Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (6), 74-83 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Изменение на някои показатели на спермопродукцията в зависимост от концентрацията на сперматозоидите в еякулати от нерези

Ивелина Запрянова*, Радка Малинова

Аграрен университет, бул. Менделеев 12, 4000 Пловдив
**E-mail: ivelina_z@abv.bg*

Change of some parameters of sperm production according to sperm concentration in boar ejaculates

Ivelina Zapryanova*, Radka Malinova

Agricultural University, 12 Mendeleev Blvd., 4000 Plovdiv, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Целта на проучването беше да се проследи в динамика изменението на някои показатели на спермопродукцията в зависимост от концентрацията на сперматозоиди в еякулати от нерези (Large White x Pietrain). Животните бяха разделени в три групи спрямо концентрацията на сперматозоидите в еякулат (до 400 x10^6 sperm/cm^3; от 400 до 500 x10^6 sperm/cm^3, и над 500 x10^6 sperm/cm^3). Групата, в която попадат индивидите в зависимост от концентрацията на сперматозоидите оказва значително влияние върху концентрацията и общата концентрация ($p<0.001$), както и върху броя дози от един еякулат, и процента мъртви сперматозоиди $p<0.05$). Най-малък брой дози за осеменяване в условията на нашия експеримент са се получили от еякулатите от втори клас, следвани от първи, а най-голям – от еякулатите от нерези, принадлежащи към трети клас. Аглутинираните сперматозоиди се увеличават с нарастване на концентрацията от 6.3 до 6.77%, но при трета група рязко намаляват, където достигат минимума си от 6.15%. При мъртвите

SUMMARY

The aim of the study was to follow the change of some semen parameters according to sperm concentration in boar ejaculates. The animals (Large White x Pietrain) was divided in three groups according to ejaculates concentration (to 400x10^6 sperm/cm^3; from 400 to 500 x10^6 sperm/cm^3, and over 500 x10^6 sperm/cm^3). The group in which the individual belongs according to sperm concentration has significant influence on the sperm concentration and the total concentration ($p<0.001$), as well as on the number of doses from one ejaculate, and on the percentage of dead sperms ($p<0.05$). The least number of insemination doses under the conditions of our experiment were obtained from the ejaculates from class two, followed by class one, as the greatest number insemination doses of ejaculates comes from the boars belonging to class three. The percentage of agglutinated spermatozoa increase with the increased concentration from 6.3 to 6.77%, but they sharply reduce in group three, where they reach their minimum of 6.15%. With dead spermatozoa, the increased concentration

сперматозоиди се наблюдава тенденция към намаляването им с увеличаване на концентрацията, като разликите са в границите от 0.38 % между II и III група, до 0.86% между I и III група. Проведеният клъстерен анализ на база основни показатели на спермопродукцията при нерезите може да се използва като допълващ метод, повишаващ ефективността на преценката на разплодниците.

Ключови думи: репродукция, сперма, нерези, клъстерен анализ, концентрация на сперматозоиди, аглутинирани и мъртви сперматозоиди, брой дози от еякулат

tends to result in decreased number, as the differences are within the range of 0.38 % between group II and III and up to 0.86% between group I and III.

The performed cluster analysis based on main indicators of sperm production of boars may be used as an additional method increasing the efficiency of evaluating breeding boars.

Key words: reproduction, sperm, boars, cluster analysis, concentration, agglutinated and dead spermatozoa, insemination doses

УВОД

Навлизането на изкуственото осеменяване е оказало съществено влияние върху генетичното подобрение в свиневъдството през последните няколко десетилетия. Въпреки това, ефективността на производството до голяма степен зависи от репродуктивната способност на мъжките разплодници, защото не всички нерези и техните еякулати са с еднаква оплодителна способност. Това изисква преди използването им за изкуствено осеменяване еякулатите да се подложат на стандартен спермален анализ (Dyck et al., 2011). Рутинната преценка на спермата обикновено включва определяне на обем, концентрация, процент на прогресивно движещи се и морфологично нормални сперматозоиди (Amann et al., 1995). Въпреки, че някои от посочените параметри се свързват с фертилитета на разплодниците, други автори предполагат, че тази информация не е достатъчна, за да се предвиди дали нерезите имат висока оплодителна способност (Correa et al., 1997). Плодовитостта при мъжките разплодници зависи от качеството на гаметите, което може да бъде установено чрез морфологично изследване на спермата. Според Kondracki et al. (2011) концентрацията на сперматозоидите в еякулат повлиява морфологичните характеристи-

INTRODUCTION

In the past few decades, the introduction of artificial insemination has had great influence on the genetic improvement in pig farming.

Despite that, the efficiency of production largely depends on the reproduction abilities of the breeding boars as not all boars and their ejaculates have equal fertilization abilities. That is why the ejaculates are to undergo a standard sperm analysis before they are used for artificial insemination (Dyck et al., 2011).

The routine sperm evaluation usually includes definition of the volume, concentration, and percentage of progressively motile spermatozoa and morphologically normal sperms (Amann et al., 1995). Although some of the defined parameters are connected to the fertility of breeding boars, other authors suppose that this information is not sufficient to predict whether the boars have high fertilization ability (Correa et al., 1997).

The fertility in breeding boars depends on the quality of gametes, which can be established with a sperm morphology analysis. According to Kondracki et al. (2011), the concentration of sperm in an ejaculate influences the morphological characteristics of cells, but not their

ка на клетките, но не и тяхната форма.

Всичко това ни даде основание да проследим изменението при някои показатели на спермата в зависимост от концентрацията на сперматозоидите в еякулати от нерези.

shape.

All this gave us a reason to follow the change of some semen parameters according to sperm concentration in boar ejaculates.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването включва общо 249 еякулата, получени през периода януари 2011-май 2014 г., добити от 11 разплодни нереза (Large White x Pietrain), отглеждани в свинеферма, намираща се в района около град Пловдив. Животните бяха разделени в три групи спрямо концентрацията на сперматозоидите в еякулата (до 400 x10^6 sperm/cm^3 (n=73); от 400 до 500 x10^6 sperm/cm^3 (n=111), и над 500 x10^6 sperm/cm^3 (n=65), и спрямо възрастта при получаване на еякулатите (до 12, от 12 до 24, и над 36 месечна възраст).

Еякулатите бяха получени по метода на двойната ръкавица, събирани в градуирана спермосъбирателна чаша, покрита със стерилна марля. Веднага след получаването и филтрирането материалът се преценяваше по количествени и качествени показатели, включващи:

– обем на еякулата (cm^3);

– концентрация на сперматозоидите (x10^6 sperm/cm^3), измерена в спермодензитометър;

– подвижност (%), определена по рутинен начин под микроскоп със стандартно увеличение (Nikolov et al., 2012);

– Аглутинирани и мъртви сперматозоиди (%) – определена по рутинен начин под светлинен микроскоп, при увеличение x400 (Nikolov et al., 2012).

Групирането на разплодниците по основни показатели на спермопродукцията в зависимост от класа, в който попадат според концентрацията на сперматозоидите в еякулатите е направено чрез йерархичен клъстерен анализ. Използван е методът на между-груповото свързване (Ward, 1963; Dyuran and Odelly, 1977), с евклидово разстояние като мярка за сходство между групите.

MATERIAL AND METHODS

The study includes a total of 249 ejaculates, obtained in the period from January 2011 to May 2014, from 11 breeding boars (Large White x Pietrain), bred in a pig farm located in the region around the town of Plovdiv. The animals were divided in three groups according to the concentration of spermatozoa, the semen was obtained at (up to 400x10^6 sperm/cm^3 (n=73), from 400 to 500x10^6 sperm/cm^3 (n=111), and above 500x10^6 sperm/cm^3 (n=65). The animals were divided in three groups according to the age the semen was obtained at (up to 12 months, from 12 to 24 months, and above 36 months).

The ejaculates were obtained by the manual method, collected in a graduated semen-collection cup, covered with sterile gauze. Immediately after the collecting and filtering, the ejaculate was assessed for quantitative and qualitative traits, including:

– ejaculate volume (cm^3);

– sperm concentration (x10^6 sperm/cm^3), measured in a sperm densitometer;

– motility (%), determined by a routine method, under microscope with standard magnification (Nikolov et al., 2012);

– Agglutinated and dead spermatozoa (%) – deteюmined by a routine method under light microscope, with magnification x400 (Nikolov et al., 2012).

The grouping of the individuals by the main indicators of the sperm production, depending on the class in which they fall according to the sperm concentration in the ejaculates, is done by hierarchical cluster analysis. The method of between-group lincage (Ward, 1963; Dyuran and Odelly, 1977) was used with Euclidean distance as a measure of group similarity.

Клъстерният анализ и вариационно-статистическата обработка на данните бяха извършени със софтуерен продукт SPSS version 19, IBM.

Cluster analysis and variational statistical data processing were performed with SPSS version 19 software, IBM.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Нарастващата популярност на изкуственото осеменяване изисква отговарящо на нуждите количество дози за осеменяване. Изкуственото осеменяване се явява отличен инструмент за бързото внедряване на генетичния и продуктивен прогрес (Knecht et al., 2014). Качествените и количествени параметри на спермопродукцията оказват влияние върху общия брой на дозите за осеменяване и рентабилността на производство на сперма в станциите по изкуствено осеменяване (Smital et al., 2004). Идентифицирането и премахването на факторите, които променят качеството и количеството на еякулатите води до получаването на дози за осеменяване с висока стойност. Това от своя страна повишава ефективността на използване на разплодните нерези (Knecht et al., 2014).

В Таблица 1 са представени показателите на спермопродукцията при нерезите, които са обект на нашето проучване. Средният обем на еякулатите е в границите на 305.8±5.76 cm^3, с концентрация на сперматозоиди от 412.9±2.13 ($x10^6$ sperm/cm^3) и 73.05±0.23 % подвижност. По отношение на процента аглутинирани и мъртви сперматозоиди, същият е 6.41±0.16 и 8.18±0.16, съответно. Средният брой дози, които се получават от един еякулат е 17.81±0.32.

RESULTS AND DISCUSSION

The increasing popularity of artificial insemination requires that the quantity of sperm doses match the needs. Artificial inseminations seems to be an excellent instrument for the quick implementation of the genetic and production progress (Knecht et al., 2014). The quality and quantity parameters of sperm production have influence on the total number of insemination doses and the profitability of sperm production in artificial insemination stations (Smital et al., 2004). The identification and elimination of the factors which change the quality and quantity of ejaculates leads to obtaining of high-value insemination doses. This results in increased efficiency of the use of breeding boars (Knecht et al., 2014).

Table 1 shows the sperm production traits in boars, object of our study. The average volume of ejaculates is within the range of 305.8±5.76 cm^3, with sperm concentration of 412.9±2.13 ($x10^6$ sperm/cm^3) and 73.05±0.23 % progressively motile spermatozoa. Regarding the percentage of agglutinated and dead spermatozoa, the values are 6.41±0.16% and 8.18±0.16%, respectively. The average number of doses obtained from one ejaculate is 17.81±0.32.

Таблица 1. Показатели на спермопродукцията при терминални нерези
Table 1. Seminal characteristics of terminal boars

Показатели / Traits	LS	±SE	Cv, %
Обем / Volume, (cm^3)	305.8	5.76	33
Концентрация / Concentration, ($x10^6$ sperm/cm^3),	412.9	2.13	21.02
Обща концентрация / Total concentration, ($x10^9$)	121.5	2.29	30.4
Подвижност / Motility, (%)	73.05	0.23	5,13
Брой дози от еякулат / Number of insemination doses per ejaculate	17.81	0.32	28.4
Аглутинирани сперматозоиди / Agglutinated spermatozoa, (%)	6.41	0.16	37.9
Мъртви сперматозоиди / Dead spermatozoa, (%)	8.18	0.16	29.9

Проучваните от нас фактори оказват достоверно влияние върху

The factors we studied have significant influence on the analysed

анализираните показатели на спермата (Таблица 2). Групата, в която попадат индивидите в зависимост от концентрацията на сперматозоидите оказва значително влияние върху концентрацията и общата концентрация (p<0.001), както и върху броя дози от един еякулат, и процента мъртви сперматозоиди (p<0.05). Възрастта на нерезите влияе достоверно върху обема, общата концентрация и брой дози от еякулат (p<0.001), а също и върху подвижността (p<0.05), и процента мъртви сперматозоиди (p<0.01). Индивидът е достоверен източник на варирание при всичките шест изпитвани показатели (p<0.001).

semen parameters (Table 2). The group in which the individual belongs according to sperm concentration has significant influence on the sperm concentration and the total concentration (p<0.001), as well as on the number of doses from one ejaculate, and on the percentage of dead sperms (p<0.05). The age of the boars has significant influence on the volume, the total concentration, and the number of doses from an ejaculate (p<0.001), as well as on the progressive motility (p<0.05) and on the percentage of dead spermatozoa (p<0.01). The individual is a reliable source of variation in all the six studied parameters (p<0.001).

Таблица 2. Влияние на концентрацията, възрастовата група и индивида върху качеството на спермата

Table 2. The effect of the concentration, the age class and the individual on the quality of sperm

Модел / Model	Фактор / Factor ⋆	F-критерий и степен на достоверност / F-criterion and degree of reliability Признаци / Traits Обем / Volume	Концентрация Concentration	Обща концентрация Total concentration	Подвижност Motility	Брой дози от еякулат Number of insemination doses per ejaculate	Аглутинирани сперматозоиди Agglutinated spermatozoa (%)	Мъртви сперматозоиди Dead spermatozoa (%)
1	1	36.5***	738.5***	10.3***	21.4***	7.0**	1.5	2.2
2	2	15.5***	10.3***	9.1***	42.5***	9.1***	3.2**	5.3***
3	3	21.4***	8.9***	5.3**	23.7***	15.4***	0.6	18.3***
4	4	2.7*	15.0***	2.1*	1.1	3.0*	1.9	4.7**
5	- 1	0.2	309.1***	17.7***	1.3	3.9*	1.2	3.7*
	- 2	14.9***	4.2***	12.8***	27.6***	7.4***	3.9***	4.9***
	- 3	13.7***	0.4	8.6***	4.2*	9.4***	0.9	7.4**
	- 1*3	8.8***	1.3	6.4***	1.0	1.5	0.8	2.9*

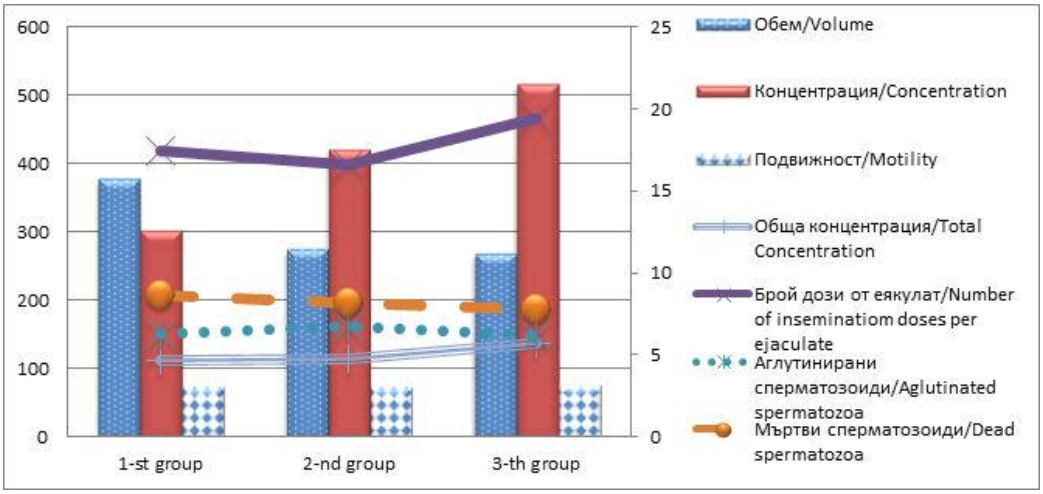
***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05

⋆Фактор / Factor: 1- Групи според концентрацията на сперматозоидите / Groups according to sperm concentration, 2-Индивид / Individual, 3- Възрастова група / Age class, 4-Сезон / Season, 1*3 - Groups according to sperm concentration* Age class

На Фигура 1 е представена динамика в показателите на спермопродукцията в зависимост от групата, в която попадат еякулатите според концентрацията на сперматозоидите в тях. Нерезите от първа група са с концентрация на сперматозоидите 302.05 x10^6 sperm/cm^3 , като при тях обемът на спермата е най-голям (376.44 cm^3), а подвижността най-ниска (p>0.05). Разликата в концентрацията на сперFigure 1 shows the dynamics in the parameters of sperm production according to the group in which ejaculates belongs according to the sperms in them. The boars from group one are with sperm concentration of 302.05 x10^6 sperm/cm^3 , as their sperm volume is greater (376.44 cm^3) and the motility is the lowest (p>0.05). The difference in sperm concentration and sperm volume are, respectively, 213.33

матозоиди и обема на спермата са съответно с 213.33 x10^6 sperm/cm^3 повече, и с 109.36 cm^3 по-малко в сравнение с еякулатите от трета група. Най-малък брой дози за осеменяване в условията на нашия експеримент са се получили от еякулатите от втори клас, следвани от първи, а най-голям – от еякулатите от нерези, принадлежащи към трети клас, с концентрация на сперматозоиди над 500x10^6 sperm/cm^3. По този показател разликата между I и II група е почти една, а между II и III група е близо три дози в полза на по-концентрираната сперма.

x10^6 sperm/cm^3 more, and 109.36 cm^3 less compared to the ejaculates in group three. The least number of insemination doses under the conditions of our experiment were obtained from the ejaculates from class two, followed by class one, as the greatest number of ejaculates comes from the boars belonging to class three, with sperm concentration of more than 500x10^6 sperm/cm^3. For this parameter, the difference between group I and II is almost one dose, and between group II and III it is nearly three doses of concentrated sperm.



Фиг. 1. Динамика в показателите на спермопродукцията в зависимост от групата, в която попадат еякулатите според концентрацията на сперматозоидите в тях

Fig 1. Dynamics of sperm production depending on the group of ejaculates, according to the sperm concentration in them

Увеличаването на концентрацията на сперматозоидите не оказва влияние върху процента на аглутинираните сперматозоиди. В условията на нашето проучване последните се увеличават с нарастване на концентрацията от 6.3 до 6.77%, но при трета група рязко намаляват, където достигат минимума си от 6.15%. При мъртвите сперматозоиди се наблюдава тенденция към намаляването им с увеличаване на концентрацията, като разликите са в границите от 0.38 % между II и III група,

The increased sperm concentration does not have influence on the percentage of agglutinated spermatozoa. Under the conditions of our study, the latter increase with the increased concentration from 6.3 to 6.77%, but they sharply reduce in group three, where they reach their minimum of 6.15%. With dead spermatozoa, the increased concentration tends to result in decreased number, as the differences are within the range of 0.38 % between group II and III and up to 0.86% between group

до 0.86% между I и III група. В свое проучване Kondracki et al. (2011) проучват ефекта на концентрацията на сперматозоидите в еякулати на нерези Дюрок върху някои морфометрични показатели на клетките. Авторите установяват, че концентрацията на сперматозоидите в еякулат не влияе нито на формата, нито на качеството на клетките. Увеличаването на концентрацията на сперматозоидите не оказва значително влияние върху тяхната подвижност или честота на сперматозоиди с морфологични аномалии. В същото проучване се прави извод, че сперматозоидите със значителни аномалии намаляват с увеличаване на концентрацията, а тези с незначителните аномалии увеличават своя процент.

Наред вариационно-статистически, с данните беше проведен и йерархичен клъстерен анализ с цел да се направи комплексна оценка на базата на основни параметри на спермопродукцията. На дендрограмата (Фигура 2) е направена клъстеризация на база признаците обем и подвижност на спермата, и концентрация на сперматозоидите, в зависимост от групата, в която попадат индивидите. От фигурата се вижда, че данните се разделят в три основни клъстера, всеки от които съдържа в себе си подклърстери. Първият подклъстер се формира от индивиди с номера 3.5, 3.6, 3.7, 3.11, както и 3.2 и 3.8, като между последните два няма различия. Всички изброени до тук индивиди принадлежат към групата с най-голяма концентрация на сперматозоиди. Вторият подклъстер включва четири животни от втора група, с междинна концентрация – 2.3, 2.11, 2.2 и 2.8. Вторият клъстер отново съдържа два по-големи подклъстера, при които индивидите отново се разделят както при вариационно-статистическата обработка. Тук между номера 2.4 и 2.7, като и между 2.9 и 2.10 също няма разлики. Всички индивиди от групата с

I and III. In study, Kondracki et al. (2011) examines the effect of the concentration of spermatozoa in the ejaculates of Duroc boars on some morphometric cell parameters. The authors established that the sperm concentration in ejaculate does not have any influence on the shape or the quality of cells.

The increased sperm concentration does not have significant influence on their motility or the rate of occurrence of spermatozoa with morphological abnormalities. The same study concludes that spermatozoa with major abnormalities decrease with the increasing concentration, and increase percentage those with minor abnormalities.

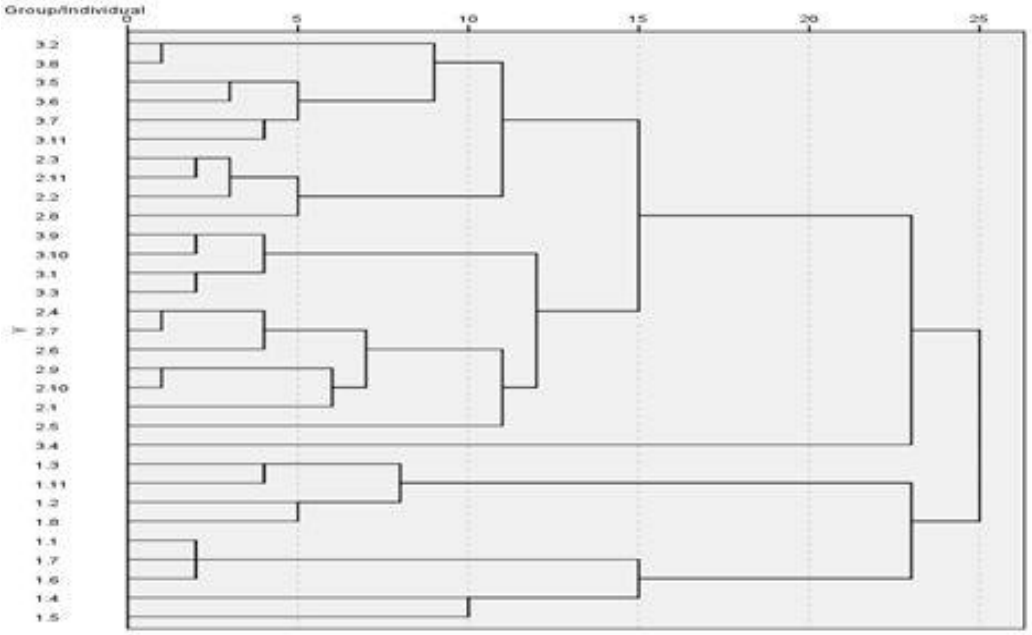
Along with the variation statistical analysis, the data were used for hierarchical cluster analysis aiming to make a complex assessment of the basis of the main parameters in sperm production. The dendrogram (Figure 2) shows clusterization based on the indications of sperm volume and motility, and sperm concentration in accordance with the group the individual fall into.

The figure shows that the data are divided in three basic clusters, each of which includes sub-clusters. The first sub-cluster is formed by individuals numbered 3.5, 3.6, 3.7, 3.11, as well as 3.2 and 3.8, as there is no difference between the last two ones. All the above-mentioned individuals belong to the group with the highest sperm concentration.

The second sub-cluster includes four animals of group two, with intermediate concentration – 2.3, 2.11, 2.2 and 2.8. The second cluster again has two bigger sub-clusters in which the in are again divided in the same way as in variation statistical processing. Here, no difference is observed between 2.4 and 2.7, and between 2.9 and 2.10 either. All individuals from the group of the

най-малка концентрация на сперматозоиди се причисляват към трети клъстер. Въпреки, че няма такава близост, както при другите подклъстери, с най-голямо сходство по показателите на спермопродукцията са номера 1.1, 1.7 и 1.6. Нерез с номер 3.4 се намира най-голямо евклидово разстояние и е отделен от останалите клъстери.

minimum sperm concentration are in the third cluster. Although there is not such similarity as with the other sub-clusters, numbers 1.1, 1.7 and 1.6 have the greatest similarity of sperm production traits. Boar number 3.4 has the greatest Euclidean distance and is separated from the other clusters.



Фиг. 2. Йерархичен клъстерен анализ в зависимост от признаците обем, подвижност и концентрация на сперматозоидите

Fig. 2. Hierarchical cluster analysis depending on the volume, motility and concentration of the sperm

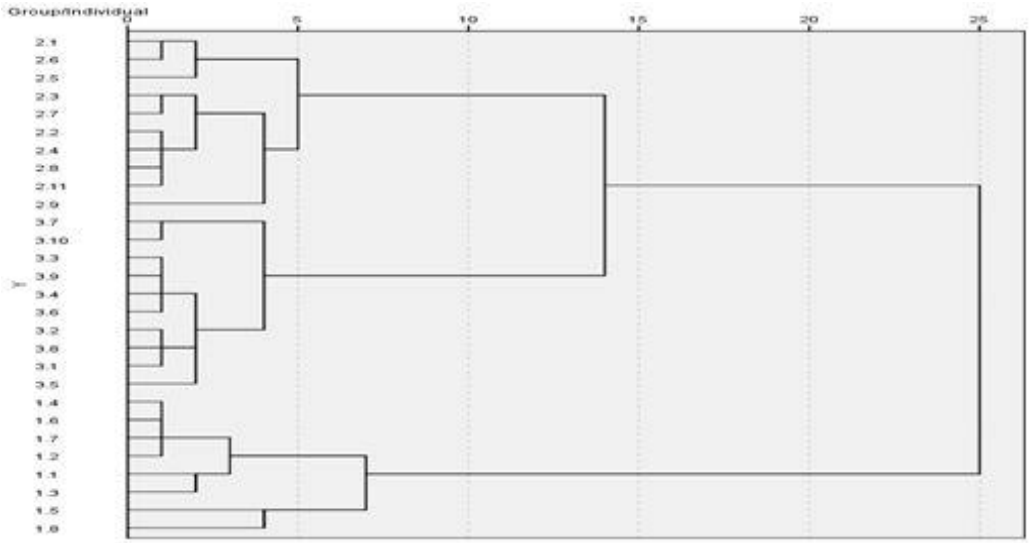
Дендрограма на базата на средните междугрупови разстояния
Dendrogram based on average between-groups linkage

При втората дендрограма сме направили опит за клъстеризация на индивидите, в зависимост от опитната група, на база концентрация, аглутинирани и мъртви сперматозоиди (Фигура 3). За разлика от Фигура 2, тук повечето от индивидите се характеризират с голяма хомогенност по проучваните признаци. Това особено се отнася за опитната трета група, животните от която формират един подклъстер. Заедно с нерезите от втора група

With the second dendrogram, we have tried to clustering the individuals according to the experimental group on the basis of concentration, agglutinated, and dead sperms (Figure 3). Unlike Figure 2, most of the individuals are characterized with greater homogeneity of the studied traits. This fact mainly refers to the third experimental group, which animals form one sub-cluster. Together with the boars of group two, they form the first big cluster. Individuals

формират първия голям клъстер. Индивиди с номера от 1.4 до 1.8 формират втория клъстер, като с най-голямо сходство са животните с номера 1.4, 1.6, 1.7 и 1.2.

numbered from 1.4 to 1.8 form the second cluster, as the greatest similarity is found between the animals numbered 1.4, 1.6, 1.7 and 1.2.



Фиг. 3. Йерархичен клъстерен анализ в зависимост от признаците концентрация на сперматозоидите, аглутинирани и мъртви сперматозоиди
Fig. 3. Hierarchical cluster analysis depending on the concentration of the sperm, agglutinated and dead spermatozoa
Дендрограма на базата на средните междугрупови разстояния
Dendrogram based on average between-groups linkage

ИЗВОДИ

Групата, в която попадат индивидите в зависимост от концентрацията на сперматозоидите оказва значително влияние върху концентрацията и общата концентрация ($p<0.001$), както и върху броя дози от един еякулат, и процента мъртви сперматозоиди ($p<0.05$). Възрастта на нерезите влияе достоверно върху обема, общата концентрация и брой дози от еякулат ($p<0.001$), а също и върху подвижността ($p<0.05$), и процента мъртви сперматозоиди ($p<0.01$). Индивидът е достоверен източник на вариране при всичките шест изпитвани показатели ($p<0.001$).

Най-малък брой дози за осеменяване в условията на нашия експеримент са се получили от еякулатите от

CONCLUSIONS

The group in which the individual belongs according to sperm concentration has significant influence on the sperm concentration and the total concentration ($p<0.001$), as well as on the number of doses from one ejaculate, and on the percentage of dead sperms ($p<0.05$). The age of the boars has significant influence on the volume, the total concentration, and the number of doses from an ejaculate ($p<0.001$), as well as on the progressive motility ($p<0.05$) and on the percentage of dead spermatozoa ($p<0.01$). The individual is a reliable source of variation in all the six studied parameters ($p<0.001$).

The least number of insemination doses under the conditions of our experiment were obtained from the

втори клас, следвани от първи, а най-голям – от еякулатите от нерези, принадлежащи към трети клас, с концентрация на сперматозоиди над 500 x10^6 sperm/cm^3

Аглутинираните сперматозоиди се увеличават с нарастване на концентрацията от 6.3 до 6.77%, но при трета група рязко намаляват, където достигат минимума си от 6.15%.

При мъртвите сперматозоиди се наблюдава тенденция към намаляването им с увеличаване на концентрацията, като разликите са в границите от 0.38 % между II и III група, до 0.86% между I и III група

Проведеният клъстерен анализ на база основни показатели на спермопродукцията при нерезите може да се използва като допълващ метод, повишаващ ефективността на преценката на разплодниците.

ejaculates from class two, followed by class one, as the greatest number of ejaculates comes from the boars belonging to class three, with sperm concentration of more than 500x10^6 sperm/cm^3.

The percentage of agglutinated spermatozoa increase with the increased concentration from 6.3 to 6.77%, but they sharply reduce in group three, where they reach their minimum of 6.15%.

With dead spermatozoa, the increased concentration tends to result in decreased number, as the differences are within the range of 0.38 % between group II and III and up to 0.86% between group I and III.

The performed cluster analysis based on main parameters of sperm production of boars may be used as an additional method increasing the efficiency of evaluating breeding boars.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Amann, R.P., D.F. Katz and C. Wang**, 1995. What is semen? How does semen analysis assist in understanding the reproductive status of the male? In: Robaire B, Pryor JL, Trasler JM (ed.), The Handbook of Andrology. American Society of Andrology, Schaumburg, IL, pp. 25-29.
2. **Correa, J.R., M.M. Pace and P.M. Zavos**, 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, 48, 721-731.
3. **Duran, B. and P. Odelle**, 1977. Cluster analysis. Moscow (Ru).
4. **Dyck, M.K., G.R. Foxcroft, S. Novak, A. Ruiz-Sanchez, J. Patterson and W.T. Dixon**, 2011. Biological Markers of Boar Fertility. Reprod Dom Anim 46 (Suppl 2), pp. 55-58.
5. **Knecht, D., S. S´rodon and K. Duzinski**. 2014. Does a Boar's Season of Birth Determine Semen Parameters and Reproductive Performance? *Reprod Dom Anim*. 49, 183-190.
6. **Kondracki, S., A. Wysokinska, M. Iwanina, D. Banaszewska and D. Sitarz**. 2011.Effect of sperm concentration in an ejaculate on morphometric traits of spermatozoa in Duroc boars. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14 (1), 35-40.
7. **Nikolov, I., Zh. Baychev, M. Sabev, D. Kazachka, R. Stefanov and P. Parvanov**, 2012. Biological control and semen storage from farm breeders. Sofia, pp. 141 (Bg).
8. **Smital, J., L.L.De Sousa and A. Mohsen**, 2004. Differences among breeds and manifestation of heterosis in AI boar sperm output. *Anim Reprod Sci,* 80, 121-130.
9. **Ward, J.H.**, 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58, 236-244.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (6), 84-95 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на интервала на получаване на еякулата върху някои показатели на спермата от терминални нерези

Радка Малинова, Ивелина Запрянова*

Аграрен университет, бул. Менделеев 12, 4000 Пловдив, България
**E-mail: ivelina_z@abv.bg*

Influence of the interval between obtaining the ejaculate on some semen characteristics from terminal boars

Radka Malinova, Ivelina Zapryanova*

Agricultural University, 12 Mendeleev Blvd., 4000 Plovdiv, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Проучено е влиянието на интервала на получаване на еякулати върху качеството и количеството на сперма от нерези. Проучването включва общо 140 еякулата, получени през периода януари 2011-май 2014 г., добити от 8 разплодни нереза (Large White x Pietrain), през интервали 5 (n= 21), 7 (n=54), 8 (n=23) и 9 (n=42) дни. Интервалът на получаване оказва достоверно влияние върху концентрацията и процента на аглутинирани сперматозоиди ($p < 0.05$). Концентрацията на сперматозоиди в спермата нараства с увеличаване на интервала между отделните спермоколекции, като от 370 $x10^6/cm^3$ при интервал на получаване пет дни достига до 414 $x10^6/cm^3$ при интервал от девет дни. Процентът на аглутинирани сперматозоиди има най-малки стойности при 7-дневен интервал (5,07 % ±0,4), а най-големи при 8-дневен интервал на получаване (7,3%±0,5). Най-голям процент мъртви сперматозоиди се наблюдават отново при 8 и 9 дневен интервал на получаване – 9,1% и 8,9%, съответно, а най-малък при 5 и 7 дневен интервал

SUMMARY

It was studied the influence of the interval between ejaculate obtaining on quality and quantity of boar semen. The study covers 140 ejaculates collected during the period from January 2011 to May 2014 obtained from 8 breeding boars (Large White x Pietrain),with intervals between ejaculate collection 5 (n= 21), 7 (n=54), 8 (n=23) and 9 (n=42) days. The interval between collections has significant impact on the concentration and percentage of agglutinated spermatozoa in the sperm ($p < 0.05$). The sperm concentration increases with the increase of the interval between ejaculations, as from $370x10^6$ sperm/cm^3 at interval of five days, it reached $414x10^6$ sperm/cm^3 at interval of nine days. The percentage of agglutinated spermatozoa has the lowest values at 7-day intervals (5,07 % ±0,359), and the highest ones at 8-day intervals (7,3 % ±0,522).

The highest percentage of dead spermatozoa is observed again at 8 and 9-day intervals of obtaining – 9,1% and 8,9%, respectively, and the lowest at 5 and 7-day intervals of obtaining – 8 % and

на получаване – 8 % и 8,2 %, съответно. Наред вариационно-статистически, с данните беше проведен и йерархичен клъстерен анализ с цел да се направи комплексна оценка на базата на основни параметри на спермопродукцията. Бяха изготвени дендрограми за всеки един отделен интервал на получаване на еякулати. Проведеното групиране на индивидите би могло да се използва за повишаване надеждността на преценка и допълва методите за определянето влиянието на интервала на получаване на еякулати върху основни параметри на спермопродукцията при нерезите.

Ключови думи: нерези, интервал на получаване, сперма, клъстерен анализ, дендрограми

8,2 %, respectively. Along with the variation and statistical, a hierarchical cluster analysis was conducted, aiming at performing a complex evaluation based on basic parameters of sperm production. Dendrograms was made for each interval between ejaculate collections. The conducted grouping of individual could be used to increase the assessment reliability and it complements the methods for determining the influence of the interval of obtaining the ejaculates on basic parameters of sperm production of boars.

Key words: boars, collection interval, spemen, cluster analysis, dendrograms

УВОД

Изкуственото осеменяване е основен метод за запложданe на свинете в промишленото свиневъдство. Отглеждането на разплодните нерези представлява значителни разходи за свинефермите. По тази причина е от съществено значение получаването на по-голям брой дози за осеменяване на свинете и съответно редуциране на отглежданите разплодници във фермата, без това да се отрази на качеството на получените еякулати. Върху качеството на еякулата оказват влияние много фактори, от които най-важни са породата, възрастта, индивида и честотата на получаване (Miclea et al., 2008). Редица автори смятат, че високата честота на получаване на сперма при нерезите оказва отрицателно влияние върху качеството на еякулата (Pruneda et al., 2005; Bajena et al., 2016). Според Frangez et al. (2005) качеството на еякулата спада с увеличаване на честотата на получаване.

В тази връзка си поставихме за цел да се проучи влиянието на интервала на получаване на еякулата върху някои показатели на спермата от терминални нерези.

INTRODUCTION

Artificial insemination is major method for sows breeding in intensive pig production. Raising breeding boars is significant costs for pig farms.

Therefore is essential to obtain a bigger number of insemination doses and respectively to reduce the number of breeding boars raised in the farm, without affecting the quality of the obtained ejaculates.

Multiple factors affect the quality of the ejaculate, and the most important are the breed, age, individual and the frequency of obtaining (Miclea et al., 2008). A number studies have shown that high obtaining frequency of sperm from boars has negative influence on the quality of the ejaculate (Pruneda et al., 2005; Bajena et al., 2016). According to Frangez et al. (2005) the quality of the ejaculate decreases with the increase of the frequency of obtaining.

Therefore, the aim of our research is to examine the influence of the interval between obtaining the ejaculate on some semen parameters of terminal boars.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването включва общо 140 еякулата, получени през периода януари 2011-май 2014 г., добити от 8 разплодни нереза (Large White x Pietrain), през интервали 5 (n= 21), 7 (n=54), 8 (n=23) и 9 (n=42) дни.

Еякулатите се получават по мануелен метод в градуирана спермосъбирателна чаша, покрита със стерилна марля. Веднага след получаването и филтрирането еякулата се преценява по следните количествени и качествени показатели:

- Обем на еякулата (cm^3);
- Концентрация на сперматозоидите ($x10^6$ sperm/cm^3), измерена в спермодензитометър;
- Подвижност (%), определена по рутинен начин под микроскоп със стандарто увеличение (Nikolov et al., 2012);
- Аглутинирани и мъртви сперматозоиди (%) – определена по рутинен начин под светлинен микроскоп, при увеличение x400 (Nikolov et al., 2012);
- Тотална концентрация ($x10^6$ sperm/cm^3).

Оценка на влиянието на интервала на получаване на еякулатите, и тяхното групиране на база на основни показатели на спермопродукцията е направена чрез йерархичен клъстерен анализ. Използван е методът на междугруповото свързване (Ward, 1963; Dyuran and Odelly, 1977), с евклидово разстояние като мярка за сходство между индивидите.

Клъстерният анализ и вариационно-статистическата обработка на данните бяха извършени със софтуерен продукт SPSS version 19, IBM.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В Таблица 1 е представено влиянието на интервала на получаване, възрастовата група и индивида върху обема, концентрацията, тоталната концентрация, подвижността, процента на аглутинирани и мъртви сперматозоиди в сперма от нерези.

MATERIAL AND METHODS

The study covers 140 ejaculates collected during the period from January 2011 to May 2014 obtained from 8 breeding boars (Large White x Pietrain),with intervals between ejaculate collection 5 (n= 21), 7 (n=54), 8 (n=23) and 9 (n=42) days.

The ejaculates were obtained by manual method, collected in a graduated semen-collection cup, covered with sterile gauze. Immediately after the collecting and filtering, the material was assessed for quantitative and qualitative traits, including:

- volume of the ejaculate (cm^3);
- concentration of the sperms ($x10^6$ sperm/cm^3), measured in a sperm densitometer;
- motility (%), determined by a routine method, under microscope with standard magnification (Nikolov et al., 2012);
- Agglutinated and dead sperms (%) - determined by a routine method under light microscope, with magnification x400 (Nikolov et al., 2012);
- Total concentration ($x10^6$ sperm/cm^3).

The grouping of the individuals by the main parameters of the sperm production, depending on the class in which they fall according to the sperm concentration in the ejaculates, is done by hierarchical cluster analysis. The method of between-group lincage (Ward, 1963; Dyuran and Odelly, 1977) was used with Euclidean distance as a measure of group similarity.

Cluster analysis and variational statistical data processing were performed with SPSS version 19 software, IBM.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 presents the influence of the interval between collections, the age group and individual on the volume, concentration, total concentration, percentage of progressively motile spermatozoa, percentage of agglutinated and dead spermatozoa in the boars semen.

Таблица 1. Влияние на интервала на получаване на сперма, възрастовата група и индивида върху някои признаци на сперма от нерези.
Table 1. Influence of interval between ejaculate collections, age group and individual on some semen traits

F-критерий и степен на достоверност / F-criteria and level of confidence					
Модел / Model	Модел 1 / Model 1		Модел 2 / Model 2		
Фактор / Factor	Интервал на получаване Interval between ejaculate collections	Възрастова група Age group	Интервал на получаване Interval between ejaculate collections	Възрастова група Age group	Индивид Individual
Обем / Volume, cm^3	0,888	20,09***	1,149	0,250	25,09***
Концентрация Concentration, $x10^6/cm^3$	2,936*	27,41***	4,729**	11,66***	7,433***
Тотална концентрация Total concentration, $x10^6$	0,777	1,948	0,755	3,944*	6,356***
Подвижност / Motility, %	0,335	12,51***	0,267	6,250**	6,125***
Аглутинирани сперматозоиди Agglutinated spermatozoa, %	3,084*	1,015	2,481	1,519	2,760**
Мъртви сперматозоиди Dead spermatozoa, %	1,748	4,721**	1,516	1,641	1,448

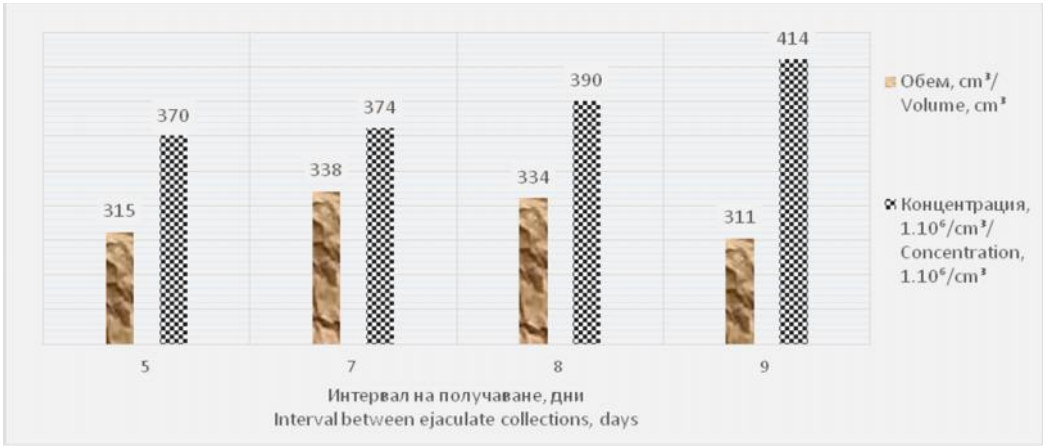
*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Интервалът на получаване оказва достоверно влияние върху концентрацията и процента на аглутинирани сперматозоиди в спермата ($p < 0.05$). Възрастовата група оказва значително влияние върху всички показатели с изключение на тоталната концентрация и аглутинираните сперматозоиди. Индивидът е достоверен източник на вариране върху всички проучени признаци с изключение на процента мъртви сперматозоиди в еякулата.

От Фигура 1 е видно, че концентрацията на сперматозоиди в спермата нараства с увеличаване на интервала между отделните еякулации, като от 370 $x10^6$ sperm/cm^3 при интервал на получаване пет дни достига до 414 $x10^6$ sperm/cm^3 при интервал девет дни (P<0,05). В свое проучване Miclea et al. (2007) също установяват нарастване на концентрацията с увеличаване на интервала на получаване. Обемът на спермата нараства от 315 cm^3 при пет дневен интервал до 338 cm^3 при получаване на еякулати през 7 дни, след което започва да намалява, като на деветия ден достига 311 cm^3.

The interval between collections has significant impact on the concentration and percentage of agglutinated sperms in the semen ($p < 0.05$). The age group has significant influence on all semen traits except the total concentration and the agglutinated sperms. The individual is a reliable source of variation between all examined semen parameters with the exception of the percentage of dead sperms in the ejaculate.

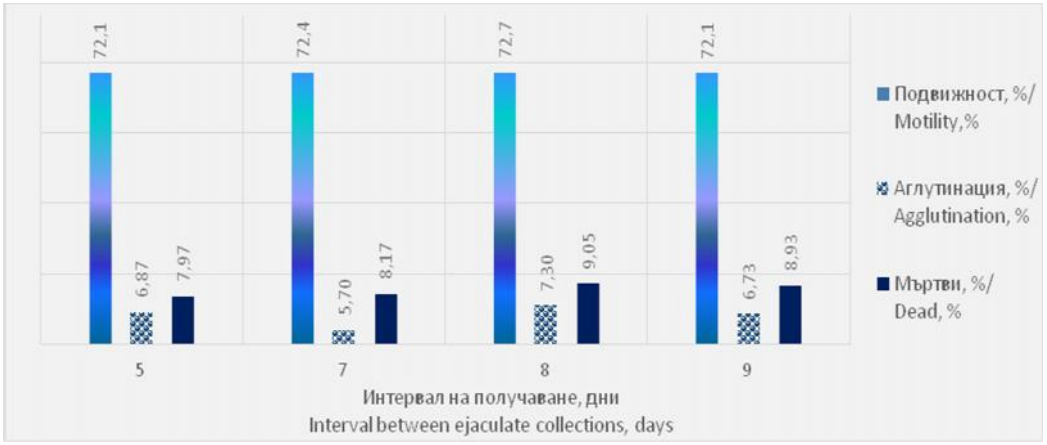
From Figure 1 it becomes obvious, that the sperm concentration increases with the increase of the interval between ejaculations, as from 370$x10^6$ sperm/cm^3 at interval of five days, it reached 414$x10^6$ sperm/cm^3 at interval of nine days (P<0,05). Miclea et al. (2007) also establish an increase in the sperm concentration with the increase of the interval of semen collection. The volume of ejaculate increases from 315 cm^3 at five-day interval, to 338 cm^3 when ejaculates are obtained at seven- day intervals, thereafter starts to decrease, as on the ninth day intervals it became 311 cm^3.



Фиг. 1. Динамика при обема на спермата и концентрацията на сперматозоиди в зависимост от интервала на получаване на еякулатите
Fig. 1. Variability of the volume and sperm concentration depending on the interval between ejaculate collections

В условията на нашия експеримент се установява, че подвижността на сперматозоидите в спермата (Фигура 2) не се изменя значително при различните интервали на получаване на еякулатите. Най-висок процент на сперматозоиди с праволинейни настъпателни движения има в семенната течност, получавана през седем и осем дневен интервал – 72,4 и 72,7 %, съответно.

Within the conditions of our experiment, is established that the percentage of motile spermatozoa in sperm (Figure 2) does not change significantly with different intervals of ejaculates obtaining. The highest percentage of progressively motile spermatozoa is found in the semen obtained in seven- or eight-day intervals – 72,4 and 72,7 %, respectively.



Фиг. 2. Динамика при показателите подвижност на спермата, аглутинирани и мъртви сперматозоиди в зависимост от интервала на получаване на еякулатите
Fig. 2. Variability of the sperm motility, agglutinated and dead spermatozoa depending on the interval between ejaculate collections

Процентът на аглутинирани сперматозоиди (Фигура 2) достоверно се влияе от интервала на получаване (P<0,05), като най-ниски стойности са отчетени при 7-дневен интервал (5,07 % ±0,359), а най-високи при 8-дневен интервал (7,3 % ±0,522).

Най-голям процент мъртви сперматозоиди се наблюдават отново при 8 и 9 дневен интервал на получаване – 9,1% и 8,9%, съответно, а най-малък при 5 и 7 дневен интервал на получаване – 8 % и 8,2 %, съответно. Според Frangez et al. (2005) запло-дяемостта на свинете и броя на получените прасенца са най-високи при осеменяване със сперма получавана веднъж седмично.

Тоталната концентрация като комплексен фактор, зависещ от съотношението между обема на спермата и концентрацията на сперматозоидите в нея, дава ясна представа за спермопродуктивността на животните. На Фигура 3 е представена динамиката при проучвания показател в зависимост от интервала на получаване на еякулатите.

The percentage of agglutinated spermatozoa (Figure 2.) is significant influenced by the interval of obtaining (P<0,05), as the lowest values are reported at 7-day intervals (5,07 % ±0,359), and the highest ones at 8-day intervals (7,3 % ±0,522).

The highest percentage of dead sperms is observed again at 8 and 9-day intervals of obtaining – 9,1% and 8,9%, respectively, and the lowest at 5 and 7-day intervals of obtaining – 8 % and 8,2 %, respectively. According to Frangez et al. (2005) the insemination rate of the pigs and the number of piglets born are highest when the insemination was performed with semen obtained once a week.

The total concentration as a complex factor, depending on the ratio between the ejaculate volume and the sperm concentration and provides a clear image of the animals' sperm production. Figure 3 presents the dynamics of the studied trait, according to the interval between ejaculates obtaining.

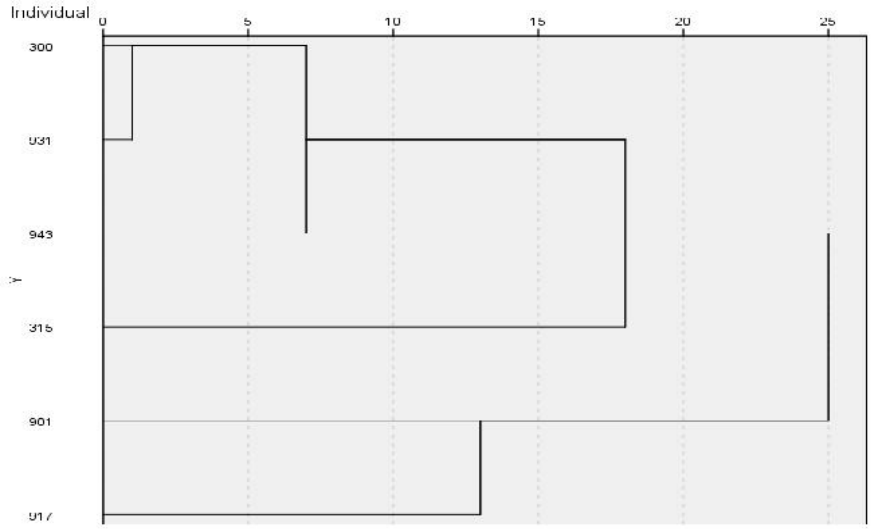
Фиг. 3. Динамика при тоталната концентрация на сперматозоиди в еякулат в зависимост от интервала на получаване на спермата
Fig. 3. Variability of the total concentration of the sperm depending on the interval between ejaculate collections

Стойностите при този по-казател се покачват с увеличаване на интервала на получаване на сперма, като най-значителна разликата се наблюдава между 5-7 дневните интер-вали от 112187 x10^6 до 121894 x10^6, съответно, което е около осем процен-тов ръст. Разликата между интервал на получаване от 7 дни и интервал 8 дни е 2%, а между интервалите 8 и 9 дни е значително по-малко – 0,5%.

Наред с вариационно-статистически, с данните беше проведен и йерархичен клъстерен анализ с цел да се направи комплексна оценка на базата на основни параметри на спермопродукцията. Основната цел при клъстерния анализ е организирането на данните за получаване на приемливи организационни структури (Popov, 2002; Kuneva and Tahsin, 2015), чрез групиране на наблюденията, които са подобни помежду си. На дендрограмите (Фигура 4.1, 4.2, 4.3 и 4.4) е направена клъстеризация на база признаците обем и подвижност на спермата, концентрация на сперматозоидите, както и аглутинираните и мъртви сперматозоиди, за всеки един от проучваните интервали на получаване на еякулатите. На Фигура 4.1 е представена клъстеризация на индивидите при интервал на получаване на еякулатите от 5 дни. Данните показват, че индивидите се разпределят в един основен клъстер. Той включва разплодници с номера 300 и 931, които са с най-голямо сходство по проучваните параметри на спермопродукцията. Нерез с номер 943 е сходен с номер 300 по признаци обем на еякулата, процент на аглутинирани и мъртви сперматозоиди, и по-отдалечен по останалите параметри. На следващ етап към така оформеният подклъстер се присъединява индивид с номер 315. Отделна група формират индивиди с №№ 901 и 917, като варианти 901 и 300 са с най-голямо евклидово разстояние помежду си.

The values of this trait increase with the increase of the interval of obtaining the semen, as the most significant difference is observed between the 5 and 7-day intervals from 112187x10^6 to 121894x10^6, respectively, which is around an 8 percent increase. The difference between intervals of obtaining of 7 days and intervals of 8 days is 2%, and between the intervals 8 and 9 days it is significantly smaller – 0,5%.

Along with the variation and statistical, a hierarchical cluster analysis was conducted with the data, aiming at performing a complex evaluation based on basic parameters of sperm production. The main goal of the cluster analysis is the organization of the data in order to obtain acceptable organizational structures (Popov, 2002; Kuneva and Tahsin, 2015), by grouping the observations which are similar to each other. On the dendrograms (Figure 4.1, 4.2, 4.3 and 4.4) clusterization was made on basis of the traits volume and motility of the sperm, sperm concentration, as well as the agglutinated and dead spermatozoa, for each of the examined intervals for obtaining the ejaculate. Figure 4.1 presents the clusterization of the Individuals at interval of obtaining the ejaculates of 5 days. The data shows that the individuals are distributed in one main cluster. It includes breeding boars with number 300 and 931, which have the biggest similarity regarding the studied parameters of sperm production. Boar with number 943 is similar to number 300 in the following semen traits – volume of the ejaculate, percentage of agglutinated and dead spermatozoa, and more distant under the other parameters. During a following stage, individual with number 315 joins the formed sub-cluster. Individuals with No. 901 and 917 form a separate group, as variants 901 and 300 have the longest Euclidean distance between each other.



Фиг. 4.1. Йерархичен клъстерен анализ в зависимост от признаците обем и подвижност на спермата, концентрация на сперматозоидите, аглутинирани и мъртви сперматозоиди при пет дневна честота

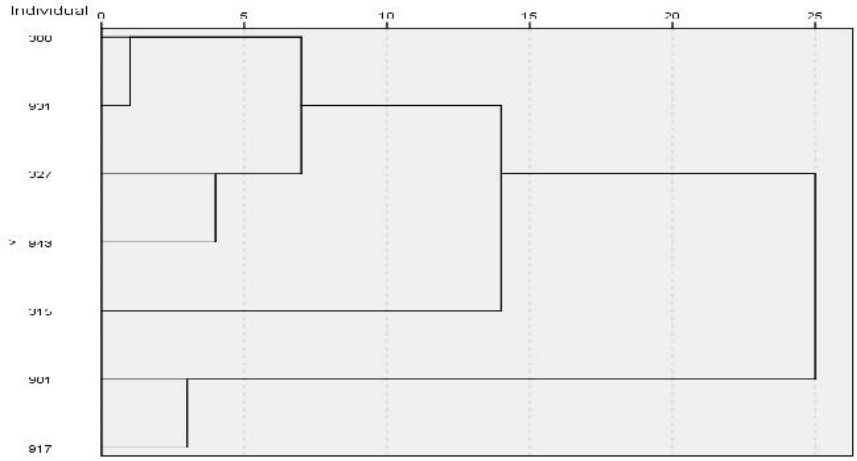
Fig. 4.1. Hierarchical cluster analysis depending on the volume and concentration of the sperm, motility of the spermatozoa, agglutinated and dead spermatozoa at five daily frequency

Дендрограма на базата на средните междугрупови разстояния

Dendrogram based on average between-group linkage

При дендрограмата, описваща разпределението на индивидите при 7 дневна честота на получаване на еякулатите (Фигура 4.2), установяваме известно сходство с позиционирането на животните както при по-краткия интервал на еякулация. Тук отново разплодници с номера 300 и 931 са най-сходни по проучваните показатели на спермата, но към този подклъстер се присъединяват още две животни (327 и 943), сходни по показателите концентрация на сперматозоидите, подвижност на спермата, аглутинирани и мъртви сперматозоиди. При проучваната честота на получаване на еякулатите между номера 901 и 917 има по-голямо сходство в сравнение с пет дневния период.

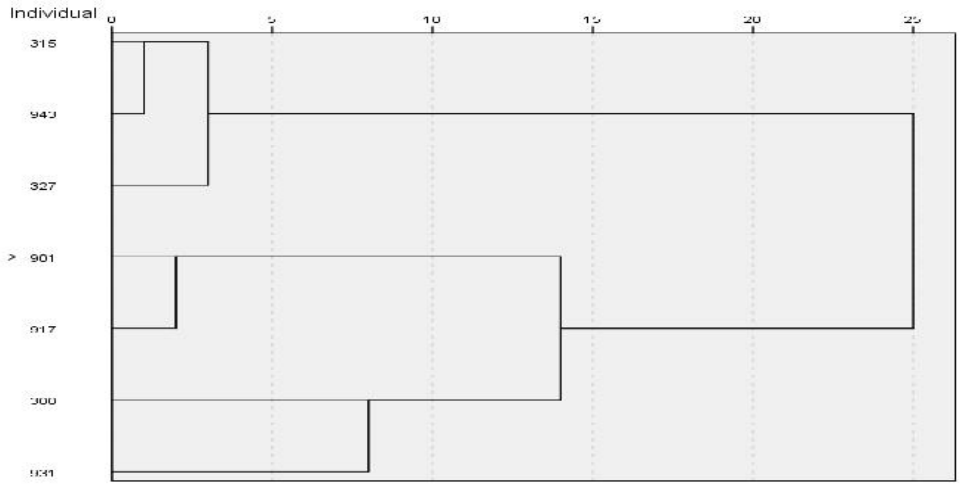
On the dendrogram, describing the distribution of the individuals at 7-day frequency of obtaining the ejaculates (Figure 4.2), we established a certain similarity with the positioning of the animals as with shorter interval of ejaculation. Here, again breeding boars with numbers 300 and 931 are the most similar in the studied semen parameters, but this sub-cluster is joint by two more animals (327 and 943), similar in the parameters – sperm concentration, sperm motility, agglutinated and dead spermatozoa. At the studied frequency of obtaining the ejaculates between numbers 901 and 917, there is a bigger similarity compared to the 5-day period.



Фиг 4.2. Йерархичен клъстерен анализ в зависимост от признаците обем и подвижност на спермата, концентрация на сперматозоидите, аглутинирани и мъртви сперматозоиди при седем дневна честота
Fig. 4.2. Hierarchical cluster analysis depending on the volume and concentration of the sperm, motility of the spermatozoa, agglutinated and dead spermatozoa at seven daily frequency
Дендрограма на базата на средните междугрупови разстояния
Dendrogram based on average between-group linkage

На Фигура 4.3 са представени резултатите от клъстеризацията на индивидите при осем дневен интервал на получаване на еякулатите. Дендрограмата съдържа два основни клъстера, първият от които се образува от две животни, които на практика са без различия по проучваните показатели - №№ 315 и 943, към които на следващ етап се присъединява и нерез номер 327. Вторият основен клъстер включва в себе си два подклъстера – единият формиран от индивиди с номера 901 и 917. При тях сходството е по подвижност на спермата, концентрация на сперматозоидите и процента мъртви клетки. Другият подклъстер се формира от разплодници 300 и 931. Между тези два индивида близостта, отчетена чрез евклидовото разстояние е по показателите подвижност, аглутинирани и мъртви сперматозоиди.

Figure 4.3 presents the results of the clusterization of the individuals at eight-day interval between obtaining the ejaculates. The dendrogram contains two main clusters, the first of which is formed by two animals, which practically do not have differences in the studied parameters – No. 315 and No. 943, which are later joined by breeding boar number 327. The second main cluster includes two sub-clusters – one of them is formed by animals with numbers 901 and 917. With them, the similarity is in the motility of the sperm, the sperm concentration and the percentage of dead cells. The other sub-cluster is formed from breeding boars 300 and 931. The similarity between these two individuals, reported through the Euclidean distance, is in the traits – the percentage of motile spermatozoa, agglutinated and dead.



Фиг. 4.3. Йерархичен клъстерен анализ в зависимост от признаците обем и подвижност на спермата, концентрация на сперматозоидите, аглутинирани и мъртви сперматозоиди при осем дневна честота

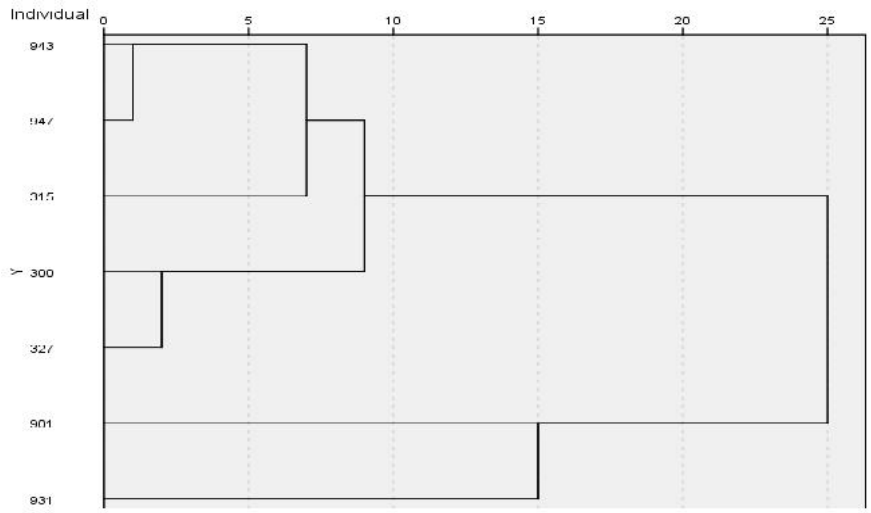
Fig. 4.3. Hierarchical cluster analysis depending on the volume and concentration of the sperm, motility of the spermatozoa, agglutinated and dead spermatozoa at eight daily frequency

Дендрограма на базата на средните междугрупови разстояния

Dendrogram based on average between-group linkage

Групирането на индивидите при интервал на получаване на еякулати от 9 дни (Фигура 4.4) показва образуването на един основен клъстер. В него нерези с номера 943 и 947 са най-близки по показателите на спермопродукцията. На по-късен етап към тях се присъединяват индивиди 315 и 300. Следващите по хомогенност са еякулатите на нерези 300 и 327, които са сходни по показателите подвижност на спермата, аглутинирани и мъртви сперматозоиди. И тук, както и при интервалите от 5 и 7 дни, най-отдалечен по всички разглеждани показатели е индивид с номер 901.

The grouping of the boars with interval of obtaining ejaculates of 9 days (Figure 4.4) shows the formation of one main cluster. Where, boars with numbers 943 and 947 are closest in semen parameters. At a later stage, the individuals 315 and 300 join them. The next ones in homogeneity are the ejaculates of boars 300 and 327, which are similar in the semen parameters – motility of spermatozoa, agglutinated and dead sperms. Here too, as in the intervals of 5 and 7 days, the individual with number 901 is the most distant in all indicators.



Фиг. 4.4. Йерархичен клъстерен анализ в зависимост от признаците обем и подвижност на спермата, концентрация на сперматозоидите, аглутинирани и мъртви сперматозоиди при девет дневна честота

Fig. 4.4. Hierarchical cluster analysis depending on the volume and concentration of the sperm, motility of the spermatozoa, agglutinated and dead spermatozoa at nine daily frequency

Дендрограма на базата на средните междугрупови разстояния

Dendrogram based on average between-group linkage

ИЗВОДИ

Интервалът на получаване оказва достоверно влияние върху концентрацията и процента на аглутинирани сперматозоиди в спермата ($p < 0.05$).

Концентрацията на сперматозоиди в спермата нараства с увеличаване на интервала между отделните спермоколекции, като от 370 x10^6 sperm/cm^3 при интервал на получаване пет дни достига до 414 x10^6 sperm/cm^3 при интервал от девет дни. Тоталната концентрация нараства незначително с удължаване на интервала на получаване след седмия ден.

Процентът аглутинирани сперматозоиди в спермата има най-ниски стойности при 7-дневен интервал (5,07 % ±0,359), а най-високи при 8-дневен интервал (7,3 % ±0,522).

Най-голям процент мъртви сперматозоиди се наблюдават отново при 8 и 9 дневен интервал на получаване 9,1% и 8,9%, съответно, а най-малък при 5 и 7 дневен интервал на получаване 8 % и 8,2 %, съответно.

CONCLUSIONS

The interval between collections has significant impact on the concentration and percentage of agglutinated sperms in the sperm ($p < 0.05$).

The sperm concentration increases with the increase of the interval between ejaculations, as from 370x10^6 sperm/cm^3 at interval of five days, it reached 414x10^6 sperm/cm^3 at interval of nine days. The total concentration increased negligible with increasing ejaculate collection interval over 7 days.

The percentage of agglutinated sperms has the lowest values at 7-day intervals (5,07 % ±0,359), and the highest ones at 8-day intervals (7,3 % ±0,522).

The highest percentage of dead sperms is observed again at 8 and 9-day intervals of obtaining – 9,1% and 8,9%, respectively, and the lowest at 5 and 7-day intervals of obtaining – 8 % and 8,2 %, respectively.

Проведеният йерархичен клъстерен анализ би могъл да се използва за повишаване надеждността на преценка и допълва методите за определянето влиянието на интервала на получаване на еякулати върху основни параметри на спермопродукцията при нерезите.

The conducted hierarchical cluster analysis could be used to increase the assessment reliability and it complements the methods for determining the influence of the interval of obtaining the ejaculates on basic parameters of sperm production of boars.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bajena, M., S. Kondracki, M. Iwanina, A. Wysokińska and A. Adamiak**, 2016. Physical characteristics of ejaculates produced by insemination boars depending on the interval between successive ejaculate collections. *Journal of Central European Agriculture*, 17 (2), 260-271.
2. **Duran, B. and P. Odelle**, 1977. Cluster analysis. Moscow (Ru).
3. **Frangez, R., T. Gider and M. Kosec**, 2005. Frequency of Boar Ejaculate Collection and its Influence on Semen Quality, Pregnancy Rate and Litter Size, *ACTA VET. Brno*, 74: 265-273.
4. **Kuneva, V.and N. Tahsin**, 2015. Using of cluster analysis to group and evaluate various sunflower hybrids. Agricultural University - Plovdiv, *Scientific Works*, LIX (2), 59-64 (Bg).
5. **Miclea, V., M. Zăhan, I. Gyorgy and I. Miclea**, 2008. The influence of boar age on ejaculate quality, *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 65(1-2)/2008.
6. **Miclea, V., M. Zahan, Ileana Miclea and Ilona Vajda**, 2007. Influence of harvest frequency on the quality of boar semen. *Bulletin USAMV-CN*, 63 - 64/2007.
7. **Nikolov, I., Zh. Baychev, M. Sabev, D. Kazachka, R.Stefanov and P. Parvanov**, 2012. Biological control of semen storage of farm animals, Sofia, pp. 141 (Bg).
8. **Popov, K.**, 2002. Geochemical Associations in Radkinsko rudno pole. *Godishnik na Minno-geologkia universitet „ Sv. Ivan Rilski", Geologia*, Sofia, 45 (I), 55-62 (Bg).
9. **Pruneda, A., E. Pinart, M. D. Briz, S. Sancho, N. Garcia-Gil, E. Badia, E. Kádár, J. Bassols, E. Bussalleu, M. Yeste and S. Bonet**, 2005. Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. *Theriogenology*, vol. 63: 2219-2232.
10. **Ward, JH**, 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58, 236-244.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (6), 96-103 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Изследване на някои морфо-биохимични и имунологични показатели при хибридни нерези

Христо Христев, Ивелина Запрянова*

Аграрен университет, бул. Менделеев 12, 4000 Пловдив, България
**E-mail: ivelina_z@abv.bg*

Study of some morphological biochemical and immunological indicators of hybrid boars

Hristo Hristev, Ivelina Zapryanova*

Agricultural University, 12 Mendeleev Blvd., 4000 Plovdiv, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Изследвани са някои морфо-биохимични и имунологични показатели при хибридни нерези. Установено е, че всички показатели са в границите на физиологичните норми: брой левкоцити 11,2 x 10^9, хемоглобин 107,6 g/l, общ белтък 83,4 g/l, фагоцитарна активност 55,7 %, фагоцитарно число 1,9, фагоцитарен индекс 3,1, лизоцимна активност 39,8 %, бактерицидна активност 60,5 %. Прави се извода, че хибридните нерези притежават висока обща имунна защита, гарантираща им добра адаптивност към факторите на производствената среда.

Ключови думи: нерези, левкоцити, хемоглобин, обща устойчивост

SUMMARY

Some morpho-biochemical and immunological indicators of hybrid boars have been tested. It has been established that all indicators are within the borders of the physiological norms: leukocytes count 11,2 x 10^9, hemoglobin 107,6 g/l, total protein 83,4 g/l, phagocytic activity 55,7 %, phagocytic number 1,9, phagocytic index 3,1, lysozyme activity 39,8 %, bactericidal activity 60,5 %. The conclusion is made that hybrid boars have high general immune protection, which guarantees good adaptability to the factors of the production environment.

Key words: boars, leukocytes, hemoglobin, general resistance

УВОД

Отделните фактори на външната среда (биотични и абиотични), както и сложните взаимовръзки между тях, оказват съществено влияние върху общата обмяна на веществата в организма, неговото здраве и продуктивност, имунобиологичната му реактивност, топлинния баланс и обмяната на газовете, генетичния потенциал, репродукцията и редица други функции на организма (Plyashchenko and Khokhlova,

INTRODUCTION

The various factors of the of the environment (biotic and abiotic) as well as the complex interconnections between them, have significant influence on the overall exchange of substances in the organism, its health and productivity, its immunobiological reactivity, the thermal balance and the exchange of gases, the genetic potential, the reproduction and a number of other functions of the organism (Plyashchenko and Khokhlova, 1976;

1976; Petkov et al., 1979; Bildirev et al., 1989; Kuznetsov and Lysov, 2002; Voronin et al., 2002; Kunavongkrit et al., 2005; Tolon et al., 2008; Vasilevich and Borovina, 2009). Научните изследвания и практиката доказват, че колкото по-висок е генетичния потенциал у животните, толкова по-сложни стават взаимоотношенията между факторите на средата (Voronin et al., 2002). Силата и степента на тези въздействия върху здравето, продуктивността и устойчивостта на свинете според O'Brien et al. (1989) се определят не само от параметрите на всеки хигиенен показател, но и от продължителността им на въздействие.

Вносът на нов генетичен материал през последните години нарасна. Стопанските резултати от инпортните животни обаче не винаги отговарят на очакванията (Zhemerkina et al., 2002). Поставени при новите условия на живот много от факторите на средата се превръщат в стресови за тях. Всичко това се оказва причина за нарушения в обмяната на веществата, за намаляване на продуктивността и за ранното им изключване от разплод (Khusainova, 2004; Gridnev and Gridneva, 2006; Podobed, 2007).

Устойчивостта на организма е една от най-често използваните му функции за характеризиране механизма на адаптация, изпълняваща характерни задачи при поддържането на структурно-функционалната хомеостаза на организма (Molyanova, 2011).

Имайки пред вид това, ние си поставихме за цел да анализираме процеса на адаптация на хибридни нерези (Large White x Pietrain), внос от Франция, като използваме някои морфо-биохимични и имунологични показатели.

Petkov et al., 1979; Bildirev et al., 1989; Kuznetsov and Lysov, 2002; Voronin et al., 2002; Kunavongkrit et al., 2005; Tolon et al., 2008; Vasilevich and Borovina, 2009). Scientific research and practice prove that the higher genetic potential in the animals, the more complicated the relations between the environment factors become (Voronin et al, 2002). The strength and degree of these effects on the health, productivity and resistance of the pigs, according to O'Brien et al. (1989) are determined not only by the parameters of every hygiene indicator, but also by the duration of their impact.

The import of new genetic material has increased in the last years. The economic results of the imported animals, however, do not always meet the expectations (Zhemerkina et al., 2002). Placed under new living conditions, a lot of the environmental factors become stressful to them. All this turns out to be a reason for disturbance in the exchange of substances, for decrease in the productivity, and for their early exclusion from the breeding (Khusainova, 2004; Gridnev and Gridneva, 2006; Podobed, 2007).

The resistance of the organism is one of its most frequently used functions for characterization of the mechanism of adaptation, performing typical tasks for the maintenance of structural-functional homeostasis of the organism (Molyanova, 2011).

Keeping this in mind, we set ourselves a task to analyse the process of adaptation of the hybrid boars (Large White x Pietrain), imported from France, by using some morphological biochemical and immunological indicators.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Разплодниците се отглеждаха в тухлена сграда с дървена покривна конструкция, с външна и вътрешна варо-пясъчна замазка и циментов под в

MATERIAL AND METHODS

The breeders were raised in a brick building with wooden roof construction, with inner and outer lime-sand mortar and a cement floor in the region of the town of

района около град Пловдив през периода Ноември-Март 2012/13 година. Сградата е позиционирана в посока изток-запад, а прозорците й са монтирани на южната надлъжна стена. Температурата и относителната влажност вън и вътре в сградата измервахме със седмични термо-хигрографи и контролирахме с психрометър на Асман, движението на въздуха и охлаждащата величина – с кататермометър, интензивността на осветеност – с луксиметър PU 320, а концентрацията на амоняка с дрегер. Подробните резултати за хигиенното състояние на сградата и микроклимата в нея са представени в отделно съобщение (Hristev and Zapryanova, 2014).

Нерезите бяха на възраст 12-24 месеца и бяха поставени при еднакъв хранителен режим, съгласно нормативните изисквания. По всяко време на денонощието им се предоставяше свободен достъп до дворчетата за разходка с обща площ за всеки по 17 m^2, а от сградата – по 6 m^2.

Кръв за изследване вземахме сутрин преди хранене от очния синус. Броят на левкоцитите определяхме с камерата на Бюркер, общият белтък - по биоретовия метод, а хемоглобина – по метода на Драпкин (Angelov et al., 1998). Фагоцитарната активност, фагоцитарното число и индекс определяхме с инактивирана култура на Staphylococcus albus (Voronin et al., 2002). Лизоцимната активност на серума определяхме по метод на Dorofeychuk (1968) като за тест-култура използвахме Micrococcus lysodeicticus, а бактерицидната активност на кръвен серум – по метод на Smirnov and Kuzmin (1966) при тест-култура E. coli.

Резултатите обработихме вариационно-статистически.

Plovdiv in the period November-March 2012/13. The building is positioned to the east-west and the windows are mounted on the south longitudinal wall. We measured the temperature and the relative humidity outside and inside of the building with weekly thermo-hygrographs and we controlled them with Assmann Psychrometer, the air movement and the cooling value – with a kata thermometer, the luminous intensity – with a light meter PU 320, and the ammonia concentration with a drager. The detailed results for the hygiene state of the building and the microclimate in it are presented in a different message (Hristev and Zapryanova, 2014).

The boars were at the age between 12-24 months and were placed under one and the same nutritional regimen, in accordance with the normative requirements. They had permanent free access to the small yards for walking with total area for each of 17 m^2, and from the building – 6 m^2 each.

We took blood samples for testing in the morning before eating from the ocular sinus. We determined the leukocytes count with the Bürker chamber, the total protein – with the biuret method, and the hemoglobin – with the method of Drabkin (Angelov et al., 1998). The phagocytic activity, phagocytic number and index we determined by inactivated culture of Staphylococcus albus (Voronin et al, 2002). We determined the lysozyme activity of the serum with Dorofeychuk's method (1968) as we used Micrococcus lysodeicticus for test culture, and the bactericidal activity of the blood serum – under Smirnov and Kuzmin's method (1966) with E. coli test culture.

We processed the data through variational and statistical methods.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В наши предишни изследвания установихме, че информацията относно реакцията на организма към факто-

RESULTS AND DISCUSSION

In our previous surveys, we established that the information regarding the reaction of the organism to the

рите на средата не трябва да се разглежда еднозначно, а изследванията следва да включват колкото се може по-голям набор от изследвания – физиологични, морфологични, биохимични, имунологични и други (Hristev et al., 1996).

Известно е, че ролята на серумните белтъчини в организма не се ограничава само до регулиране на осмотичното налягане и pH на кръвта, в транспорта на захарите, мазнините, хормоните и други (Angelov et al., 1998). Khrabustovskiy (1974) обобщава, а Karmoliev (1988) допълва, че именно белтъчините са тези, които дават информация за задоволеността на организма с пластични вещества и са материална основа за развитието на една висока резистентност.

Ето защо, съдържанието на общият протеин в кръвния серум на нерезите е от съществено значение при изучаване не само на физиологията на свинете, но и за проследяване процесите на самата сперматогенеза (Zaytsev et al., 2008). Установените от нас нива на общите серумни протеини (Таблица 1) бе в границите на физиологичните норми за този вид и категория животни – 83,4 g/l (Angelov et al., 1998). Съгласно констатацията на Zaytsev et al. (2008) и получените от нас резултати, може да приемем, че са налице условия, гарантиращи получаването на пълноценни полови клетки от тези нерези. В предишни наши изследвания (Hristev and Zapryanova, 2014) на същите животни установихме, че ниските температури и високата влажност на въздуха през зимата и есента имат стимулиращ ефект върху гъстотата на спермата и активността на сперматозоидите – P≤0,001, докато летните температури намаляват броят им и тяхната подвижност, но повишават обема на спермата.

environmental factors should not be viewed unambiguously and the examination should include as large a set of examinations as possible – physiological, morphological, biochemical, immunological and others (Hristev et al., 1996).

It is known that the role of the serum proteins in the organism is not limited only to regulation of the osmotic pressure and pH of the blood, the transport of the sugars, fats, hormones, etc. (Angelov et al., 1998). Hrabostovski (1974) concludes, and Karmoliev (1988) adds that exactly the proteins are the ones that give information for the satisfaction of the organism with plastic substances and are material base for the development of high resistance.

This is why the content of total protein in the blood serum of the boars is essential not only in the examination of the swine physiology, but also for tracing of the processes of spermatogenesis itself (Zaytsev et al., 2008). The levels of total serum protein we measured (table 1) were within the reference range for this type and category of animals – 83,4 g/l (Angelov et al., 1998).

According to the conclusion of Zaytsev et al. (2008) in the results we have obtained, we can accept that there are present conditions, guaranteeing the obtaining of complete sex cells from these boars. In previous surveys of ours (Hristev and Zapryanova, 2014) of the same animals, we established that the low temperatures and the high air humidity in winter and autumn have stimulating effect on the thickness of the semen and the activity of the sperms – P≤0,001, while summer temperatures decrease their count and motility, but increase the volume of the semen.

Таблица 1. Морфо-биохимични и имунологични показатели при хибридни нерези

Table 1. Morphological biochemical and immunological indicators of hybrid boars

Показатели / Indicators	(X±Sx)
Фагоцитарна активност / Phagocytic activity, %	55,7±2,2
Фагоцитарно число / Phagocytic number	1,9±0,2
Фагоцитарен индекс / Phagocytic index	3,1±0,3
Лизоцимна активност / Lysozyme activity, %	39,8±2,7
Бактерицидна активност / Bactericidal activity, %	60,5±3,3
Общ белтък / Total protein, g/l	83,4±2,8
Брой левкоцити / Number leukocytes, x 10^9	11,2±0,3
Хемоглобин / Haemoglobin, g/l	107,6±1,8

Средният брой на левкоцитите при този хибрид бе 11,2 x 10^9, т. е. в границите на физиологичните норми. Същото може да се каже и за нивото на хемоглобина – 107,6 g/l. От това следва да приемем, че при изследваните нерези окислителните процеси протичат нормално, а клетъчната съпротива на левкоцитите е запазена. В подкрепа на това са и резултатите, характеризиращи фагоцитарната защита на животните – 55,7%. За висока фагоцитарна активност на нерези от породите Дюрок и Голяма бяла съобщават още Zaytsev et al. (2008) като посочват стойности от 41,5 до 42,4 % през периода на тяхното най-активно използване.

Показател, който характеризира добра съпротивляемост на организма към причинители от различно естество се посочва бактерицидността на кръвния серум. Всъщност тя отразява сумарното действие на целия комплекс от хуморални фактори на защита (Hristev, 2007). Изследванията при хибридни нерези показаха висока активност – 60,5%. Това ни дава основание да затвърдим изказаното от нас мнение, че тези животни притежават висока устойчивост и запазен здравен статус, независимо от активното им полово използване.

Мурамидазата на кръвния серум се приема, че допълва активността на комплемента и повишава смилател-

The average leukocyte count with this hybrid was 11,2 x 10^9, i. e. within the reference range for the physiological norms. The same can be said for the level of hemoglobin – 107,6 g/l. Therefore we assume that with the examined boars the oxidation processes run normally, and the cell resistance of the leukocytes is preserved. This is also supported by the results, characterizing the phagocytic protection of the animals – 55,7%. Zaytsev et al. (2008) also report of high phagocytic activity for boars from the Duroc and Large White breeds, by indicating values of 41,5 to 42,4 % during the period of their most active use.

The bactericidal activity of the blood serum is an indicator which characterizes good resistivity of the organism to causes from various nature. Actually it reflects the total action of the entire complex of protection humoral factors (Hristev, 2007).

The examinations of these hybrid boars showed high activity – 60,5%. This gives us reason to confirm the opinion we have stated that these animals have high resistance and preserved health status, regardless of their active reproductive use.

The muramidase of the blood serum is accepted to be adding to the activity of the complement and to

ната функция на макрофагите (Kostov and Bonovska, 1983). Същевременно тя не може да бъде използвана за показател, чрез който може да се оцени функционалното състояние на циркулиращите в кръвта неутрофили поради отсъствието й в тези кръвни елементи при свинете (Goranov, 1978). Нейната активност се определя главно от състоянието на тъканите и органите, от които произхожда. В проследяваните от нас нерези лизоцимната активност на серума бе 39,8 %, което е в граници, съответващи на възрастта и активността на животните (Zaytsev et al., 2008). Присъствието на достатъчни количества цинк, калций и витамин „А" в дажбата повишат активността на серумния лизоцим, слабо на бактерицидната активност и нивото на имуноглобулините (Kontsevenko and Kogan, 1985). Makaganchuk and Yakimchuk. (1974) дори регистрират и достоверно нарастване на качествените показатели на спермата на нерезите.

increase the digestive function of the macrophages (Kostov and Bonovska, 1983). In the same time it cannot be used as an indicator used to assess the functional condition of the neutrophiles circulating in the blood due to its absence in these blood elements of pigs (Goranov, 1978). Its activity is defined mainly from the condition of the tissues and organs it originates from. The serum lysozyme activity of the boars we observed was 39,8 %, which is within the reference range, corresponding to the age and activity of the animals (Zaytsev et al., 2008). The presence of sufficient quantities of zinc, calcium and vitamin A in the feed increase the activity of the serum lysozyme, slightly increase the bactericidal activity and the level of immunoglobulins (Kontsevenko and Kogan, 1985). Makaganchuk and Yakimchuk (1974) even register a reliable increase in the qualitative indicators of the semen of the boars.

ИЗВОДИ

Установено е, че всички показатели са в границите на физиологичните норми: брой левкоцити 11,2 x 10^9, хемоглобин 107,6 g/l, общ белтък 83,4 g/l, фагоцитарна активност 55,7 %, фагоцитарно число 1,9, фагоцитарен индекс 3,1, лизоцимна активност 39,8 %, бактерицидна активност 60,5 %.

В заключение, на базата на получените резлтати, може да обобщим, че изследваните хибридни нерези притежават висока обща имунна защита, гарантираща им добра адаптивност към факторите на производствената среда.

CONCLUSIONS

It has been established that all indicators are within the borders of the physiological norms: leukocytes count 11,2 x 10^9, hemoglobin 107,6 g/l, total protein 83,4 g/l, phagocytic activity 55,7 %, phagocytic number 1,9, phagocytic index 3,1, lysozyme activity 39,8 %, bactericidal activity 60,5 %.

In conclusion, based on the obtained results, we can conclude that the examined hybrid boars have high general immune protection which guarantees them good adaptability to the factors of the production environment.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Angelov, G., N. Ibrishimov and S. Milashki**, 1998. Clinical laboratory analysis in veterinary medicine. Sofia, pp.360 (Bg).

2. **Bildirev, N., Hr. Hristev, Iv. Brachkova, R. Raykov, U. Gesheva**, 1989. The state and dynamics of the harmful gases in the premises for sows. STC "Problems on industrial and semiindustrial livestock", V. Tarnovo, pp. 270-280 (Bg).

3. **Dorofeychuk, V.G.**, 1968. Determination of lysozyme by nephelometric methods. *Laboratory work*, 1, 28-30 (Ru).
4. **Goranov H.**, 1978. Comparative study of the activity of muramidase (lysozyme) in the blood cells of some laboratory and farm animals. *Veterinary sciences*, № 9, 41-45(Bg).
5. **Gridnev, P. and T. Gridneva**, 2006, Advantages of keeping pigs on litter. *Livestock breeding in Russia*, 3, 25-26 (Ru).
6. **Hristev Hr.**, 2007. Natural resistance of animals. Publishing AU Plovdiv, pp. 128 (Bg)
7. **Hristev Hr. and I. Zapryanova**, 2014. Hygiene and energy characteristics and efficiency of premises for boars. *Scientific Works*, vol. LVIII, 259-267 (Bg).
8. **Hristev Hr. and I. Zapryanova**, 2014. Influence of the season of obtaining on the quality of boar semen. In: Third international scientific conference "Status and trends of development of genetic resources in livestock", Borovets, Bulgaria. (in press) (Bg).
9. **Hristev Hr., N. Bildirev and U. Gesheva**, 1996. Influence of high air temperature on adaptability of sows to her. In: Collection of reports „60 years RNIVMI – Plovdiv, pp. 294-299 (Bg).
10. **Karmoliev, R. Kh.**, 1988, Participation of blood proteins in the process of immunobiological adaptation of the organism. *Veterinary Medicine*, 1, 33-34 (Ru).
11. **Khrabustovskiy I. F., V. V. Nikol'skiy and Yu. M. Markov**, 1974. Methodical recommendations for determining the natural resistance of animals in conditions of intensive use. Kharkov: Ukr. Institute of Experimental Veterinary Medicine, pp. 7-18 (Ru).
12. **Khusainova, N. V**, 2004. Effect of stress sensitivity of pigs on their growth, metabolic processes, meat and fattening qualities, Abstract, Troitsk, pp. 23 (Ru).
13. **Kontsevenko, V. V. and E. S. Kogan**, 1985. Resistance of piglets in violation of mineral nutrition. Veterinary Medicine, No 5, 59-60 (Ru).
14. **Kostov G. and M. Bonovska**, 1983. Methods for determination of lysozyme activity of serums of livestock and poultry. *Veterinary Collection*, No 11, 30-32 (Bg).
15. **Kunavongkrit, A., A. Suriyasomboon, N. Lundehein, T. W. Heard and S. Einarsson**, 2005. Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. *Theriogenology*, vol. 63, 657-667.
16. **Kuznetsov, A. I. and V.F. Lysov**, 2002. The influence of stress sensitivity on the percentage of the birth of physiologically immature piglets. Physiology of young animals, Troitsk, pp. 58-59 (Ru).
17. **Makaganchuk, F. I. and N. V. Yakimchuk,** 1974. Influence of vitamin A level on blood of boars. *Veterinary Medicine*, No 12, 90-91.(Ru)
18. **Molyanova, G.V**, 2011, Formation of the physiologoimmune status of pigs with age, depending on heliogeophysical and climatic factors of the middle margin and its correction by thymosin-α1. Dissertation, pp. 318 (Ru).
19. **O'Brien, P. Y., B. J. Kalow, H. D. Brawn and J. H. Lamsden**, 1989. Envilopmental effects on swine reproduction. *American J. Vet. Ros*., No 50, 19-23.
20. **Petkov, G., P. Stoyanov, B. Baikov and L. Borisova**, 1979. Veterinary Medicine reference book of ecology and hygiene. "Zemizdat", Sofia, pp. 312 (Bg).
21. **Plyashchenko, S .I. and I. I. Khokhlova,** 1976. Microclimate and productivity of animals. "Kolos", Leningrad, pp. 208 (Ru).
22. **Podoped J.I.**, 2007. Pigs grow better when not bored*. Livestock breeding in Russia*, 4, 33-34 (Ru).
23. **Smirnov, O. V.**, 1966. Determination of bactericidal activity of blood serum by nephelometry. *Microbiology*, 4, 8-11 (Ru).

24. **Tolon, Y., B. Marta dos Santos, Irenilza de Alencar Naas, Daniella Jorge de Moura and Marcelo Rojas**, 2008. Environmental variables ammonia and light intensity in boar housing. American Society of Agricultural and Biological Engineers, www.asabe.org.
25. **Vasilevich, F. I. and E. G. Borovina**, 2009. Clinico-hematologic and biochemical changes, as well as factors of nonspecific immunity in experimental rabbit psoroptosis. Veterinary medicine, No 1-2, 28-29 (Ru).
26. **Voronin, E.S., A. M. Petrov, M. M. Serykh and D. A. Dervishev**, 2002. Immunology. Kolos-press, pp. 406 (Ru).
27. **Zaytsev, V. V., S. A. Sergeyeva and L. M. Zaytseva**, 2008. Dynamics of indices of natural resistance of boars organism in postnatal ontogenesis. University V.I. Vernadski, 11(1), 97-100 (Ru).
28. **Zhemerkina, C. J. I., A. M. Ukhtverov and M. P. Ukhtverov**, 2002. Speciality of acclimatization of German landrace in the Middle Volga region. *Zootechnics*, 11, 29-30 (Ru).