Kriokonserwacja nasienia królika – problemy i nowe strategie

Agnieszka Wierzchoś-Hilczer, Piotr Gogol

Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

W ostatnich latach skala praktycznego zastosowania sztucznego unasieniania (inseminacji) królików wzrasta, szczególnie w krajach Europy, w których prowadzi się intensywną hodowlę tych zwierząt. Ze względu na problemy związane z użyciem nasienia mrożonego (spadek płodności w stosunku do nasienia świeżego, stosunkowo niska liczba dawek z ejakulatu), w praktyce zabiegi unasieniania prowadzi się przy użyciu nasienia konserwowanego w stanie płynnym i przechowywanego do 36 godzin od momentu jego pobrania [27, 36]. Inseminacja przy użyciu mrożonego nasienia królika stosowana była dotychczas głównie w celach doświadczalnych. Wyniki badań wskazują, że obniżona zdolność zapładniająca kriokonserwowanego nasienia jest związana z zaburzeniami w transporcie plemników w drogach rodnych samicy, przedwczesną ich kapacytacją oraz obniżoną żywotnością. Podczas procesu kriokonserwacji plemniki narażone są na działanie szeregu szkodliwych czynników, takich jak spadek temperatury, dodatek związków osłaniających czy wzrost osmolarności medium w momencie zamrażania [49]. Istnieją jednak różnice między gatunkami w sposobie reagowania plemników na proces kriokonserwacji. Różnice te wynikają przede wszystkim z różnic w składzie błony plazmatycznej plemników, jej przepuszczalności, kształtu akrosomu, jak i długości witki [25]. Konieczne jest zatem dostosowanie składu rozrzedzalników, jak również protokołów mrożenia nasienia dla poszczególnych gatunków, ras czy nawet osobników. Do tej pory nie opracowano jednego, powszechnie przyjętego protokołu zamrażania nasienia królika. W zasadzie każdy zespół naukowy zajmujący się tym zagadnieniem używa innej metody, co bardzo utrudnia porównywanie wyników badań. Większość prac na temat mrożenia nasienia królika datuje się na lata 1970--1980, jednak w ostatnim czasie obserwuje się wyraźne zainteresowanie tym tematem.

Rozrzedzalniki i związki osłaniające

Jednym z podstawowych rozrzedzalników, często stosowanym do kriokonserwacji plemników królika, jest rozrzedzalnik oparty na bazie Tris(hydroxymethyl)aminomethane, np. Tris, kwas cytrynowy z glukozą albo z fruktozą. Gdy porównano kilka rozcieńczalników do mrożenia nasienia królika (Tris-kwas cytrynowy-fruktoza, cytrynian sodu, Illinois Variable Temperature-IVT, MIII), żaden z nich nie wykazał lepszej efektywności niż ten oparty na bazie Tris [10, 38]. Podobnie jak u większości gatunków zwierząt, żółtko jaja kurzego jest powszechnie stosowane jako składnik rozrzedzalników do zamrażania plemników królika, a jego stężenie waha się od 10% do 20% [16, 18, 44, 50]. Innym dość popularnym składnikiem rozrzedzalników, chociaż stosowanym rzadziej, jest mleko odtłuszczone o końcowym stężeniu 8-10% [34, 48].

Wyniki płodności po użyciu zamrożonego w glicerolu nasienia królika, jako jedynym krioprotektancie są na ogół niższe niż po użyciu nasienia mrożonego, ale w obecności innych związków osłaniających, takich jak glikol etylenowy, DMSO (dimetylosulfotlenek) czy amidy. W związku z tym uważa się, że glicerol nie jest odpowiedni dla nasienia królika, chociaż jest optymalnym krioprotektantem do mrożenia nasienia innych gatunków zwierząt. Niekorzystny wpływ glicerolu na zdolność zapładniającą plemników obserwowany jest jedynie w nasieniu mrożonym. Nie stwierdzono natomiast jego negatywnego oddziaływania na nasienie świeże czy też drogi rodne samicy [20, 43]. W przeciwieństwie do plemników innych gatunków zwierząt, plemniki królika charakteryzują się niskim wskaźnikiem przepuszczalności wody [13]. Ten fakt wiąże się z koniecznością zastosowania krioprotektantów o niższym niż glicerol ciężarze cząsteczkowym i wyższym wskaźniku przepuszczalności, takich jak DMSO lub amidy [13]. Część badań wskazuje, że w rozrzedzalnikach do mrożenia nasienia królika może być stosowane stosunkowo wysokie stężenie DMSO (12,4-17,5%) [17, 32, 41, 46, 47]. Z kolei inni badacze stwierdzili szkodliwe działanie DMSO na akrosom plemników [22, 28] i płodność *in vivo* [23], gdy stężenie DMSO w rozrzedzalniku przekraczało 4,5-5,0%, mimo że ruchliwość plemników wzrastała, gdy wzrastał poziom DMSO. Od 1980 roku, dzięki badaniom prowadzonym przez Hanada i Nagase [21], w procedurze mrożenia nasienia królika zostały również wykorzystane amidy. Amidy posiadają niższą masę cząsteczkową niż glicerol i powodują mniejsze uszkodzenia na skutek zmian osmotyczności w trakcie mrożenia plemników. Autorzy ci uważają, że związki zawierające grupy hydroksylowe stanowią słabszą ochronę w procesie zamrażania plemników królika niż te zawierające amidy lub grupy metylowe. Ze wszystkich testowanych krioprotektanów, takich jak amidy, alkohole, DMSO, najlepsze wyniki uzyskano po zastosowaniu lactamidu, acetamidu lub DMSO w stężeniu 1-molowym. Późniejsze badania wykazały, że zdolność zapładniająca plemników obniżała się, gdy stężenie acetamidu przekraczało 0,83 mola w końcowej mieszaninie [2]. Związki te stosowano ostatnio w kriokonserwacji plemników ogiera, uzyskując lepszą ochronę niż w przypadku glicerolu dla nasienia klasyfikowanego jako „słabo się mrożące" [1].

Badania mające na celu porównanie DMSO i acetamidu, jako krioprotektantów, nie dały rozstrzygającej odpowiedzi, który z nich jest optymalny do konserwacji nasienia królika [5, 14, 28]. Wielu autorów wybrało acetamid [6, 8, 9, 12, 14, 15, 26, 33, 35]. Powszechną praktyką stosowaną w mrożeniu nasienia królika jest używanie rozrzedzalników z dwoma związkami osłaniającymi, zwykle DMSO i glicerolem [3, 18, 38, 39, 44, 50]. Gdy DMSO występuje w połączeniu z glicerolem, poziom tego drugiego nie powinien przekraczać 1,5% [11]. Dodatek glicerolu może być jednak zbędny, ponieważ jakość nasienia (odsetek plemników ruchliwych i plemników z prawidłowym akrosomem) była niższa lub podobna, gdy stosowano rozrzedzalnik z DMSO i glicerolem w porównaniu do rozrzedzalnika zawierającego tylko DMSO [5, 22, 51], a wielkość miotu była podobna bez względu na to czy rozrzedzalnik zawierał 1% czy 0% glicerolu [50].

Analizując wyniki badań z zakresu mrożenia nasienia królika można zauważyć, że najlepsze wyniki uzyskuje się po zastosowaniu dwóch rodzajów rozrzedzalników. Jedne zawierają DMSO (w połączeniu z glicerolem lub bez glicerolu), drugie acetamid. Generalnie jakość plemników po kriokonserwacji była lepsza, gdy plemniki mrożono w rozrzedzalniku z acetamidem, niż gdy użyto mieszaniny DMSO i glicerolu [8, 14] lub rozrzedzalnika zawierającego glikol etylenowy, DMSO lub glicerol [14]. Wykazano również, że jakość nasienia po mrożeniu w rozrzedzalniku z dodatkiem żółtka jaja kurzego (jeden z nich był z DMSO, drugi z nieznanym związkiem osłaniającym) była wyższa niż nasienia mrożonego w rozrzedzalniku, który zawierał DMSO i był pozbawiony żółtka jaja [30, 42]. Niestety badania dotyczące porównania rozrzedzalników wykonywano analizując jedynie jakość nasienia po kriokonserwacji, brakuje natomiast porównania zdolności zapładniającej plemników *in vivo* zamrażanych w różnych rozrzedzalnikach.

Protokoły mrożenia nasienia

Protokoły zamrażania nasienia królika na ogół nie różnią się znacznie od stosowanych u innych gatunków zwierząt hodowlanych, np. buhajów czy knurów. Nasienie jest zazwyczaj rozcieńczane w temperaturze pokojowej w rozrzedzalniku zawierającym żółtko jaja lub odtłuszczone mleko w stosunku od 1:1 do 1:10 [2, 14, 31, 38, 52] i stałej koncentracji plemników, na poziomie 100, 75, 60, 20 lub 2 x10^6 plemników/ml [4, 17, 23, 40, 46]. Rozrzedzalniki zwykle zawierają DMSO lub acetamid. Następnie chłodzi się je powoli od temperatury pokojowej do temperatury 5°C (zazwyczaj 90 lub 120 minut, ale opisano również dłuższy lub krótszy czas chłodzenia). W protokołach, w których stosuje się DMSO lub acetamid, plemniki są schładzane i mrożone natychmiast po schłodzeniu. Jeżeli jako związku osłaniającego używa się glicerolu, dodaje się go w temperaturze 5°C, a następnie nasienie ekwilibruje w tej samej temperaturze przez około 30 minut [44, 45, 50]. Po tym czasie nasienie jest umieszczane w słomkach i mrożone.

Drastyczne obniżenie temperatury do 5°C wywołuje niekorzystne zmiany w błonach plemników różnych gatunków zwierząt. Zmiany te mogą być minimalizowane przez dodanie produktów stabilizujących błony podczas spadku temperatury (np. żółtko jaja lub odtłuszczone mleko) lub zmniejszenie tempa chłodzenia [29, 35]. Jednak w przypadku nasienia królika szybkie tempo schładzania od temperatury pokojowej do 5°C prawdopodobnie jest dopuszczalne, ze względu na specyfikę budowy błony plemnika u tego gatunku (wysoki poziom cholesterolu w stosunku do fosfolipidów). Zdolność zapładniająca plemników jest na podobnym poziomie niezależnie od tego czy proces schładzania jest powolny, czy szybki [32, 35]. Zazwyczaj obserwuje się spadek zdolności zapładniającej plemników kriokonserwowanych bez względu na to czy faza schładzania do 5°C była powolna i stosowano produkty do stabilizacji błony [35], czy też faza chłodzenia było szybka, a rozrzedzalnik nie zawierał ani żółtka jaja, ani mleka [32]. Wyniki te wskazują, że to nie szok termiczny jest głównym problemem przy mrożeniu nasienia królika (przynajmniej w sytuacji, gdy rozrzedzalnik zawiera DMSO), jak również pokazują, że można skrócić protokoły kriokonserwacji plemników u tego gatunku.

Jakość nasienia kriokonserwowanego można poprawić, jeśli zastosuje się odpowiednie tempo zamrażania (freezing rate). Korzyści może przynieść zastosowanie procesu posiewania (seeding). Posiewanie polega na tworzeniu kryształów lodu poprzez punktowe obniżanie temperatury do –7°C, co ma na celu zwiększenie odwodnienia komórek poprzez krystalizację wody z obszaru wewnątrzkomórkowego na zewnątrz komórki. Jest ono zwykle wykonywane w protokołach do zamrażania zarodków, aby uniknąć negatywnych skutków przechłodzenia. Zjawisko to obserwowano również w procesie kriokonserwacji nasienia [7]. Wprowadzenie posiewania ma na celu zmniejszenie szoku osmotycznego i termicznego komórek. Jakość nasienia królika po kriokonserwacji poprawia się, gdy proces mrożenia obejmuje etap posiewania [6]. Ponad 66% ruchliwych plemników uzyskano po rozmrożeniu, gdy w celu uniknięcia przechłodzenia stosowano posiewanie mechaniczne w temperaturze –6°C. Słomki zamrażano w tempie 15°C/min od –6 do –100°C, a rozmrażanie przeprowadzano w łaźni wodnej w temperaturze 25°C przez 1 minutę. Gdy mrożenie odbywało się z pominięciem posiewania uzyskano ok. 47% ruchliwych plemników. W większości protokołów rozmrażanie nasienia prowadzi się w łaźni wodnej w temperaturze 37--39°C. Jednak w niektórych procedurach rozmrażanie odbywa się w temperaturach wyższych, np. 50°C przez 12 s dla 0,5 ml słomek [30]. Chen i Foote [6] porównali różne tempo rozmrażania 0,5 ml słomek (25°C/1 min w porównaniu z 45°C/30 s lub 65°C/7 s) i zaobserwowali znaczną poprawę jakości nasienia, gdy rozmrażanie następowało powoli. Moce i wsp. [31] porównali dwa tempa rozmrażania 0,5 ml słomek (50 lub 70°C przez 10-12 s) i w obydwu przypadkach uzyskali podobną płodność (67% i 68%), natomiast plenność była wyższa, gdy plemniki rozmrażano w temperaturze 50°C (7,1 urodzonych) niż gdy rozmrażanie następowało w temperaturze 70°C (5 urodzonych) .

Strategie na przyszłość

W ostatnim czasie opracowano kilka metod i strategii konserwacji nasienia, w celu poprawy wyników mrożenia nasienia królików. Niektórzy autorzy próbowali podnieść jakość nasienia konserwowanego, aby tym samym poprawić skuteczność inseminacji wykonywanej takim nasieniem. Inni wprowadzili kilka dodatków do rozrzedzalników lub próbowali modyfikować technikę inseminacji, stosując np. inseminację domaciczną.

Jak już wcześniej wspomniano, kriokonserwacja nasienia powoduje znaczne obniżenie przeżywalności plemników oraz zaburza funkcjonowanie plemników *in vitro* i *in vivo* [25]. Taka obserwacja nasunęła wniosek, iż należy inseminację wykonywać w czasie wystąpienia owulacji, jak również, że nasienie powinno być deponowane głęboko w drogach rodnych samicy. Taka technika (inseminacja domaciczna lub do jajowodu) mogłaby być zastosowana, aby nasienie znalazło się jak najbliżej oocytu. Jednak u królików, z powodu specyficznej budowy dróg rodnych, jest to trudne do wykonania (standardowo nasienie jest deponowane głęboko w pochwie, blisko szyjki macicy). Wykonywanie inseminacji mrożonym nasieniem przy odpowiedniej synchronizacji samicy jest strategią szeroko stosowaną u wielu gatunków zwierząt. Jest to również jedna ze strategii bardzo często stosowanych w celu poprawy płodności kriokonserwowanego nasienia królika. Ponieważ jednak opisane techniki są bardzo pracochłonne i wiążą się ze zbyt dużymi kosztami, nie są wykonywane na dużą skalę, lecz tylko w warunkach doświadczalnych.

W celu poprawy jakości nasienia po rozmrożeniu przeprowadza się selektywny wybór ejakulatów do kriokonserwacji. Roca i wsp. [37] zaobserwowali, że zmienność i podatność nasienia na kriokonserwację w dużej mierze zależy od doboru samca. Mimo iż korelacje pomiędzy jakością nasienia *in vitro* oraz zdolnością plemników do zapłodnienia nie są zazwyczaj duże [19], to dalsze badania nad selekcją odpowiednich ejakulatów przeznaczonych do mrożenia byłyby wskazane. W przypadku królików taki dobór samców może być realizowany, gdy mamy do czynienia z dużą populacją osobników. Gdy jednak dotyczy to małych populacji, np. gatunków zagrożonych lub zwierząt szczególnie wartościowych, takie rozwiązanie nie jest brane pod uwagę. Dlatego też należy stosować alternatywne strategie w przypadkach, gdy niezwykle ważne jest zachowanie zmienności genetycznej. Dotychczas podjęto wiele starań w celu optymalizacji rozrzedzalników oraz protokołów kriokonserwacji plemników królika. Należy jednak przeprowadzić badania w celu opracowania nowych, mniej inwazyjnych metod, które pozwoliłyby wykorzystać większą liczbę samców. Poza tym bardzo ważne jest, aby utrzymać jakość plemników po rozmrożeniu poprzez poprawę protokołu kriokonserwacji, tj. zmodyfikowanie już stosowanych lub dodanie nowych składników, które pozwolą na dłuższe zachowanie funkcji zapładniającej plemników po rozmrożeniu. Jak już wspomniano, jeden protokół zamrażania nasienia nie jest optymalny dla wszystkich samców. Hernandez i wsp. [24] zauważyli, że niska jakość nasienia niektórych samców knurów, poddanego kriokonserwacji z użyciem wybranego rozrzedzalnika i protokołu, ulegała poprawie po zastosowaniu innego rozrzedzalnika i niewielkiej korekcie protokołu. Dlatego też powinno się stosować protokoły mrożenia nasienia odpowiednie dla poszczególnych samców, a nie całej populacji. Jest to jednak dość skomplikowane i może utrudnić, zamiast ułatwić, mrożenie nasienia w stacjach unasieniania.

Wyniki inseminacji nasieniem mrożonym zależą także od samej techniki inseminacji. Należy więc skupić się na poprawie wydajności tej techniki. Inne działania powinny polegać na sprawdzeniu jakości nasienia *in vitro* oraz na skorelowaniu tych wyników z wynikami uzyskanymi *in vivo.* Konieczne jest również zastosowanie nowoczesnych badań w celu ustalenia podstawowych różnic między nasieniem samców pod kątem wrażliwości na zamrażanie (kriowrażliwe, krioodporne).

Zastosowanie mrożonego nasienia królika na większą skalę (gospodarstwa hodowlane, stacje inseminacyjne) zależy od wielu czynników. Dla hodowców ważne jest, aby płodność i plenność nasienia konserwowanego była zbliżona do nasienia świeżego, cena dawek inseminacyjnych nie była zbyt wysoka, nasienie pochodziło od bardzo dobrych linii genetycznych królików oraz żeby czas przeprowadzanych inseminacji nie był zbyt długi. W stacjach unasieniania natomiast produkcja nasienia konserwowanego uzależniona jest od wyników zapłodnienia, kosztów produkcji dawek inseminacyjnych oraz od liczby plemników w dawce.

Podsumowując można stwierdzić, że do kriokonserwacji nasienia królika opracowano wiele protokołów i rozrzedzalników. Większość rozrzedzalników zawiera w swoim składzie żółtko jaja kurzego oraz DMSO lub acetamid, jako krioprotektanty. W większości protokołów stosuje się powolne chłodzenie do temperatury 5°C, natomiast zamrażanie jest wykonywane z różną szybkością. Rozmrażanie prowadzi się w łaźni wodnej w temperaturze 37°C lub w wyższej. Obecnie wyniki uzyskiwane po inseminacji nasieniem mrożonym nie pozwalają na jego komercyjne zastosowanie, ze względu na spadek płodności i plenności w porównaniu do nasienia świeżego oraz wysokie koszty produkcji. Natomiast mogą już spełnić oczekiwania zainteresowanych tworzeniem rezerwy zasobów genetycznych.

Literatura: 1. Alvarenga M.A., Papa F.O., Landim-Alvarenga F.C., Medeiros A.S.L., 2005 – Anim. Reprod. Sci. 89,105-113. **2. Arriola J., Foote R.H.**, 2001 – J. Androl. 22, 458-463. **3. Bamba K., Adams C.E.**, 1990 – Laboratory

Animals 24, 172-174. **4. Bolis S., Castrovilli C., Gottardi L.**, 1998 – Rivista di Coniglicoltura 6, 30-32. **5. Castellini C., Battaglini M., Lattaioli P.**, 1992 – J. Applied Rabbit Research 15, 431-438. **6. Chen Y., Foote R.H.**, 1994 – Anim. Rep. Sci. 35, 131-143. **7. Chen Y., Foote R.H., Tobback C., Zhang L., Hough S.**, 1993 – J. Dairy Sci. 76, 1028-1034. **8. Chen Y., Yang X., Foote R.H.**, 1989 – Anim. Rep. Sci. 18, 35-41. **9. Chen Y., Li J., Simkin M.E., Yang X., Foote R.H.**, 1989 – Biol. Rep. 41, 848-853. **10. Cortell C., Viudes de Castro M.P.**, 2008 – 9th World Rabbit Congress. (Ed.) Xiccato G., pp. 327--332. **11. Costantini F**., 1989 – Rivista di Coniglicoltura 4, 14-18. **12. Courtens J.L.**, 1995 – Cuniculture 123, 101-102. **13. Curry M.R., Redding B.J., Watson P.F.**, 1995 – Cryobiology 32, 175-181. **14. Dalimata A.M., Graham J.K.**, 1997 – Theriogenology 48, 831-841. **15. Fargeas E.**, 1995 – Cuniculture123, 103-106. **16. Fox R.R.**, 1961 – Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 108, 663-665. **17. Gogol P.**, 1999 – Annals Anim. Sci. 26, 85-92. **18. Götze V.G., Paufler S.**, 1976 – Zuchthyg. 11, 169-174. **19. Graham J.K., Moce E.**, 2005 – Theriogenology 64, 492-504. **20. Griffin J.F.T., Hartigan P.J., McGilligan C.A., Nunn W.R.**, 1974 – Theriogenology 1, 51-54. **21. Hanada A., Nagase H.**, 1980 – J. Reprod. Fertility 60, 247-252. **22. Hellemann C., Krause D., Weitze K.F**., 1979 – Archiv. Med. Vet. 11, 27-31**. 23. Hellemann C., Krause D., Weitze K.F.**, 1979 – Archiv. Med. Vet. 11, 32-36. **24. Hernandez M., Roca J., Gil M.A., Vazquez J.M., Martinez E.A.**, 2007 – Theriogenology 67, 1436-1445. **25. Holt W.V.**, 2000 – Theriogenology 53, 47-58. **26. Iaffaldano N., Di Iorio M., Rosato M.P.**, 2012 – Theriogenology 78(6), 1381-1389. **27. López-Gatius F., Sances G., Sancho M., Yániz J., Santolaria P., Gutiérrez R., Nunez M., Nunez J., Soler C.**, 2005 – Theriogenology 64, 252-260. **28. Martín-Bilbao M.**, 1993 – V Jornadas sobre Producción Animal. ITEA. 12 (Suppl. II), 486-488. **29. Mocé E., Lavara R., Vicente J.**, 2010 – Rep. Domestic Animal 45(5), 1-7. **30. Mocé E., Lavara R., Vicente J.S.**, 2003 – Anim. Rep. Sci. 75, 107-118. **31. Mocé E., Vicente J.S., Lavara R.**, 2003 – Theriogenology 60, 115-123. **32. Mocé E., Vicente J.S.**, 2002 – Rep. Nutr. Dev. 42, 189-196. **33. Moriya T.**, 1996 – Experimental Anim. 45, 403-404. **34. O'Shea T., Wales R.G.**, 1969 – Australian J. Biol. Sci. 22, 709-719. **35. Parrish J.J., Foote R.H.**, 1986 – Biol. Rep. 35, 253-257. **36. Roca J., Martínez S., Vázquez J.M., Lucas X., Parrilla I., Martínez E.A.**, 2000 – Anim. Rep. Sci. 64, 103-112. **37. Roca J., Hernandez M., Carvajal G., Vazquez J.M., Martinez E.A.**, 2006 – J. Anim. Sci. 84, 2692-2699. **38. Rohloff D., Laiblin C.**, 1976 – Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift 89, 181-183. **39. Rosato M.P., Iaffaldano N.**, 2013 – Theriogenology 79(3), 508-516. **40. Samouilidis S., Saoulidis K., Foukos A., Ypsilantis P., Demertzis A., Sbiraki A.P.**, 2001 – J. Hellenic Vet. Med. Soc. 52, 299-302. **41. Sawada Y., Chang M.C.**, 1964 – Fertil. Steril. 15, 222-229. **42. Si W., Hildebrandt T.B., Reid C., Krieg R., Ji W., Fassbender M., Hermes R.**, 2006 – Theriogenology 65, 788-798. **43. Smith A.U., Polge C.**, 1950 – Nature 166, 668-669. **44. Stranzinger G.F., Maurer R.R., Paufler S.K.**, 1971 – J. Rep. Fertility 24, 111--113. **45. Theau, M., Roustan A.**, 1982 – 3èmes Journees de la Recherche Cunicole. Communication no. 19, 19-1–19-15. **46. Vicente J.S., Viudes de Castro M.P.**, 1996 – Rep. Nutr. Develop. 36, 485-492. **47. Viudes de Castro M.P., Vicente J.S.**, 1996 – Anim. Rep. Sci. 44, 195-201. **48. Wales R.G., O'Shea T.**, 1968 – Australian J. Biol. Sci. 21, 831-833. **49. Watson P.F.**, 2000 – Anim. Rep. Sci 60-61, 481-492. **50. Weitze K.F., Helleman, C., Krause, D.**, 1976 – Proc. 8th Intl. Congr. Anim. Reprod. A.I. (Eds. Tischner J., Pilch J.), vol. 4, pp. 1100-1103. **51. Weitze K.F., Scharnhölz A., Hellemann C.**, 1983 – Zuchthyg. 18, 67-70. **52. Zhang G.X., Li X.J., Yang P., Liu Y.**, 2001 – J. Northeast Agricult. Univ. 8, 30-36.

Ostropest plamisty w żywieniu zwierząt

Eugeniusz R. Grela, Krzysztof Pietrzak, Stanisław Pecka, Sandra Sobolewska, Wacław Krasucki

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Ostropest plamisty (*Silybum marianum* L. Gaertn.) jest rośliną jednoroczną z rodziny astrowatych (*Asteraceae*), do której należą również ostrożeń lancetowaty (*Cirsiumvulgare)* i karczoch zwyczajny (*Cynarascolymus*). Ostropest plamisty wyrasta na wysokość 70-170 cm, kwiaty osiągają średnicę 5 cm i charakteryzują się czerwono-purpurową barwą (fot.). Owocem tej rośliny jest niełupka (łac. *achaenium*). Jest to owoc suchy, niepękający, o skórzastej owocni, z pojedynczym nasieniem. Niełupki są stosunkowo duże – MTN (masa tysiąca nasion) wynosi 25-33 g. Okres wegetacji odmian uprawianych na terenie Polski trwa około 95 dni. Termin siewu przypada w pierwszej połowie kwietnia, natomiast zbiór odbywa się w lipcu lub sierpniu, w zależności od warunków atmosferycznych [2, 9]. Jako roślina uprawna oraz chwast upraw polowych, ostropest plamisty występuje w wielu krajach Europy, Afryki Północnej, Ameryki Północnej i Południowej, Środkowej i Zachodniej Azji oraz Południowej Australii [1]. Jest to jedna z najstarszych i najdokładniej zbadanych roślin wykorzystywanych w leczeniu chorób wątroby. Jako roślina lecznicza ostropest plamisty jest stosowany od ponad 2000 lat [7, 9] w żywieniu ludzi i zwierząt.

Owoce ostropestu charakteryzują się wysoką zawartością białka ogólnego, wynoszącą 22 ±1,5% (tab. 1). Podobne wartości (ok. 23%) podają Khan i wsp. [8], natomiast znacznie niższy poziom białka (16%) odnotowała Sadowska [10]. Aminokwasem limitującym (tab. 2) jest tryptofan (0,79 g/100 g białka), a dominuje kwas glutaminowy (15,52 g/100 g białka). Z aminokwasów egzogennych na uwagę zasługuje zawartość lizyny (4,81 g/100 g białka) oraz metioniny i cysteiny (tab. 2). Podobne wartości podaje Sadowska [10]. Wysoki indeks aminokwasów egzogennych (EAAI

Fot. Kwiatostan ostropestu plamistego

= 60,32) wskazuje na wysoką wartość biologiczną białka owoców ostropestu. Znaczna ilość tłuszczu surowego w owocach ostropestu – prawie 25% (tab. 1) oraz białka ogólnego czynią go rośliną białkowo-tłuszczową, zbliżoną zawartością tłuszczu do nasion soi (20%), a pod względem poziomu białka ogólnego do lnu (23%). Tłuszcz owoców ostropestu plamistego cechuje się interesującym składem kwasów tłuszczowych (tab. 2), wśród których dominuje kwas linolowy oraz oleinowy. Podobny zakres i skład podawany jest również przez innych autorów [8, 10]. Uwagę zwraca stosunkowo niski udział kwasów z rodziny *n-3*, gdyż proporcja kwasów *n-6* do *n-3* wynosi ponad 160 (tab. 2). Owoce ostropestu są bogatym źródłem składników mineralnych (tab. 1). Na szczególne podkreślenie zasługuje wysoka zawartość fosforu i potasu