ± 17,8	21,0 ± 19,7	25,0 ± 16,1	29,6 ± 19,7
			mediana	5,5^{A'}	15,5^{B', AA'}	21,0^{B', BB'}	26,0^{B', BB'}
			min – max	0,0 – 81,5	0,0 – 77,0	1,0 – 64,0	2,0 – 74,0
	136	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	13,6 ± 17,1	21,4 ± 19,6	24,2 ± 15,8	28,6 ± 19,2	

Objaśnienia: a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test U Manna-Whitneya, test Kruskala-Wallisa); a', b' i A', B', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 19. Odsetek plemników z nieaktywnymi mitochondriami w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
<i>CD9</i>	AA	124	$\bar{x} \pm SD$	21,1 ± 6,7	27,3 ± 8,1	33,5 ± 9,7	40,3 ± 12,2
			mediana	20,0^{A'}	28,0^{B'}	32,0^{C'}	38,0^{a, D'}
			min – max	7,5 – 40,0	13,5 – 60,0	16,0 – 75,0	17,0 – 80,0
	AT	11	$\bar{x} \pm SD$	21,2 ± 3,2	29,1 ± 7,0	38,7 ± 9,4	47,9 ± 8,6
			mediana	21,0^{A'}	26,0^{AA'}	34,0^{B'}	46,5^{b, B', BB'}
			min – max	16,0 – 27,0	19,0 – 43,0	30,0 – 57,0	38,0 – 65,0
		135	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	21,2 ± 6,5	27,4 ± 8,0	33,9 ± 9,8	40,9 ± 12,1
<i>DAZL</i>	AA	64	$\bar{x} \pm SD$	21,3 ± 6,4	28,1 ± 8,8	35,8 ± 11,2	42,4 ± 12,7
			mediana	20,0^{A'}	28,0^{B'}	33,0^{C'}	41,0^{a, D'}
			min – max	12,0 – 40,0	15,0 – 60,0	17,5 – 75,0	23,0 – 80,0
	AC	43	$\bar{x} \pm SD$	20,8 ± 6,5	28,0 ± 7,1	33,9 ± 8,4	42,9 ± 11,4
			mediana	20,0^{A', AA'}	28,5^{A', BB'}	32,0^{A', BB'}	44,0^{A, B'}
			min – max	10,0 – 39,0	13,5 – 42,0	21,0 – 52,0	22,0 – 66,0
	CC	29	$\bar{x} \pm SD$	21,0 ± 6,7	25,6 ± 7,5	30,3 ± 7,2	34,9 ± 10,0
			mediana	21,5^{A'}	26,0^{A'}	31,0^{B'}	33,0^{b, B, B'}
			min – max	7,5 – 34,0	15,0 – 44,0	16,0 – 48,0	17,0 – 60,0
		136	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	21,1 ± 6,5	27,5 ± 8,0	34,0 ± 9,8	41,0 ± 12,1

Cd. Tab. 19.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	20	$\bar{x} \pm SD$	20,8 ± 6,7	25,2 ± 7,7	31,0 ± 8,2	43,1 ± 13,4
			mediana	21,3^{A', AA'}	24,5^{A'}	30,5^{BB'}	42,8^{B'}
			min – max	7,5 – 33,0	13,5 – 44,0	18,0 – 48,0	23,0 – 73,0
	AG	49	$\bar{x} \pm SD$	20,7 ± 5,7	28,7 ± 8,5	33,2 ± 9,8	39,7 ± 11,6
			mediana	20,0^{A'}	29,0^{B'}	32,0^{C'}	38,0^{D'}
			min – max	10,0 – 34,0	17,0 – 60,0	19,0 – 75,0	22,0 – 79,0
	GG	66	$\bar{x} \pm SD$	21,6 ± 7,0	27,4 ± 7,7	35,5 ± 10,1	41,0 ± 12,1
			mediana	20,5^{A'}	28,0^{B'}	34,5^{C'}	40,3^{D'}
			min – max	11,0 – 40,0	15,0 – 50,0	16,0 – 57,0	17,0 – 80,0
	135	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	21,1 ± 6,5	27,5 ± 8,0	34,0 ± 9,8	40,9 ± 12,1	
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	24,2 ± 8,4	28,6 ± 11,1	41,5 ± 14,3	46,5 ± 9,5
			mediana	26,0^{A'}	27,0^{B'}	46,0	47,0^{B'}
			min – max	12,0 – 33,0	15,0 – 45,0	17,5 – 53,0	33,5 – 56,0
	CT	17	$\bar{x} \pm SD$	20,4 ± 5,4	31,5 ± 10,9	38,3 ± 14,8	43,9 ± 14,4
			mediana	19,0^{A'}	29,0^{B', AA'}	33,0^{B'}	41,0^{B', BB'}
			min – max	12,5 – 33,0	18,0 – 60,0	19,0 – 75,0	25,0 – 79,0
	TT	114	$\bar{x} \pm SD$	21,1 ± 6,5	26,9 ± 7,3	33,0 ± 8,4	40,3 ± 11,8
			mediana	20,0^{A'}	26,8^{B'}	32,0^{C'}	38,5^{D'}
			min – max	7,5 – 40,0	13,5 – 44,0	16,0 – 57,0	17,0 – 80,0
	136	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	21,1 ± 6,5	27,5 ± 8,0	34,0 ± 9,8	41,0 ± 12,1	

Objaśnienia: a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test U Manna-Whitneya, test Kruskala-Wallisa); A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 20. Procentowy udział plemników ruchliwych w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
<i>CD9</i>	<i>AA</i>	142	$\bar{x} \pm SD$	91,8 ± 6,2	87,0 ± 9,0	78,0 ± 14,6	66,0 ± 20,2
			mediana	93,3^{A'}	88,4^{B'}	81,3^{C'}	69,9^{D'}
			min – max	65,5 – 99,9	54,1 – 99,6	28,0 – 99,2	18,8 – 95,8
	<i>AT</i>	12	$\bar{x} \pm SD$	91,5 ± 5,2	86,3 ± 5,3	79,3 ± 14,6	61,5 ± 21,6
			mediana	92,2^{A'}	87,1^{AA'}	83,8^{B'}	66,2^{B', BB'}
			min – max	77,8 – 97,5	78,3 – 92,2	38,6 – 92,1	19,5 – 84,8
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	91,8 ± 6,1	87,0 ± 8,7	78,1 ± 14,5	65,6 ± 20,3
<i>DAZL</i>	<i>AA</i>	73	$\bar{x} \pm SD$	90,7 ± 7,4	85,3 ± 10,6	76,6 ± 15,5	63,6 ± 20,0
			mediana	92,1^{A'}	87,4^{B'}	80,9^{C'}	67,5^{D'}
			min – max	62,4 – 99,7	45,8 – 99,6	23,8 – 99,2	12,6 – 95,5
	<i>AC</i>	50	$\bar{x} \pm SD$	92,5 ± 5,2	87,8 ± 8,1	79,2 ± 14,1	66,4 ± 20,8
			mediana	93,3^{A', AA'}	88,5^{A', AA'}	81,9^{A', BB'}	69,2^{B'}
			min – max	77,4 – 99,9	65,1 – 99,4	37,7 – 98,8	18,8 – 94,3
	<i>CC</i>	32	$\bar{x} \pm SD$	92,3 ± 6,1	88,2 ± 7,7	78,2 ± 16,0	67,5 ± 22,4
			mediana	94,2^{A'}	90,8^{B', AA'}	81,1^{B', BB'}	75,7^{B', BB'}
			min – max	71,6 – 99,2	64,0 – 97,7	34,0 – 95,6	19,0 – 95,8
		155	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	91,6 ± 6,5	86,7 ± 9,3	77,8 ± 15,1	65,3 ± 20,7

Cd. Tab. 20.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	21	$\bar{x} \pm SD$	92,2 ± 3,7	88,3 ± 5,3	80,2 ± 12,8	60,4 ± 22,7
			mediana	92,4^{A'}	87,8^{A, AA'}	83,0^{B'}	64,1^{B', BB'}
			min – max	84,4 – 99,1	77,6 – 99,1	41,8 – 96,4	20,4 – 90,5
	AG	56	$\bar{x} \pm SD$	92,2 ± 7,6	88,2 ± 11,2	79,8 ± 16,8	68,1 ± 21,8
			mediana	94,6^{A'}	91,7^{A, B'}	82,7^{C'}	72,7^{D'}
			min – max	62,4 – 99,9	45,8 – 99,6	23,8 – 99,2	12,6 – 95,8
	GG	77	$\bar{x} \pm SD$	91,0 ± 6,3	85,2 ± 8,5	75,6 ± 14,4	64,5 ± 19,4
			mediana	92,8^{A'}	86,8^{B, B'}	79,8^{C'}	67,5^{D'}
			min – max	71,6 – 99,5	61,9 – 98,6	35,0 – 95,2	18,8 – 93,4
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	91,6 ± 6,5	86,7 ± 9,3	77,8 ± 15,2	65,3 ± 20,7
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	92,5 ± 5,6	89,1 ± 5,1	85,9 ± 6,0	71,6 ± 19,6
			mediana	91,8^{A'}	87,8	83,5	67,9^{B'}
			min – max	85,7 – 98,5	83,9 – 96,7	80,3 – 93,0	47,5 – 92,5
	CT	20	$\bar{x} \pm SD$	91,7 ± 7,7	86,3 ± 11,1	76,0 ± 20,1	63,8 ± 21,6
			mediana	93,8^{A'}	87,4^{AA'}	82,7^{B'}	68,6^{B', BB'}
			min – max	62,4 – 99,9	54,1 – 99,1	28,0 – 97,6	19,8 – 95,5
	TT	129	$\bar{x} \pm SD$	91,5 ± 6,4	86,6 ± 9,2	77,6 ± 14,5	65,1 ± 20,6
			mediana	93,0^{A'}	88,4^{B'}	80,8^{C'}	69,0^{D'}
			min – max	62,4 – 99,9	45,8 – 99,6	23,8 – 99,2	12,6 – 95,8
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	91,6 ± 6,5	86,7 ± 9,3	77,7 ± 15,1	65,1 ± 20,6

Objaśnienia: A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania - $p \leq 0,01$ (test Kruskala-Willisa); A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 21. Procentowy udział plemników ruchliwych w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych grup genetycznych

Grupa genetyczna	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
			1.	3.	5.	7.
duroc	44	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	91,9 ± 6,5 93,5^{A'} 76,9 – 99,5	86,8 ± 8,4 87,4^{a, B'} 65,1 – 99,1	80,0 ± 11,9 82,3^{C'} 42,6 – 95,6	68,3 ± 19,1 72,7^{a, D'} 19,8 – 95,8
duroc × pietrain	16	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	89,4 ± 7,3 90,1^{a, A'} 65,5 – 97,5	84,5 ± 9,6 85,9^{a, AA'} 54,1 – 95,0	77,2 ± 15,3 79,2^{B'} 28,0 – 94,1	62,7 ± 17,8 61,7^{B', BB'} 20,7 – 92,9
pbz	39	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	91,0 ± 5,4 92,6^{a, A', AA'} 71,6 – 97,6	87,0 ± 7,1 85,9^{a, A', AA'} 54,1 – 95,0	77,6 ± 13,9 80,9^{A', BB'} 34,0 – 96,4	63,9 ± 20,9 69,0^{B'} 19,0 – 93,4
PIC	33	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	95,1 ± 4,4 97,1^{b, A'} 85,6 – 99,9	87,0 ± 7,1 88,4^{b, A'} 64,0 – 98,2	83,3 ± 13,0 87,8^{a, B'} 54,4 – 99,2	74,6 ± 19,2 81,2^{a, B'} 18,8 – 95,5
wbp	23	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	88,6 ± 8,1 90,8^{a, A', AA'} 62,4 – 95,9	80,5 ± 12,0 81,7^{a, A'} 45,6 – 91,7	66,3 ± 20,0 74,4^{b, A', BB'} 23,8 – 92,1	50,5 ± 19,9 48,0^{b, B'} 12,6 – 82,8
	155	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	91,6 ± 6,5	86,7 ± 9,3	77,8 ± 15,1	65,3 ± 20,7

Objaśnienia: a, b - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami genetycznymi - $p \leq 0,05$ (test Kruskala-Wallis); A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie grupy genetycznej - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 22. Procentowy udział plemników o ruchu postępowym w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
<i>CD9</i>	<i>AA</i>	142	$\bar{x} \pm SD$	78,5 ± 10,7	67,8 ± 15,0	53,6 ± 17,2	37,8 ± 19,7
			mediana	80,2^{A'}	69,6^{B'}	56,4^{C'}	34,3^{D'}
			min – max	38,2 – 92,9	22,0 – 94,7	9,9 – 86,5	0,9 – 84,3
	<i>AT</i>	12	$\bar{x} \pm SD$	79,0 ± 8,4	66,8 ± 10,3	55,1 ± 18,3	38,9 ± 20,8
			mediana	80,7^{A'}	67,9^{AA'}	54,4^{B'}	37,2^{B', BB'}
			min – max	65,5 – 90,1	44,8 – 81,7	29,8 – 80,6	9,8 – 71,8
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	78,5 ± 10,5	67,7 ± 14,6	53,7 ± 17,3	37,9 ± 19,7
<i>DAZL</i>	<i>AA</i>	73	$\bar{x} \pm SD$	76,4 ± 12,4	64,8 ± 16,4	51,4 ± 16,8	35,1 ± 17,8
			mediana	77,7^{A'}	67,5^{B'}	53,2^{C'}	32,1^{D'}
			min – max	35,9 – 92,9	17,0 – 94,7	6,3 – 83,3	0,9 – 84,3
	<i>AC</i>	50	$\bar{x} \pm SD$	80,5 ± 8,2	69,7 ± 13,3	55,0 ± 17,2	39,9 ± 22,0
			mediana	81,8^{A'}	70,9^{B'}	57,0^{C'}	35,4^{D'}
			min – max	62,5 – 92,2	29,0 – 92,5	16,2 – 86,5	2,4 – 83,2
	<i>CC</i>	32	$\bar{x} \pm SD$	78,9 ± 11,2	69,6 ± 14,3	55,3 ± 20,2	40,2 ± 20,4
			mediana	81,7^{A'}	71,0^{B'}	62,0^{C'}	40,9^{D'}
			min – max	44,2 – 91,0	38,4 – 14,3	14,8 – 81,7	5,9 – 77,9
		155	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	78,3 ± 11,1	67,4 ± 15,1	53,4 ± 17,6	37,7 ± 19,8

Cd. Tab. 22.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	21	$\bar{x} \pm SD$	82,3 ± 6,7	74,0 ± 8,3	60,4 ± 16,5	38,3 ± 21,7
			mediana	84,9^{a, A', AA'}	74,1^{A, A'}	65,7^{a, A', BB'}	40,3^{B'}
			min – max	62,5 – 90,6	55,1 – 88,2	17,4 – 80,3	2,9 – 77,0
	AG	56	$\bar{x} \pm SD$	80,0 ± 12,1	71,4 ± 16,2	56,2 ± 18,8	40,3 ± 21,4
			mediana	82,4^{a, A'}	73,7^{A, B'}	59,4^{a, C'}	36,5^{D'}
			min – max	35,9 – 92,3	17,0 – 94,7	6,3 – 86,5	5,2 – 84,3
	GG	77	$\bar{x} \pm SD$	75,8 ± 10,8	62,7 ± 14,5	49,6 ± 16,3	35,8 ± 18,1
			mediana	77,2^{b, A'}	63,7^{B, B'}	51,3^{b, C'}	33,9^{D'}
			min – max	38,2 – 92,9	24,5 – 88,4	14,8 – 82,5	0,9 – 78,8
	154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	78,2 ± 11,1	67,4 ± 15,2	53,5 ± 17,7	37,8 ± 19,8	
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	77,8 ± 9,6	72,7 ± 12,3	60,5 ± 10,6	45,6 ± 17,3
			mediana	75,0^{A'}	70,5	58,0	39,0^{B'}
			min – max	67,7 – 91,1	59,7 – 88,4	51,3 – 77,8	27,7 – 70,8
	CT	20	$\bar{x} \pm SD$	77,8 ± 12,5	65,5 ± 17,4	49,2 ± 20,7	35,7 ± 19,2
			mediana	79,1^{A'}	67,2^{A'}	53,4^{B'}	35,2^{B'}
			min – max	40,7 – 92,8	22,0 – 91,2	9,9 – 80,6	9,6 – 73,8
	TT	129	$\bar{x} \pm SD$	78,3 ± 11,0	67,4 ± 14,9	53,5 ± 17,2	37,3 ± 19,7
			mediana	81,0^{A'}	69,4^{B'}	56,5^{C'}	33,9^{D'}
			min – max	35,9 – 92,9	17,0 – 94,7	6,3 – 86,5	0,9 – 83,2
	154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	78,2 ± 11,1	67,3 ± 15,1	53,2 ± 17,5	37,4 ± 19,5	

Objaśnienia: a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test Kruskala-Wallisa); A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 23. Procentowy udział plemników o ruchu postępowym w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych grup genetycznych

Grupa genetyczna	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
			1.	3.	5.	7.
duroc	44	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	77,7 ± 9,9 77,9^{A'} 56,5 – 92,9	65,3 ± 14,3 66,0^{B'} 29,0 – 88,4	53,8 ± 13,8 54,2^{C'} 18,2 – 82,5	37,7 ± 17,1 35,1^{D'} 0,9 – 72,1
duroc × pietrain	16	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	73,8 ± 12,1 73,3^{a, A'} 40,7 – 88,7	63,6 ± 14,9 66,3^{AA'} 22,0 – 82,1	54,6 ± 18,8 55,2^{B'} 9,9 – 83,3	38,9 ± 19,8 32,9^{B', BB'} 9,6 – 84,3
pbz	39	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	79,0 ± 12,2 82,2^{A'} 38,2 – 91,0	71,6 ± 13,1 74,1^{a, B'} 24,5 – 87,9	57,3 ± 18,2 62,2^{a, C'} 14,8 – 81,7	40,9 ± 20,4 40,3^{a, D'} 5,9 – 78,8
PIC	33	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	82,7 ± 9,2 86,2^{b, A'} 62,1 – 92,8	71,8 ± 16,1 74,7^{a, B', AA'} 35,5 – 94,7	54,9 ± 18,5 60,1^{B', BB'} 15,3 – 86,5	41,7 ± 21,8 37,1^{a, B', BB'} 2,4 – 83,2
wbp	23	$\bar{x} \pm SD$ mediana min – max	74,8 ± 11,2 77,1^{a, A'} 35,9 – 86,8	60,5 ± 15,8 63,9^{b, B', AA'} 17,0 – 81,4	42,8 ± 18,5 43,1^{b, B', AA'} 6,3 – 71,8	25,5 ± 17,5 25,9^{b, B', BB'} 2,9 – 65,9
	155	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	78,3 ± 11,1	67,4 ± 15,1	56,3 ± 17,6	34,3 ± 19,8

Objaśnienia: a, b - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami genetycznymi - $p \leq 0,05$ (test Kruskala-Wallis); A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie grupy genetycznej - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 24. Prędkość krzywoliniowa (VCL, $\mu\text{m/s}$) plemników w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
CD9	AA	142	$\bar{x} \pm \text{SD}$	70,5 ± 13,4	60,8 ± 13,2	53,2 ± 14,5	47,2 ± 16,7
			mediana	71,1^{A'}	61,0^{A, B'}	51,4^{A, C'}	44,6^{A, D'}
			min – max	29,6 – 117,7	27,4 – 92,3	21,4 – 87,3	18,2 – 96,0
	AT	12	$\bar{x} \pm \text{SD}$	75,2 ± 12,7	72,9 ± 11,5	67,4 ± 12,7	65,8 ± 14,5
			mediana	78,8^{a'}	74,9^B	65,5^B	63,1^{B, b'}
			min – max	53,8 – 95,1	58,2 – 99,9	49,4 – 88,6	46,6 – 97,7
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	70,8 ± 13,4	61,7 ± 13,4	54,3 ± 14,8	48,6 ± 17,2
DAZL	AA	73	$\bar{x} \pm \text{SD}$	70,3 ± 14,5	58,2 ± 12,4	52,7 ± 14,1	45,6 ± 14,9
			mediana	69,2^{A'}	58,2^{a, B'}	49,3^{C'}	43,5^{D'}
			min – max	29,6 – 117,7	27,4 – 83,1	29,2 – 87,3	22,7 – 94,0
	AC	50	$\bar{x} \pm \text{SD}$	71,1 ± 12,1	63,8 ± 12,8	55,4 ± 14,9	49,8 ± 17,0
			mediana	72,8^{A'}	62,4^{A'}	54,9^{B'}	48,9^{B'}
			min – max	44,1 – 96,4	39,4 – 88,0	21,4 – 83,0	18,2 – 87,6
CC	32	$\bar{x} \pm \text{SD}$	71,5 ± 12,7	66,0 ± 14,9	56,5 ± 14,9	54,1 ± 20,9	
		mediana	71,5^{A'}	65,8^{b, A'}	56,9^{B'}	50,8^{B'}	
		min – max	43,0 – 95,1	37,5 – 99,9	23,4 – 88,6	19,8 – 97,7	
		155	ogólnie ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	70,8 ± 13,3	61,6 ± 13,4	54,4 ± 14,8	48,7 ± 17,2

Cd. Tab. 24.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	21	$\bar{x} \pm SD$	71,4 ± 14,5	68,8 ± 11,9	62,4 ± 13,9	57,8 ± 19,5
			mediana	69,2^{A'}	68,7^{A, A'}	62,5^A	56,8^{a, B'}
			min – max	51,1 – 97,2	49,3 – 99,9	34,9 – 88,6	28,3 – 97,7
	AG	56	$\bar{x} \pm SD$	71,2 ± 13,0	64,7 ± 13,3	57,2 ± 14,7	51,2 ± 18,6
			mediana	72,3^{A'}	62,6^{a, B', AA'}	54,3^{a, B', BB'}	49,3^{B', BB'}
			min – max	42,4 – 96,4	38,9 – 92,3	21,4 – 87,3	18,2 – 96,0
	GG	77	$\bar{x} \pm SD$	70,4 ± 13,5	57,6 ± 12,7	50,4 ± 13,7	44,7 ± 14,0
			mediana	70,2^{A'}	58,1^{B, b, B', AA'}	48,1^{B, b, B', BB'}	41,5^{b, B', BB'}
			min – max	29,6 – 117,7	27,4 – 84,9	23,4 – 83,0	19,8 – 80,2
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	70,8 ± 13,4	61,7 ± 13,4	54,5 ± 14,7	48,9 ± 17,1
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	72,5 ± 13,9	65,4 ± 7,4	48,5 ± 5,5	48,1 ± 10,6
			mediana	64,8^{A'}	65,2	47,9	47,6^{B'}
			min – max	58,7 – 87,7	56,1 – 73,1	42,8 – 54,6	38,1 – 63,2
	CT	20	$\bar{x} \pm SD$	70,9 ± 17,2	60,4 ± 11,0	49,4 ± 15,8	46,0 ± 17,2
			mediana	70,7^{A'}	57,7^{AA'}	43,8^{B'}	45,4^{B', BB'}
			min – max	42,4 – 117,7	41,7 – 81,7	29,2 – 99,9	23,9 – 80,2
	TT	129	$\bar{x} \pm SD$	70,5 ± 12,6	61,5 ± 13,9	55,1 ± 14,5	48,8 ± 17,0
			mediana	71,3^{A'}	61,6^{B'}	54,7^{C'}	45,9^{D'}
			min – max	29,6 – 97,2	27,4 – 99,9	21,4 – 88,6	18,2 – 97,7
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	70,6 ± 13,2	61,5 ± 13,3	54,1 ± 14,6	48,4 ± 16,8

Objaśnienia: a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test U Manna-Whitneya, test Kruskala-Wallisa); a', b' i A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 25. Prędkość liniowa (VSL, $\mu\text{m/s}$) plemników w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
<i>CD9</i>	AA	142	$\bar{x} \pm \text{SD}$	27,0 $\pm$ 6,5	24,9 $\pm$ 6,7	22,5 $\pm$ 7,1	20,0 $\pm$ 6,9
			mediana	26,8^{A'}	24,8^{B'}	22,4^{C'}	18,9^{D'}
			min – max	7,4 – 44,3	7,6 – 40,5	8,2 – 42,0	8,4 – 35,2
	AT	12	$\bar{x} \pm \text{SD}$	31,0 $\pm$ 6,6	28,9 $\pm$ 6,9	25,1 $\pm$ 5,8	22,2 $\pm$ 7,2
			mediana	29,0^{A'}	26,5	24,8	20,6^{B'}
			min – max	24,0 – 45,0	19,8 – 43,6	17,7 – 33,7	14,8 – 38,2
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	27,3 $\pm$ 6,6	25,2 $\pm$ 6,8	22,7 $\pm$ 7,0	20,2 $\pm$ 6,9
<i>DAZL</i>	AA	73	$\bar{x} \pm \text{SD}$	27,4 $\pm$ 6,7	25,5 $\pm$ 7,0	23,1 $\pm$ 7,5	20,7 $\pm$ 7,5
			mediana	27,3^{A'}	25,6^{B', AA'}	23,4^{B'}	20,2^{B', BB'}
			min – max	7,4 – 42,5	7,6 – 39,6	8,2 – 41,4	8,6 – 35,2
	AC	50	$\bar{x} \pm \text{SD}$	27,7 $\pm$ 6,5	24,6 $\pm$ 6,2	21,9 $\pm$ 6,1	19,6 $\pm$ 6,0
			mediana	27,3^{A'}	24,5^{B', AA'}	20,4^{B'}	18,4^{B', BB'}
			min – max	16,6 – 44,3	13,0 – 36,7	10,3 – 34,0	10,4 – 35,0
	CC	32	$\bar{x} \pm \text{SD}$	26,3 $\pm$ 6,5	25,4 $\pm$ 7,5	23,0 $\pm$ 7,5	20,0 $\pm$ 6,9
			mediana	25,6^{A', AA'}	24,8^{A'}	23,5^{A', BB'}	19,2^{B'}
			min – max	16,2 – 45,0	13,7 – 43,6	8,5 – 42,0	8,4 – 38,2
		155	ogólnie ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	27,3 $\pm$ 6,6	25,2 $\pm$ 6,8	22,7 $\pm$ 7,1	20,2 $\pm$ 6,9

Cd. Tab. 25.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	21	$\bar{x} \pm SD$	30,5 ± 6,5	28,7 ± 7,8	25,5 ± 7,6	22,1 ± 7,6
			mediana	31,3^{a, A'}	29,8^{A'}	26,0^{B'}	19,5^{B'}
			min – max	19,3 – 45,0	13,0 – 43,6	10,3 – 41,4	10,4 – 38,2
	AG	56	$\bar{x} \pm SD$	26,9 ± 6,1	25,0 ± 6,2	21,8 ± 6,3	19,0 ± 6,1
			mediana	26,6^{A', AA'}	24,5^{A', AA'}	21,3^{A', BB'}	18,4^{B'}
			min – max	16,6 – 44,3	13,5 – 40,5	10,0 – 42,0	8,6 – 35,0
	GG	77	$\bar{x} \pm SD$	26,6 ± 6,8	24,4 ± 6,8	22,6 ± 7,3	20,6 ± 7,2
			mediana	26,1^{b, A'}	24,5^{B', AA'}	22,6^{B'}	20,0^{B', BB'}
			min – max	7,4 – 42,5	7,6 – 38,3	8,2 – 36,2	8,4 – 35,2
	154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	27,3 ± 6,6	25,2 ± 6,8	22,7 ± 7,1	20,2 ± 6,9	
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	29,4 ± 8,9	26,7 ± 6,4	25,1 ± 9,1	24,1 ± 8,2
			mediana	32,4^{a'}	26,3	26,8	26,7^{b'}
			min – max	19,9 – 37,8	20,0 – 35,0	14,3 – 36,2	14,7 – 34,6
	CT	20	$\bar{x} \pm SD$	26,5 ± 6,7	24,6 ± 7,3	21,7 ± 7,7	19,4 ± 7,4
			mediana	23,8^{A'}	22,7^{AA'}	21,2^{B'}	19,8^{B', BB'}
			min – max	17,5 – 39,3	13,0 – 38,1	8,2 – 33,7	8,7 – 32,6
	TT	129	$\bar{x} \pm SD$	27,3 ± 6,5	25,2 ± 6,8	22,8 ± 6,9	20,1 ± 6,8
			mediana	27,5^{A'}	25,2^{B'}	22,6^{C'}	19,1^{D'}
			min – max	7,4 – 45,0	7,6 – 43,6	8,5 – 42,0	8,4 – 38,2
	154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	27,3 ± 6,6	25,2 ± 6,8	22,7 ± 7,1	20,2 ± 6,9	

Objaśnienia: a, b - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania - $p \leq 0,05$ (test Kruskala-Wallisa); a', b' i A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 26. Prędkość uśredniona (VAP, $\mu\text{m/s}$) plemników w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
<i>CD9</i>	AA	142	$\bar{x} \pm \text{SD}$	46,5 $\pm$ 7,1	39,9 $\pm$ 8,3	34,2 $\pm$ 8,6	29,3 $\pm$ 8,9
			mediana	47,5^{A'}	40,9^{B'}	35,7^{C'}	28,3^{D'}
			min – max	13,4 – 62,6	13,1 – 54,6	13,2 – 51,9	11,8 – 50,3
	AT	12	$\bar{x} \pm \text{SD}$	45,7 $\pm$ 7,9	42,9 $\pm$ 5,8	38,1 $\pm$ 8,0	32,8 $\pm$ 8,4
			mediana	45,7^{A'}	42,3^{A'}	37,0	30,3^{B'}
			min – max	29,8 – 61,1	34,4 – 59,1	28,2 – 51,5	23,1 – 51,7
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	46,4 $\pm$ 7,1	40,1 $\pm$ 8,1	34,5 $\pm$ 8,6	29,6 $\pm$ 8,9
<i>DAZL</i>	AA	73	$\bar{x} \pm \text{SD}$	45,7 $\pm$ 8,4	38,6 $\pm$ 8,6	33,6 $\pm$ 8,6	28,7 $\pm$ 8,6
			mediana	47,1^{A'}	40,3^{B', AA'}	34,3^{B'}	28,5^{B', BB'}
			min – max	13,4 – 58,2	13,1 – 51,7	13,2 – 51,8	12,8 – 46,0
	AC	50	$\bar{x} \pm \text{SD}$	47,5 $\pm$ 5,8	41,3 $\pm$ 7,3	35,0 $\pm$ 8,0	30,1 $\pm$ 8,6
			mediana	47,5^{A'}	42,2^{B', AA'}	36,6^{B', BB'}	27,6^{B', BB'}
			min – max	36,4 – 62,6	23,0 – 54,6	16,2 – 51,9	15,2 – 50,3
	CC	32	$\bar{x} \pm \text{SD}$	46,1 $\pm$ 6,2	41,5 $\pm$ 8,4	35,4 $\pm$ 9,6	30,7 $\pm$ 9,9
			mediana	46,0^{A'}	42,0^{A'}	35,5^{B'}	29,5^{B'}
			min – max	29,3 – 61,1	24,0 – 59,1	14,7 – 51,5	11,8 – 51,7
		155	ogólnie ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	46,3 $\pm$ 7,2	40,0 $\pm$ 8,2	34,4 $\pm$ 8,6	29,6 $\pm$ 8,9

Cd. Tab. 26.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	21	$\bar{x} \pm SD$	47,7 ± 5,5	44,7 ± 7,1	39,7 ± 8,8	32,6 ± 10,2
			mediana	46,4^{A', AA'}	45,4^{A, A'}	41,3^{a, BB'}	29,1^{B'}
			min – max	36,8 – 61,1	27,8 – 59,1	17,3 – 51,9	19,1 – 51,7
	AG	56	$\bar{x} \pm SD$	47,6 ± 7,2	42,1 ± 7,5	35,7 ± 7,7	29,9 ± 9,1
			mediana	47,8^{A'}	44,0^{A, B'}	36,1^{C'}	29,0^{D'}
			min – max	29,3 – 62,6	26,0 – 54,6	16,2 – 50,3	13,6 – 46,1
	GG	77	$\bar{x} \pm SD$	44,9 ± 7,4	37,3 ± 8,1	32,2 ± 8,5	28,6 ± 8,2
			mediana	45,9^{A'}	39,0^{B, B', AA'}	32,5^{b, B', BB'}	28,3^{B', BB;}
			min – max	13,4 – 58,2	13,1 – 51,7	13,2 – 51,8	11,8 – 46,0
	154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	46,3 ± 7,2	40,0 ± 8,2	34,5 ± 8,6	29,6 ± 8,9	
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	50,3 ± 2,7	45,1 ± 2,4	35,5 ± 4,2	34,7 ± 6,5
			mediana	50,2^{A'}	46,1	35,7^{B'}	32,0^{B'}
			min – max	47,4 – 53,8	40,9 – 46,8	29,2 – 41,1	26,7 – 42,2
	CT	20	$\bar{x} \pm SD$	46,0 ± 7,9	38,8 ± 8,2	31,8 ± 9,6	28,0 ± 9,2
			mediana	46,0^{A'}	40,2^{AA'}	33,6^{B'}	28,4^{B', BB'}
			min – max	29,3 – 58,2	26,1 – 51,5	13,2 – 50,3	12,8 – 42,5
	TT	129	$\bar{x} \pm SD$	46,2 ± 7,2	40,0 ± 8,3	34,7 ± 8,6	29,5 ± 8,9
			mediana	46,1^{A'}	40,9^{B'}	35,0^{C'}	28,1^{D'}
			min – max	13,4 – 62,6	13,1 – 59,1	14,7 – 51,9	11,8 – 51,7
	154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	46,3 ± 7,2	40,0 ± 8,2	34,4 ± 8,6	29,5 ± 8,9	

Objaśnienia: a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test Kruskala-Wallisa); A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 27. Liniowość ruchu plemników (LIN, %) w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
CD9	AA	142	$\bar{x} \pm SD$	39,9 ± 13,0	42,1 ± 12,3	43,8 ± 13,8	45,0 ± 15,3
			mediana	37,5^{A'}	41,1^{A'}	41,2	42,1^{A, B'}
			min – max	17,8 – 75,1	21,9 – 74,0	17,8 – 80,6	20,1 – 78,3
	AT	12	$\bar{x} \pm SD$	41,4 ± 6,3	40,3 ± 9,1	37,4 ± 6,3	33,4 ± 5,9
			mediana	42,8	41,2	38,0	32,4^B
			min – max	28,6 – 47,9	31,4 – 63,1	24,0 – 50,3	23,6 – 45,9
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	40,0 ± 12,6	42,0 ± 12,0	43,3 ± 13,4	44,1 ± 15,1
DAZL	AA	73	$\bar{x} \pm SD$	40,5 ± 12,8	44,6 ± 11,8	45,4 ± 15,5	47,3 ± 16,4
			mediana	38,5^{A'}	42,7^a	42,6	41,8^{B'}
			min – max	17,8 – 72,2	22,0 – 74,0	21,0 – 80,6	22,2 – 78,3
	AC	50	$\bar{x} \pm SD$	40,4 ± 12,6	39,7 ± 12,2	40,9 ± 11,4	42,4 ± 14,6
			mediana	40,5	39,0^b	38,4	36,6
			min – max	20,3 – 75,1	22,4 – 72,6	22,9 – 77,5	23,4 – 71,4
CC	32	$\bar{x} \pm SD$	38,2 ± 12,2	39,4 ± 11,2	41,5 ± 10,9	39,1 ± 10,6	
		mediana	35,1	38,9	40,3	40,2	
		min – max	20,2 – 66,5	21,9 – 60,6	17,8 – 67,2	20,1 – 68,5	
		155	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	40,0 ± 12,5	41,9 ± 12,0	43,1 ± 13,5	44,0 ± 15,0

Cd. Tab. 27.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	21	$\bar{x} \pm SD$	44,3 ± 12,9	42,2 ± 12,0	41,0 ± 10,2	40,8 ± 15,4
			mediana	41,6	42,0	42,4	35,7
			min – max	28,6 – 75,1	23,8 – 69,0	29,5 – 75,1	23,4 – 73,4
	AG	56	$\bar{x} \pm SD$	39,3 ± 12,5	39,9 ± 11,0	39,5 ± 11,8	39,4 ± 12,0
			mediana	36,5	39,1	37,9^a	38,0^a
			min – max	20,2 – 72,2	21,9 – 74,0	17,8 – 67,2	20,1 – 70,8
	GG	77	$\bar{x} \pm SD$	39,3 ± 12,5	43,4 ± 12,7	46,2 ± 14,7	48,0 ± 15,8
			mediana	38,0^{A'}	41,8^{AA'}	44,0^{b, B'}	45,9^{b, B', BB'}
			min – max	17,8 – 68,2	21,9 – 74,0	22,0 – 80,6	23,4 – 78,3
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	40,0 ± 12,6	42,0 ± 12,0	43,1 ± 13,5	43,9 ± 15,0
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	43,6 ± 19,5	41,8 ± 13,1	53,6 ± 22,9	52,9 ± 22,2
			mediana	50,0	46,9	61,8	64,6
			min – max	22,8 – 63,0	27,6 – 57,9	26,2 – 75,7	26,9 – 72,5
	CT	20	$\bar{x} \pm SD$	40,0 ± 15,1	41,6 ± 11,8	45,0 ± 15,3	44,0 ± 15,5
			mediana	36,8	45,0	40,9	38,4
			min – max	17,8 – 72,2	22,0 – 60,6	28,1 – 77,5	23,4 – 72,1
	TT	129	$\bar{x} \pm SD$	40,0 ± 11,9	42,1 ± 12,0	42,6 ± 12,6	43,8 ± 14,6
			mediana	38,5	40,8	40,2	41,5
			min – max	20,1 – 75,1	21,9 – 74,0	17,8 – 80,6	20,1 – 78,3
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	40,1 ± 12,5	42,1 ± 12,0	43,3 ± 13,4	44,1 ± 15,0

Objaśnienia: a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test U Manna-Whitneya, test Kruskala-Wallis); A', B', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 28. Prostość ruchu plemników (STR, %) w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
<i>CD9</i>	<i>AA</i>	142	$\bar{x} \pm SD$	58,3 ± 13,5	62,6 ± 11,7	65,8 ± 11,8	68,4 ± 11,6
			mediana	59,7^{A, A'}	62,9^{B'}	66,5^{C'}	68,3^{D'}
			min – max	15,3 – 89,9	38,2 – 87,5	33,3 – 91,0	38,5 – 90,1
	<i>AT</i>	12	$\bar{x} \pm SD$	67,8 ± 8,6	66,9 ± 10,4	65,8 ± 6,4	66,3 ± 7,4
			mediana	67,7^B	67,7	63,5	66,4
			min – max	52,2 – 85,7	47,5 – 86,5	55,6 – 77,8	57,1 – 80,4
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	59,1 ± 13,5	62,9 ± 11,6	65,8 ± 11,5	68,3 ± 11,3
<i>DAZL</i>	<i>AA</i>	73	$\bar{x} \pm SD$	60,2 ± 14,2	66,2 ± 10,6	68,1 ± 11,9	71,4 ± 11,2
			mediana	62,3^{A', AA'}	66,5^{a, A'}	67,5^{a, A', BB'}	71,3^{a, B'}
			min – max	15,3 – 89,9	41,1 – 87,5	43,4 – 91,0	47,9 – 90,1
	<i>AC</i>	50	$\bar{x} \pm SD$	58,6 ± 12,2	59,6 ± 12,3	62,8 ± 10,4	65,7 ± 11,5
			mediana	60,6^{A'}	58,6^{b, A'}	63,0^b	62,4^{b, B'}
			min – max	32,0 – 84,9	38,9 – 86,0	45,9 – 89,7	41,8 – 89,1
	<i>CC</i>	32	$\bar{x} \pm SD$	57,6 ± 13,7	60,9 ± 10,7	64,9 ± 11,2	65,3 ± 9,5
			mediana	57,0^{A'}	61,8	65,3^{B'}	67,5^{B'}
			min – max	34,0 – 84,0	38,2 – 80,9	33,3 – 85,5	38,5 – 82,3
		155	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	59,1 ± 13,4	63,0 ± 11,6	65,8 ± 11,5	68,3 ± 11,3

Cd. Tab. 28.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	21	$\bar{x} \pm SD$	63,8 ± 10,5	63,3 ± 11,0	63,6 ± 8,7	68,0 ± 11,2
			mediana	63,7	66,6	65,5	66,4
			min – max	44,6 – 84,9	40,9 – 80,9	47,5 – 84,9	48,6 – 87,8
	AG	56	$\bar{x} \pm SD$	57,2 ± 13,2	59,6 ± 11,3	61,0 ± 11,6	63,7 ± 10,0
			mediana	56,2 ^{A'}	58,9 ^{a, A'}	60,3 ^A	63,4 ^{A, B'}
			min – max	32,0 – 89,9	38,2 – 80,9	33,3 – 85,5	38,5 – 82,3
	GG	77	$\bar{x} \pm SD$	59,4 ± 14,1	65,5 ± 11,4	69,7 ± 10,7	71,5 ± 11,2
			mediana	61,3 ^{A'}	65,3 ^{b, AA'}	69,3 ^{B, B'}	71,0 ^{B, B', BB'}
			min – max	15,3 – 85,7	41,1 – 87,5	47,1 – 91,0	41,8 – 90,1
			154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	59,2 ± 13,4	63,0 ± 11,6	65,7 ± 11,5
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	59,0 ± 19,1	59,3 ± 14,4	69,5 ± 19,5	69,7 ± 20,0
			mediana	67,5 ^{a'}	64,3 ^{a'}	75,7 ^{b'}	81,9 ^{b'}
			min – max	37,4 – 78,1	43,4 – 76,9	48,3 – 88,1	41,8 – 86,4
	CT	20	$\bar{x} \pm SD$	57,3 ± 18,4	63,6 ± 12,0	68,1 ± 12,6	69,1 ± 12,9
			mediana	59,7 ^{a'}	65,8	68,9	67,9 ^{b'}
			min – max	15,3 – 89,9	41,1 – 81,0	43,4 – 89,7	48,6 – 89,1
	TT	129	$\bar{x} \pm SD$	59,5 ± 12,3	63,1 ± 11,4	65,4 ± 10,9	68,2 ± 10,7
			mediana	61,1 ^{A', AA'}	63,0 ^{A', BB'}	66,0 ^{A', BB'}	68,1 ^{B'}
			min – max	32,0 – 85,7	38,2 – 87,5	33,3 – 91,0	38,5 – 90,1
			154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	59,2 ± 13,4	63,1 ± 11,5	65,9 ± 11,4

Objaśnienia: a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test U Manna-Whitneya, test Kruskala-Wallis); a', b' i A', B', C', D', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 29. Oscylacja toru rzeczywistego plemników (WOB, %) w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
<i>CD9</i>	<i>AA</i>	142	$\bar{x} \pm SD$	67,1 ± 10,5	66,4 ± 10,6	65,4 ± 11,1	64,4 ± 13,9
			mediana	66,7^{a, A'}	65,6^a	65,4^A	63,4^{A, B'}
			min – max	45,2 – 90,5	43,2 – 88,9	45,3 – 88,6	35,4 – 91,9
	<i>AT</i>	12	$\bar{x} \pm SD$	61,2 ± 7,6	59,9 ± 5,8	56,7 ± 6,4	50,2 ± 4,4
			mediana	60,9^{b, A'}	58,5^{b, A'}	58,0^B	49,3^{B, B'}
			min – max	52,3 – 76,7	52,9 – 72,9	39,6 – 64,7	41,4 – 57,0
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	66,6 ± 10,4	65,9 ± 10,4	64,7 ± 11,1	63,3 ± 13,9
<i>DAZL</i>	<i>AA</i>	73	$\bar{x} \pm SD$	65,8 ± 10,3	66,6 ± 9,9	65,1 ± 12,4	64,6 ± 14,2
			mediana	66,1	66,6	64,7	62,4
			min – max	45,2 – 85,5	47,7 – 88,9	39,6 – 88,6	40,2 – 86,8
	<i>AC</i>	50	$\bar{x} \pm SD$	68,2 ± 11,4	65,6 ± 11,3	64,4 ± 10,5	63,5 ± 14,5
			mediana	65,3^{A'}	62,8	62,8^{B'}	63,6^{B'}
			min – max	46,3 – 90,5	44,5 – 86,9	46,9 – 86,9	35,4 – 91,9
	<i>CC</i>	32	$\bar{x} \pm SD$	65,4 ± 9,3	64,0 ± 10,4	63,5 ± 9,2	59,3 ± 12,1
			mediana	67,0	64,3	62,2	59,5
			min – max	46,6 – 83,9	43,2 – 84,2	48,0 – 82,4	38,7 – 83,3
		155	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	66,5 ± 10,5	65,8 ± 10,5	64,6 ± 11,2	63,2 ± 14,0

Cd. Tab. 29.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	21	$\bar{x} \pm SD$	68,4 ± 10,1	64,4 ± 8,5	63,9 ± 8,3	58,9 ± 14,6
			mediana	67,3^{A'}	61,3	62,6	56,9^{B'}
			min – max	49,3 – 88,4	50,6 – 80,7	49,6 – 88,4	40,9 – 86,8
	AG	56	$\bar{x} \pm SD$	68,2 ± 11,2	66,7 ± 11,4	64,0 ± 10,8	61,1 ± 13,7
			mediana	67,5^{A', AA'}	64,4^{A'}	63,3^{BB'}	59,5^{B'}
			min – max	46,3 – 90,5	44,5 – 87,8	41,3 – 86,5	38,7 – 91,9
	GG	77	$\bar{x} \pm SD$	64,5 ± 9,8	65,4 ± 10,4	65,0 ± 12,2	65,6 ± 13,6
			mediana	64,7	65,1	62,9	63,9
			min – max	45,2 – 89,2	43,2 – 88,9	39,6 – 88,6	35,4 ± 86,8
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	66,4 ± 10,5	65,7 ± 10,5	64,5 ± 11,2	63,1 ± 13,9
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	67,7 ± 9,5	69,4 ± 5,5	74,3 ± 13,8	73,3 ± 12,5
			mediana	64,8	71,7	81,6	78,9
			min – max	57,5 – 80,7	63,3 – 75,3	53,4 – 85,9	56,0 – 83,8
	CT	20	$\bar{x} \pm SD$	66,4 ± 9,6	64,7 ± 10,3	64,8 ± 11,2	62,3 ± 11,9
			mediana	67,7	62,0	62,9	58,2
			min – max	49,4 – 80,3	48,0 – 87,8	45,3 – 86,9	48,1 – 83,6
	TT	129	$\bar{x} \pm SD$	66,5 ± 10,8	65,9 ± 10,7	64,2 ± 11,0	63,1 ± 14,2
			mediana	65,6^{A'}	65,1^{AA'}	62,6^{B'}	62,4^{B', BB'}
			min – max	45,2 – 90,5	43,2 – 88,9	39,6 – 88,6	35,4 – 91,9
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	66,5 ± 10,5	65,8 ± 10,5	64,6 ± 11,2	63,3 ± 13,9

Objaśnienia: a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test U Manna-Whitneya); A', B', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 30. Amplituda bocznych wychyleń główki plemników (ALH, μm) w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
CD9	AA	142	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$3,6 \pm 1,2$	$3,2 \pm 1,1$	$3,0 \pm 1,1$	$2,9 \pm 1,2$
			mediana	$3,4^{a, A'}$	$3,0^{A, B', AA'}$	$2,7^{A, B', BB'}$	$2,5^{A, B', BB'}$
			min – max	1,6 – 6,9	1,6 – 6,2	1,4 – 5,7	1,5 – 5,9
	AT	12	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$4,4 \pm 1,2$	$4,4 \pm 1,0$	$4,4 \pm 1,0$	$4,5 \pm 1,0$
			mediana	$4,8^b$	$4,8^B$	$4,8^B$	$4,8^B$
			min – max	2,1 – 5,7	2,5 – 5,8	2,5 – 5,4	2,4 – 5,7
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	$3,6 \pm 1,2$	$3,3 \pm 1,2$	$3,1 \pm 1,2$	$3,1 \pm 1,3$
DAZL	AA	73	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$3,6 \pm 1,1$	$3,2 \pm 1,0$	$3,1 \pm 1,1$	$3,0 \pm 1,1$
			mediana	$3,6^{A'}$	$3,0^{B'}$	$2,9^{B'}$	$2,6^{B'}$
			min – max	1,6 – 6,1	1,7 – 5,4	1,4 – 5,8	1,5 – 5,9
	AC	50	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$3,6 \pm 1,4$	$3,4 \pm 1,3$	$3,2 \pm 1,2$	$3,1 \pm 1,3$
			mediana	$3,5^{A'}$	$3,2^{AA'}$	$2,8^{B'}$	$2,6^{B', BB'}$
			min – max	1,6 – 6,9	1,7 – 5,5	1,6 – 5,4	1,5 – 5,5
	CC	32	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$3,6 \pm 1,4$	$3,5 \pm 1,4$	$3,2 \pm 1,2$	$3,3 \pm 1,4$
mediana			$3,2^{A'}$	$3,4^{AA'}$	$3,2^{B', BB'}$	$3,3^{B'}$	
			min – max	1,8 – 6,2	1,6 – 6,2	1,6 – 5,4	1,5 – 5,7
		155	ogólnie ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	$3,6 \pm 1,2$	$3,3 \pm 1,2$	$3,2 \pm 1,2$	$3,1 \pm 1,3$

Cd. Tab. 30.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	21	$\bar{x} \pm SD$	$4,0 \pm 1,2$	$3,9 \pm 1,0$	$4,0 \pm 1,2$	$3,8 \pm 1,4$
			mediana	4,3	4,2 ^a	4,2 ^a	4,0 ^a
			min – max	2,1 – 5,6	2,1 – 5,8	1,9 – 5,7	1,8 – 5,9
	AG	56	$\bar{x} \pm SD$	$3,4 \pm 1,3$	$3,2 \pm 1,3$	$3,1 \pm 1,3$	$3,1 \pm 1,4$
			mediana	2,9 ^{A'}	2,9 ^b	2,6 ^{b, B'}	2,6 ^{B'}
			min – max	1,6 – 6,9	1,6 – 6,2	1,6 – 5,8	1,5 – 5,7
	GG	77	$\bar{x} \pm SD$	$3,7 \pm 1,2$	$3,2 \pm 1,1$	$3,0 \pm 1,0$	$2,9 \pm 1,0$
			mediana	3,0 ^{A'}	3,0 ^{b, B', AA'}	2,8 ^{b, B', BB'}	2,6 ^{b, B', BB'}
			min – max	1,7 – 6,0	1,7 – 6,0	1,4 – 5,4	1,5 – 5,5
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	$3,6 \pm 1,2$	$3,3 \pm 1,2$	$3,2 \pm 1,2$	$3,1 \pm 1,3$
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	$3,6 \pm 0,5$	$3,2 \pm 0,8$	$2,5 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,4$
			mediana	3,5 ^{a'}	3,7	2,4	2,5 ^{b'}
			min – max	3,0 – 4,2	2,3 – 3,9	2,1 – 3,0	2,1 – 3,1
	CT	20	$\bar{x} \pm SD$	$3,6 \pm 1,1$	$3,2 \pm 0,9$	$2,9 \pm 0,9$	$3,0 \pm 1,0$
			mediana	3,4 ^{a'}	3,1	2,6 ^{b'}	2,7
			min – max	2,1 – 6,1	1,7 – 5,1	2,0 – 5,1	1,9 – 5,3
	TT	129	$\bar{x} \pm SD$	$3,6 \pm 1,3$	$3,3 \pm 1,2$	$3,2 \pm 1,2$	$3,1 \pm 1,3$
			mediana	3,5 ^{A'}	3,0 ^{B', AA'}	3,0 ^{B', BB'}	2,6 ^{B', BB'}
			min – max	1,6 – 6,9	1,6 – 6,2	1,4 – 5,8	1,5 – 5,9
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	$3,6 \pm 1,2$	$3,3 \pm 1,2$	$3,2 \pm 1,2$	$3,1 \pm 1,3$

Objaśnienia: a, b i A, B - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test U Manna-Whitneya, test Kruskala-Wallisa); a', b' i A', B', AA', BB' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego odpowiednio: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 31. Częstotliwość bocznych wychyleń główki plemników (BCF, Hz) w kolejnych dniach przechowywania nasienia dla poszczególnych wariantów polimorficznych badanych genów

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
CD9	AA	142	$\bar{x} \pm SD$	$6,2 \pm 2,0$	$6,2 \pm 1,7$	$6,2 \pm 1,5$	$6,4 \pm 1,3$
			mediana	6,6	6,4	6,6	6,7
			min – max	2,9 – 11,7	3,2 – 10,3	3,6 – 10,3	3,4 – 9,7
	AT	12	$\bar{x} \pm SD$	$6,0 \pm 1,8$	$6,0 \pm 1,8$	$5,9 \pm 2,0$	$6,5 \pm 1,5$
			mediana	5,3	5,4	5,3	6,1
			min – max	4,3 – 9,8	4,5 – 10,3	4,1 – 10,6	4,8 – 9,7
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	$6,2 \pm 2,0$	$6,2 \pm 1,7$	$6,1 \pm 1,5$	$6,4 \pm 1,3$
DAZL	AA	73	$\bar{x} \pm SD$	$6,2 \pm 2,1$	$6,1 \pm 1,8$	$6,1 \pm 1,6$	$6,4 \pm 1,5$
			mediana	6,1	5,5	6,2	6,3
			min – max	3,1 – 11,7	3,5 – 10,3	3,8 – 10,6	3,7 – 9,7
	AC	50	$\bar{x} \pm SD$	$6,2 \pm 1,9$	$6,2 \pm 1,5$	$6,2 \pm 1,4$	$6,4 \pm 1,2$
			mediana	6,7	6,6	6,2	6,7
			min – max	2,9 – 11,2	3,2 – 10,3	3,7 – 9,4	3,4 – 8,7
	CC	32	$\bar{x} \pm SD$	$6,3 \pm 1,9$	$6,2 \pm 1,7$	$6,3 \pm 1,6$	$6,5 \pm 1,1$
			mediana	6,3	6,4	6,7	6,6
			min – max	3,7 – 9,9	3,8 – 10,0	3,6 – 10,3	4,7 – 9,3
		155	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	$6,2 \pm 2,0$	$6,2 \pm 1,7$	$6,1 \pm 1,5$	$6,4 \pm 1,3$

Cd. Tab. 31.

Gen	Wariant	n	Miara statystyczna	Dzień przechowywania			
				1.	3.	5.	7.
ESR2	AA	21	$\bar{x} \pm SD$	5,2 ± 1,5	5,4 ± 1,7	5,1 ± 1,3	6,2 ± 1,5
			mediana	4,6^a	4,6^a	4,5^{a, A'}	6,2^{a, B'}
			min – max	3,3 – 8,2	3,2 – 10,3	3,7 – 8,3	3,4 – 8,7
	AG	56	$\bar{x} \pm SD$	6,8 ± 1,8	6,6 ± 1,5	6,5 ± 1,3	6,8 ± 1,1
			mediana	7,3^b	6,9^b	6,9^b	6,9^b
			min – max	3,7 – 11,7	3,8 – 9,7	3,6 – 9,0	3,7 – 9,7
	GG	77	$\bar{x} \pm SD$	6,0 ± 2,2	6,0 ± 1,8	6,2 ± 1,6	6,2 ± 1,4
			mediana	5,2^a	5,5	6,1^a	6,0^a
			min – max	2,9 – 11,1	3,5 – 10,3	3,8 – 10,6	3,7 – 9,7
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	6,2 ± 2,0	6,1 ± 1,7	6,1 ± 1,5	6,4 ± 1,3
PIWIL4	CC	5	$\bar{x} \pm SD$	5,4 ± 2,5	5,3 ± 2,1	5,5 ± 1,7	5,8 ± 1,5
			mediana	3,9	4,2	4,7	5,2
			min – max	3,4 – 8,1	3,5 – 7,8	3,8 – 7,9	4,3 – 7,6
	CT	20	$\bar{x} \pm SD$	5,9 ± 1,9	6,1 ± 1,7	6,1 ± 1,4	6,2 ± 1,3
			mediana	5,2	6,1	6,1	6,2
			min – max	2,9 – 8,9	3,6 – 10,3	3,8 – 8,5	4,2 – 8,7
	TT	129	$\bar{x} \pm SD$	6,2 ± 2,0	6,2 ± 1,7	6,2 ± 1,5	6,5 ± 1,3
			mediana	6,5	5,9	6,2	6,7
			min – max	3,1 – 11,2	3,2 – 10,3	3,6 – 10,6	3,4 – 9,7
		154	ogólnie ($\bar{x} \pm SD$)	6,2 ± 2,0	6,1 ± 1,7	6,1 ± 1,5	6,4 ± 1,3

Objaśnienia: a, b - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami polimorficznymi w danym dniu przechowywania odpowiednio - $p \leq 0,05$ (test Kruskala-Wallisa); A', B' - wartości oznaczone różnymi literami wskazują różnice istotne statystycznie pomiędzy dniami przechowywania w obrębie wariantu polimorficznego - $p \leq 0,01$ (test Friedmana).

Tab. 32. Wartości współczynników korelacji rang Spearmana (r_s) między wybranymi parametrami przechowywanego nasienia

Parametr	n	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
1. ¹ Plemniki o ruchu postępowym [%]	—	—							
2. Plemniki ruchliwe [%]	725	0,81 ***	—						
3. Plemniki o ruchu postępowym [%]	725	0,86 ***	0,89 ***	—					
4. Plemniki żywe [%]	686	0,57 ***	0,57 ***	0,55 ***	—				
5. Plemniki z nieuszkodzonym akrosomem [%]	686	0,56 ***	0,54 ***	0,52 ***	0,95 ***	—			
6. Plemniki o wysokim $\Delta\Psi_m$ [%]	601-640	0,45 ***	0,31 ***	0,41 ***	0,53 ***	0,53 ***	—		
7. Plemniki o niskim $\Delta\Psi_m$ [%]	601-640	-0,20 ***	-0,06	-0,19 ***	-0,17 ***	-0,20 ***	-0,85 ***	—	
8. Plemniki z nieaktywnymi mitochondriami [%]	601-640	-0,59 ***	-0,55 ***	-0,52 ***	-0,86 ***	-0,80 ***	-0,58 ***	0,15 ***	—

Objaśnienia: ¹ procent plemników o ruchu postępowym określany na stoliku Bloma; r_s *** – wartości współczynników korelacji istotne przy $p \leq 0,001$