

# Charakterystyka rozrodu osłów rasy katalońskiej – próba ocalenia rasy zagrożonej wyginięciem

Katarzyna Purzycka<sup>1</sup>

Katalońska rasa osłów jest jedną z 6 autochtonicznych ras tego gatunku na terytorium Hiszpanii. W ostatnich latach doszło nie tylko do spadku liczebności osobników tej rasy, ale również do obniżenia się jej różnorodności genetycznej. Rasa katalońska znajduje się w kategorii zagrożonych wyginięciem w stopniu średnim, ponieważ aktualnie jej liczebność wynosi powyżej 400 osobników. Podjęte zostały programy mające na celu zachowanie tej rasy. W 2002 r. utworzono księgę stadną osłów rasy katalońskiej, w której obecnie zanotowanych jest 557 osobników,

291 z nich to samice powyżej 3 roku życia, 129 stanowią zaś samce powyżej 3 roku życia, a 137 – źrebięta.

Osiół kataloński (*Equus asinus var. catalana*) to rasa autochtoniczna regionu Katalonii, wywodząca się od osła somalijskiego (*Equus asinus somaliensis*). Osobniki cechuje wysoki wzrost, bowiem samce osiągają w kłębie 145–160 cm, natomiast samice 135–150 cm. Ich masa ciała wynosi 350–400 kg. Cechuje je łagodny temperament, co zostało wykorzystane przy eksploatowaniu ich do pracy fizycznej. Rasa ta ma duże znaczenie w tworzeniu

nowych populacji osłów, głównie europejskich i amerykańskich. Przykładem jest rasa american mammoth, której nazwa pochodzi od imienia Imported Mammoth – najlepszego osła-ogiera importowanego w 1819 r., kiedy został przewieziony do Charleston w USA, a jego nasienie użytkowane było w stanach Kentucky, Tennessee oraz Missouri (1).

Istnieją dwie strategie mające na celu ochronę ras bądź gatunków. Ochrona *in situ* obejmuje wszystkie środki mające na celu zachowanie zwierząt w środowisku ich naturalnego bytowania, natomiast *ex situ* to przeniesienie danej populacji i zachowanie jej genów w miejscach, takich jak ośrodki kriokonserwacji, farmy oraz ogrody zoologiczne. W tym celu stosuje się pobieranie i zamrażanie nasienia, oocytów oraz zarodków, jak również hodowlę w celu uzyskania potomstwa. Jednym z problemów populacji osła katalońskiego są nieuniknione kojarzenia pomiędzy spokrewnionymi ze sobą osobnikami,

<sup>1</sup> Studentka V roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

co niesie redukcję wartości fenotypowych cech produkcyjnych i reprodukcyjnych. Przyczynia się to do obniżenia bądź nawet wyginięcia populacji (2). Z tego powodu jednym z głównych celów programu ochrony rasy jest utrzymanie na jak najwyższym poziomie różnorodności genetycznej oraz zredukowanie endogamii poprzez stosowanie technologii, takich jak: sztuczne unasienianie, przenoszenie zarodków oraz zapłodnienie *in vitro*. Sprzyja temu również powstawanie banków gamet i zarodków. Wszystko to jednak wymaga znajomości specyficznych charakterystyk reprodukcyjnych każdego gatunku. Należy również pamiętać, że stosowanie wiedzy z zakresu jednego gatunku w rozrodzie gatunku blisko z nim spokrewnionego (np. koń – osioł) nie zawsze przynosi zadowalające rezultaty (3). Dlatego też niezbędne są szczegółowe badania w zakresie anatomii, fizjologii i biotechnologii rozrodu osłów katalońskich.

### Charakterystyka rozrodu samic

W badaniach przeprowadzonych przez zespół Tabnera (4) u 10 klaczy osła katalońskiego w wieku 3–12 lat obserwowano: zachowanie się samic w rui, cechy cyklu rujowego oraz zmiany zachodzące w jajnikach podczas 50 cykli rujowych (w tym 106 owulacji). Ponadto badanie obejmowało palpację *per rectum* z badaniem ultrasonograficznym każdego dnia podczas fazy rujowej (*oestrus*) i co drugi dzień podczas fazy porujowej (*dioestrus*). Odnotowywano średnicę największych pęcherzyków przedowulacyjnych oraz zmiany w ich kształcie. Za owulację (dzień 0) przyjmowano obecność ciała krwotocznego bądź moment, w którym pęcherzyk przedowulacyjny przybierał nieregularny kształt. Oceniano jego konsystencję, jak również napięcie ściany oraz wygląd macicy w badaniu ultrasonograficznym.

### Zachowania płciowe

Samice osiągają dojrzałość płciową w wieku około 3 lat (5). Często za cechy rozrodcze oślic przyjmuje się porównawczo cechy rozrodcze klaczy. Mimo że są to gatunki spokrewnione ze sobą, to jednak wykazują różnice w zachowaniu się oraz przebiegu czynności rozrodczych. Na przykład, w odróżnieniu od klaczy, najbardziej miarodajnym i przydatnym do rozpoznania objawem rui u samic osła są „ruchy przeżuujące”. Oślica w rui z dużą częstotliwością otwiera i zamyka jamę ustną. Objawy rui obejmowały również akceptację samca, zniechęcenie przy kontakcie z nim (odruch tolerancji), charakterystyczne układanie

małżowin usznych do tyłu, częste mikcje, zwiększone wydzielanie śliny, unoszenie ogona oraz rytmiczne otwieranie szpary sromowej. Oślice podczas rui mogą też prezentować zachowania typowe dla samców, takie jak próby krycia pozostałych samic, wokalizację, nieraz nawet wykazują typowy dla samców objaw zwany flehmen, polegający na odwijaniu warg i odsłanianiu dziąseł. Co ciekawe, wielokrotnie zaobserwowano przypadki synchronizacji rui pomiędzy samcami żyjącymi w grupie (4). Za najbardziej charakterystyczny objaw przyjmuje się wspomniane przeżuwanie.

### Cykl rujowy

Sezonowość cyklu rujowego samicy osła wciąż pozostaje tematem badań. Niektórzy autorzy opisują ten gatunek jako sezonowo poliestralny, inni jako poliestralny z tendencją do całorocznego przebiegu cyklu. W cytowanych badaniach (4) 9 samic owulowało regularnie przez cały rok, a jedna wykazała dwa cykle bez owulacji (54 i 35 dni), przy czym średnica pęcherzyków wynosiła poniżej 30 mm. Wzdłuż różnych autorów długość cyklu rujowego samic osła wynosi 23–25 dni, a sama ruja 6–9 dni (zwiększenie od 2 do 12 dni), zaś długość fazy *dioestrus* wynosi 17–18 dni. U samic osła katalońskiego długość cyklu rujowego wyniosła  $24,9 \pm 0,26$  dni, gdzie faza rujowa trwała  $5,64 \pm 0,2$  dni, a *dioestrus*  $19,83 \pm 0,36$  dni. W miesiącach zimowych zaobserwowano nieznacznie przedłużone fazy rui (4). Odnotowano nieznaczną przewagę owulacji z jajnika lewego (52,63%). Występowanie pojedynczych, podwójnych oraz potrójnych owulacji wynosiło odpowiednio 55,66, 42,4, 1,89%. Większość (75%) owulacji mnogich cechuje asynchroniczność, ze średnim odstępem 1,44 dnia. Mnogie owulacje dotyczyły tylko lewego jajnika w 23,4% przypadków, prawego w 19,15% oraz obu w 57,45% przypadków. W odróżnieniu od koni cięża bliźniacze są zazwyczaj donoszone, rzadko obserwuje się trudne porody (4). U większości ras osłów średnica pęcherzyka przedowulacyjnego na dzień przed owulacją wynosi około 36 mm (6). Dadarwal (7) opisał średni dzienny wzrost pęcherzyka podczas rui jako 2,7 mm/dzień. Natomiast zespół, w którym miałam okazję pracować (4) ustalił, że u samic osła katalońskiego obserwuje się pęcherzyki o większej średnicy (44,9 mm), czego przyczyną mogą być większe rozmiary osobników tej rasy w porównaniu z innymi. Przy mnogich owulacjach średnica pęcherzyków wyniosła  $44,1 \pm 0,6$  mm, natomiast przy pojedynczych  $46,3 \pm 0,9$  mm. Szybkość wzrostu pęcherzyków przedowulacyjnych

### Characteristics of Catalan donkey reproduction – attempts to save endangered breed

Purzycka K. Student of the Vth year, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

This paper aims at the presentation of attempts to save the unique donkey breed – Catalan donkey in Spain. In Spain there are six autochthonic donkey breeds. Catalan or Catalonian donkey population has been reported to decrease dramatically during past several years. Moreover, decreasing genetic variability put this breed in a danger of extinction. Numerous studies on Catalonian donkey reproduction are aiming at the protection of a breed. Among them are studies performed in order to apply reproductive technologies aiding to save the breed. Major signs of estrus in Catalonian jenny are: mouth clapping, urinating, male acceptance, depression of ears and movements of vulvar lips. Heterotypical behavior includes mounting, flehmen response and vocalization. Estrus cycle lasts  $24.9 \pm 0.26$  day with  $5.64 \pm 0.2$  day of estrus and  $19.83 \pm 0.36$  day of diestrus. The mean diameter of the preovulatory follicle at day -1 is  $44.9 \pm 0.5$  mm. Catalonian donkeys present male territorial behavior. Characteristic feature of male sexual behavior is the prolonged time (5–30 min), to reach erection with copulation lasting less than a minute. Generally, seminal volume is large (30–100 ml or more), with relatively high concentration of spermatozoa ( $\geq 2.5 \times 10^8$ /ml ejaculate), of which more than 75% are alive. Artificial insemination with fresh, chilled or frozen semen is the most common method used in Catalonian donkey reproduction. Important details influencing reproductive success of this endangered breed are presented and discussed.

**Keywords:** Catalonian donkey, reproduction, endangered breed.

wyniosła 3,7 mm/dzień przez dni -5 do -1, szybkość ta spada w ostatnich 24 godzinach przed owulacją. Ciało żółte o jednorodnej echogeniczności zaobserwowane zostało u większości samic osłów w pierwszym dniu po owulacji. Dla porównania u 50–70% samic konia ciało żółte występuje z nieechogeniczną strefą centralną.

### Określanie czasu owulacji

Podczas rui samice wykazują większe zainteresowanie samcami, wyraźniej prezentują odruch tolerancji, szczególnie między dniem -5 a -1. Rozmiar pęcherzyka wzrasta znacznie w dniach -4, -3 i -2. Jego konsystencja określona na podstawie badania rektalnego zmniejsza się od 3. dnia przed owulacją. W badaniu

ultrasonograficznym przyjmuje on kształt delikatnie wydłużony, w dniu owulacji zaś trójkątny. Napięcie ściany macicy zmniejsza się pomiędzy dniem -5 a -1. Spośród cech, takich jak: zachowanie rujowe, średnica i konsystencja pęcherzyka, jego obraz ultrasonograficzny oraz stan macicy, jako najbardziej przydatny dla przewidywania owulacji uznano rozmiar pęcherzyka. Można zatem wnioskować, że oślica, która prezentuje charakterystyczne otwieranie i zamykanie jamy ustnej, często oddaje mocz, wykazuje odruch tolerancji, posiada pęcherzyk większy niż 45 mm o miękkiej konsystencji, będzie owulować w najbliższych 24 godzinach z prawdopodobieństwem wynoszącym 90% (4). Badanie ultrasonograficzne umożliwia również diagnostykę ciąży w około 15 dniu, jej cotygodniową kontrolę oraz określanie płci płodu. Ciąża trwa średnio 12 miesięcy i 24 dni.

### Charakterystyka rozrodu u samców

Początki aktywności płciowej u samców występują bardzo wcześnie, jednak pełna dojrzałość płciowa osiągnięta jest powyżej 4 roku życia.

### Cechy anatomiczne

Istnieje bardzo wiele podobieństw pomiędzy samcami koni i osłów, jednakże proporcjonalnie do rozmiarów całego zwierzęcia zewnętrzne narządy rozrodcze są większe u osłów.

### Zachowanie płciowe

Ośle są zwierzętami terytorialnymi, w środowisku naturalnego bytowania na

wyznaczonym przez siebie terytorium kryją wszystkie samice, jakie się pojawią. Przejawiają zachowania dominacyjne w obecności innych samców. Cechą charakterystyczną wszystkich ras osłów jest wydłużony czas osiągnięcia erekcji oraz ejakulacji (5–30 min). Podczas kontaktu z samicą przed kopulacją dochodzi do wielokrotnego obwąchiwania samicy, szczególnie okolic zewnętrznych narządów płciowych, prezentowana jest charakterystyczna postawa flehmen, prawie zawsze podejmowane są próby krycia bez erekcji (nawet do 7 razy) oraz występuje wokalizacja. W ten sposób samce wyrażają pobudzenie płciowe. Sam akt kopulacji zazwyczaj trwa krótko (poniżej minuty; 6).

### Charakterystyka nasienia

#### Objętość ejakulatu i koncentracja plemników

Określa się całkowitą liczbę plemników w ejakulacie, co umożliwia wyliczenie możliwej do uzyskania liczby dawek nasienia do sztucznego umasieniania. Objętość ejakulatu u osłów różni się w zależności od rasy. U osłów katalońskich uzyskuje się od 30 do 100 ml nasienia, czasami więcej. Nasienie cechuje się wysoką koncentracją plemników (250 mln w 1 ml), natomiast całkowita liczba plemników w wynosi ok. 12 000 mln w ejakulacie (5).

#### Żywotność i wady morfologiczne plemników

Żywotność plemników warunkuje nienaruszona błona cytoplazmatyczna. Istnieją różne metody jej oceny, w tym barwienia. Ocena morfologii plemników dostarcza informacji o przebiegu spermatogenezy

(wady pierwotne) i dojrzwania plemników w najądrzu (wady drugorzędowe). Jako anomalie trzeciorzędowe klasyfikuje się powstałe w wyniku manipulacji nasieniem już po jego pobraniu. Żywotność plemników u osłów katalońskich określono na ponad 75%. Wady morfologiczne wykazują duże podobieństwo do wykrywanych w nasieniu ogierów. Ich procentowy udział wynosi ok. 18% (8).

### Ruchliwość plemników

W nasieniu osłów katalońskich odsetek plemników o ruchu postępowym został ustalony na poziomie 70–80%, a pH pomiędzy 7,6–7,7. Ruchliwość można określić bezpośrednio w badaniu mikroskopowym bądź przez system komputerowy (computer assisted sperm analysis – CASA). Preferowany jest ten ostatni, ponieważ pozwala ujednoczyć wyniki, unikając subiektywnej interpretacji obserwatora. Można również przeanalizować charakterystykę ruchu każdej komórki. System CASA polega na sukcesywnym wychwytywaniu obrazów przez mikroskop kontrastowo-fazowy i przetwarzaniu ich na obraz cyfrowy. Każdy obserwowany plemnik jest identyfikowany i na podstawie tysięcy ujęć odtwarzany jest jego wzór poruszania się oraz przebyte odcinki w polu widzenia mikroskopu. Przebyte odcinki są indywidualnie przetwarzane na serię matematycznych obliczeń. Zauważono, że powtarzają się pewne wzory ruchu plemników i na tej podstawie sklasyfikowano cztery subpopulacje o określonych parametrach ruchu. Obecnie trwają badania nad określeniem, która z podgrup komórek płciowych odgrywa największą rolę przy zapłodnieniu. Podobne cechy nasienia odkryto u takich gatunków, jak gazela, świnia, pies czy koń (9). Nasienie osłów katalońskich utrzymuje niezmiennie właściwości świeżego ejakulatu przez 2 godziny po odwirowaniu, przy utrzymaniu temperatury 20°C. Zachowana również zostaje struktura czterech subpopulacji i procentowy udział każdej z nich (8).

### Biotechnika rozrodu

#### Sztuczne unasienianie

Aktualnie jest to technika powszechnie stosowana na całym świecie w hodowli koni ze względu na wiele zalet, jak chociażby maksymalna dystrybucja genów, redukcja ryzyka związanego z chorobami przenoszonymi drogą płciową, wielokrotne unasienianie uzyskane z jednego ejakulatu. Jednakże do jej zastosowania niezbędna jest znajomość cyklu rozrodczego, momentu owulacji i sezonowości u samic. Ważnym czynnikiem jest również



Autorka z kłaczka osła katalońskiego w czwartym miesiącu ciąży



jakość nasienia i jego zdolność do zapłodnienia. Inseminować można nasieniem świeżym, schłodzonym bądź mrożonym. Zamrażanie nasienia osłów katalońskich w celu transportu i późniejszej sztucznej inseminacji jest jedną z metod wykorzystywanych w rozrodzie tej rasy. Po ejakulacji i podczas całego procesu manipulacji nasieniem błona cytoplazmatyczna plemnika narażona jest na wiele czynników środowiskowych, które mogą spowodować obniżenie ruchliwości plemników i ich zdolności do zapłodnienia. Jeśli nasienie nie zostanie wykorzystane jako świeże, niezbędne jest dodanie rozrzedzalnika, wirowanie i schłodzenie (10).

### Rozrzedzanie i wirowanie nasienia

Płyn nasienny (osocze nasienia) utworzony jest przez wydzieliny najądrza i dodatkowych gruczołów płciowych. Podczas krycia naturalnego nasienie zostaje zdeponowane w drogach rodnych samicy, gdzie kontakt plemników z osoczem nasienia jest o wiele mniejszy niż przy pobieraniu nasienia przy użyciu sztucznej pochwy. Wiele badań wykazało, że wysokie stężenia osocza nasienia powodują niepożądane efekty wobec ruchliwości plemników. Odpowiedzialne są za to konkretnie białka zawarte w płynie nasiennym. Rozwiązaniem jest rozrzedzanie nasienia. Alternatywą w eliminowaniu osocza nasienia i osiągnięciu wysokich stężeń plemników jest wirowanie. Rozrzedzenie nasienia odpowiednim rozrzedzalnikiem wydłuża żywotność plemników dzięki utrzymaniu ciągłości błony cytoplazmatycznej, która chroni komórki rozrodcze przed niekorzystnymi czynnikami środowiska, obniża negatywny wpływ osocza nasienia, kontroluje pH i osmolarność, zapewnia materiał odżywczy komórkom i zapobiega wzrostowi mikroorganizmów podczas przechowywania nasienia (11). Na przestrzeni lat opracowano wiele rozrzedzalników z różnorodnością komponentów, takich jak: cukry, elektrolity, bufony, składniki jaja kurzego oraz mleko. Różni autorzy opracowywali procedury przechowywania nasienia osłów w różnych typach rozrzedzalników i w odmiennych warunkach. Dotychczas najlepsze wyniki uzyskano, wykorzystując rozrzedzalniki na bazie mleka (12).

### Chłodzenie nasienia

Chłodzenie i przechowywanie nasienia rozrzedzonego umożliwia rozprowadzanie materiału genetycznego pomiędzy odseparowanymi populacjami osłów, gdyż umożliwia transport nasienia do miejsca przebywania klaczy. Chłodzenie obniża podstawowy metabolizm plemników, jednocześnie



Osły katalońskie podczas krycia naturalnego; samiec prezentuje odruch flehmen

utrzymując ich żywotność, ogranicza też wzrost mikroorganizmów. Temperatura powszechnie stosowana wynosi 4–6°C, gdyż jest to temperatura optymalna do utrzymania ruchliwości plemników (13). Moment krytyczny to obniżanie temperatury z 37 do 8°C, zwłaszcza gdy tempo obniżania wynosi więcej niż 0,3°C/min, ponieważ istnieje ryzyko szoku termicznego. Wówczas plemniki mają obniżony metabolizm, tracą niektóre komponenty komórkowe, obniża się ich ruchliwość i zdolność do zapłodnienia (14).

### Kriokonserwacja nasienia

Kriokonserwacja jest to proces umożliwiający przechowywanie plemników przez długi okres, praktycznie w nieskończoność. Umożliwia to zachowanie materiału genetycznego zwierząt o wysokiej wartości oraz zagrożonych wyginięciem. Zazwyczaj metody kriokonserwacji u osłów ekstrapolowane są bezpośrednio z metod stosowanych u koni. W jednej z prac (15), używając kombinacji różnych krioprotektorów (DMSO, DME, DMA i glicerol), uzyskano bardzo dobre wyniki w utrzymaniu ruchliwości oraz ciągłości błony cytoplazmatycznej plemników w nasieniu poddanym rozmrożeniu. Niestety nie udało się uzyskać ciąży u żadnej spośród 53 unasiennionych klaczy. Inne doświadczenie (16) wykazało, że podczas inseminacji zarówno klaczy, jak i samic osła nasieniem schłodzonym obserwowano podobne wyniki, natomiast przy inseminacji nasieniem mrożonym wyniki u samic osłów były gorsze o ponad 20%. Tym samym próbowano poprawić parametry nasienia po rozmrożeniu, eliminując krioprotektor, jednak nie zaobserwowano żadnej poprawy w płodności. Konieczne było wykonanie dodatkowych badań w zakresie wrażliwości plemników

osła na proces zamrażania oraz odpowiedzi ze strony macicy samic osłów na sztuczne unasiennianie nasieniem mrożonym z wykorzystaniem różnych krioprotektorów (14).

U samic osła katalońskiego w przypadku krycia naturalnego, unasienniania nasieniem świeżym bądź schłodzonym osiągnano satysfakcjonujące rezultaty w postaci ciąży. Podczas wielu prób zauważono, że przy inseminacji nasieniem mrożonym prawie nigdy nie dochodziło do zapłodnienia. Bardziej szczegółowa analiza zagadnienia pozwoliła na sformułowanie kilku hipotez. Jedną z nich dotyczyła cech anatomicznych układu rozrodczego samic. Szyjka macicy u samicy osła jest dłuższa i węższa niż u klaczy. W znacznym stopniu wystaje ona również do światła pochwy, co utrudnia inseminację. Ponadto w przypadku trudnego porodu mała średnica szyjki macicy predysponuje samice osła do urazów (17). Zadowolające wyniki przy inseminacji nasieniem schłodzonym i świeżym wykazały, że morfologia szyjki macicy nie stanowi zasadniczej przeszkody. W badaniu ultrasonograficznym uwagę zwracał rozległy obrzęk ściany całej macicy. Przyczyną była silna reakcja zapalna na poziomie *endometrium*. Wykonano zatem wymazy z błony śluzowej macicy oraz pobrano wycinki ściany metodą biopsji. Wykazano silny naciek granulocytów obojętnochłonnych. Komórki zapalne odpowiedzialne były za fagocytózę plemników, co znacznie obniżało ich liczbę oraz uniemożliwiło zapłodnienie. Główne strategie podjęte w celu obniżenia odpowiedzi zapalnej *endometrium* dotyczyły podwyższenia liczby plemników w nasieniu mrożonym, aby po związaniu się z neutrofilami i wysyceniu wszystkich komórek żernych pozostałe plemniki mogły dokonać procesu zapłodnienia (8). Przedmiotem badań jest

również wykorzystanie ketoprofenu bądź deksametazonu do obniżenia odpowiedzi zapalnej u samic. Pierwsze wyniki zapowiadają się obiecująco.

## Piśmiennictwo

1. Briggs H.M.: *Razas modernas de animals domésticos*. Zaragoza, Acribia 1971.
2. Aranguen J.A.: *Caracterización y relaciones filogenéticas de cinco razas asnales españolas en peligro de extinción mediante la utilización de marcadores microsatélites: su importancia en los programas de conservación*. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona 2002.
3. Pukazhenti B.S., Wildt D.E.: Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reprod. Fertil. Develop.* 2004, **16**, 33-46.
4. Taberner E., Medrano A., Peña A., Rigau T., Miró J.: Oestrus cycle characteristics and prediction of ovulation in Catalanian jennies. *Theriogenology* 2008, **70**, 1489-1497.
5. Miró J., Muñoz E., Piedrafito J., Quintero-Moreno A.: Prediction of the day of ovulation in mares through physiological parameters measured during estrous. *Revista Científica* 2004 **FCV-LUZ XIV(1)**, 54-58.
6. Trimeche A., Tainturier D.: Étude échographique de la cinétique folliculaire des baudettes du Poitou pendant l'oestrus au cours de printemps et de l'été. *Revue Méd. Vét.* 1995, **146**, 743-748.
7. Dadarwal D., Tandon S.N., Purohit G.N., Pareek P.K.: Ultrasonographic evaluation of uterine involution and post-partum follicular dynamics in French jennies (*Equus asinus*). *Theriogenology* 2004, **62**, 257-264.
8. Taberner E.: *Tecnologies reproductives aplicades a la conservació del burra Catalá*. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona 2010.
9. Miró J., Taberner E., Rivera M., Peña A., Medrano A., Rigau T., Peñalba A.: (2009) Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology* 2009, **72**, 1017-1022.
10. Aurich C.: Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2005, **89**, 65-75.
11. Katila T.: Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology* 1997, **48**, 1217-1227.
12. Serres C.: *Evaluación y conservación del semen en el asno Zamorano-Leonés*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid 2003.
13. Varner D.D., Blanchard T.L., Meyers P.J., Meyers S.A.: Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. *Theriogenology* 1989, **32**, 515-525.
14. Miró J., Lobo V., Quintero-Moreno A., Medrano A., Peña A., Rigau T.: Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology* 2005, **63**, 1706-1716.
15. Oliveira J.V., Alvarenga M.A., Melo C.M., Macedo L.M., Dell'Aqua J.A., Papa F.O.: Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 2006, **94**, 82-84.
16. Vidament M., Vincent P., Martin F-X., Magistrini M., Blesbois E.: Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Anim. Reprod. Sci.* 2009, **112**, 22-25.
17. Vendramini O.M., Guintard C., Moreau J., Tainturier D.: Cervix conformation: a first anatomical approach in Baudet du Poitou jenny asses. *Anim. Sci.* 1998, **66**, 741-744.

## Podziękowanie

Składam serdeczne podziękowania dr. hab. Andrzejowi Maxowi za nieocenioną pomoc przy korekcie tekstu oraz cenne wskazówki.

Katarzyna Purzycka, e-mail: katarzyna\_purzycka@wp.pl; autorka prowadzi bloga weterynaryjnego pod adresem: [www.vetforlife.blogspot.com](http://www.vetforlife.blogspot.com)