

WIESŁAW KARETA, JAN PILCH, STEFAN WIERZBOWSKI

Zamrażanie nasienia tryków w niskich temperaturach

III. Płodność owiec po nasieniu mrożonym*)

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt Instytutu Zootechniki, Balice k. Krakowa
Kierownik: doc. dr S. WIERZBOWSKI

W latach 1960—1966 ukazało się szereg prac poświęconych inseminacji owiec nasieniem mrożonym, z których kilka sygnalizowało możliwość uzyskania stosunkowo wysokiej płodności po nasieniu przechowywanym w niskich temperaturach (5, 9, 15, 17, 18, 22). Jest jednak znamienne i na to zwrócił uwagę Łopyrin (16), że zarówno autorom tych prac jak również innym badaczom nie udało się wówczas powtórzyć uzyskanych wyników. W latach następnych opublikowane zostały dalsze prace donoszące o osiągnięciu jednak pewnego postępu w tym zakresie.

Badania nad zamrażaniem nasienia tryków podjęte w Instytucie w 1963 r. obejmowały w początkowej fazie próby określenia przydatności niektórych rozcieńczalników używanych przy zamrażaniu nasienia buhajów oraz warunków wprowadzania dodatku glicerolu (2). W następnym etapie prowadzono prace nad metodyką szybkiego zamrażania nasienia oraz warunkami w jakich nasienie winno być rozmrażane. W 1968 r. po inseminacji 44 i 53 owiec w dwu odrębnych stadach uzyskano odpowiednio 20,4 i 22,6% wykoceń (10). W następnych latach prowadzono dalsze badania nad metodyką zamrażania nasienia oraz techniką i organizacją inseminacji owiec nasieniem mrożonym. Metodyka tych prac oraz uzyskane wyniki zostały zebrane w niniejszym opracowaniu.

Materiał i metody

1. Selekcja tryków pod względem przydatności nasienia do zamrażania.

Tryki przewidziane do inseminacji poddawano ocenie zarówno pod względem popędu płciowego jak i jakości nasienia. Nasienie pobierano w ciągu trzech kolejnych dni po dwa ejakulatory. Jako prowokator używano grzejącej się owcy. Eliminowano tryki o słabym *libido* oraz takie, których nasienie nie spełniało następujących warunków: objętość — 0,8 ml, ruch postępowy — 80%, ruch falowy — + + + +, koncentracja — $3 \times 10^6/\text{mm}^3$. O zakwalifikowaniu tryka do doświadczenia decydował powtarzający się wynik mrożenia nasienia wynoszący co najmniej 30% plemników ruchliwych. Ostateczną decyzję o dopuszczeniu tryka do mrożenia podejmowano po sprawdzeniu płodności na podstawie poprzednich stanówek (ok. 80% NR). Ogółem przebadano 14 tryków rasy merynos w wieku 1,5 — 6 lat. Z tej liczby do doświadczenia zakwalifikowano 4 tryki w wieku 4 — 6 lat o wadze 100—115 kg. Mrożenie nasienia w 1969 r. przeprowadzono bezpośrednio przed rozpoczęciem stanówki na miejscu w owczar-

ni. Przygotowania do sezonu w 1970 r. rozpoczęto jesienią poprzedniego roku przewożąc tryki na okres mrożenia nasienia do Balic. Nasienie pobierano przez 2 miesiące 3 razy w tygodniu po 2, a sporadycznie po 3 ejakulatory.

2. Zamrażanie nasienia

Bezpośrednio po pobraniu i ocenie, nasienie rozrzedzano rozcieńczalnikami o następującym składzie:

Roztwór 2,9% dwuwodnego cytrynianu sodu	— 72 ml
Fruktoza	— 1,25 g
Żółtko jaja kurzego	— 20 ml
Glicerol	— 8 ml

Rozcieńczanie przeprowadzono w temperaturze 30°C w stosunku 1:2 do 1:8 tak aby po mrożeniu w jednej dawce inseminacyjnej znajdowało się około 50×10^6 plemników o ruchu postępowym. Rozcieńczone nasienie przetrzymywano w temperaturze pokojowej przez okres 20 minut, a następnie przenoszono do temperatury 2—5°C. Po ekwilibracji trwającej 4—6 godzin, łączono ejakulatory tego samego tryka, a następnie nasienie rozlewano po 0,5 ml do próbek szklanych o objętości 1,5 ml. Zakorkowane próbki z nasieniem układano na perforowanej tacy, którą następnie umieszczano w temp. około —180°C zawieszając ją w kontenerze na wysokości około 10 cm nad poziomem cieczy. Spadek temperatury w zamrażanym nasieniu wynosił około 35°C/min. Po upływie 5 minut nasienie przekładano do ciekłego azotu. W czasie 1 cyklu zamrażano około 30 dawek nasienia.

3. Inseminacja owiec

Nasienie rozmrażano w łaźni wodnej o temperaturze 40°C. Do inseminacji używano ejakulatów o ruchliwości co najmniej 30% plemników o ruchu postępowym. W dawce inseminacyjnej o objętości 0,2 ml znajdowało się od 28 do 72×10^6 plemników o ruchu postępowym. Czas konserwacji nasienia użytego do inseminacji wynosił od 4 godzin do 200 dni. Grzejące się owce wyszukiwano przy pomocy tryków probierów z podwieszonymi fartuchami. Zarówno zakładanie fartuchów jak i wyszukiwanie owiec odbywało się pod ścisłą kontrolą co wykluczało możliwość przypadkowego pokrycia owcy. Pierwsze unasienianie przeprowadzono w 10—12 godzin od chwili stwierdzenia rui, a drugie po dalszych 12 godzinach. W 1970 r. wprowadzono trzeci zabieg inseminacyjny u owiec grzejących się jeszcze po 36 godzinach od chwili pierwszego wyszukania. Trwanie rui kontrolowano trykiem probierem co 12 godzin aż do jej zakończenia. Owce inseminowano tylko w jednej rui na początku sezonu. Unasieniano metodą wzornikową wprowadzając nasienie do szyjki macicznej. Używano strzykawki inseminacyjnej zakończonej pipetą ze zwężoną końcówką pozwalającą na głębokie wprowadzenie do szyjki macicznej. Pojedyncze owce, u których napotymano na trudności przy wprowadzaniu pipety do szyjki, unasieniano dopochwowo w okolicy zewnętrznego ujścia szyjki macicznej podwójną dawką nasienia.

Statystyczne opracowanie wyników.

Uzyskane wyniki wyrażone są procentem wykoceń po inseminacji w jednej rui. Przy statystycznym opracowaniu danych posłużono się testem χ^2 (19).

*) Poprzednie prace z tej serii były drukowane w *Medycynie Wet.*: nr 4 i 7/1966.

Wyniki

Od 4 tryków użytych w doświadczeniu pobrano i zamrożono ogółem 124 ejakulatory. Z tej liczby zakwalifikowano 80 jako spełniające ustalone wymogi. Zatem, „współczynnik efektywności zamrażania” ejakulatów wynosił 64,5%. Wartości tego współczynnika charakteryzowały się dużą rozpiętością u poszczególnych tryków. Najniższą wartość, bo 21% uzyskano u tryka nr 2703, najwyższą zaś u tryka nr 1671 w sezonie 1970 — 88,6%. Natomiast w poprzednim sezonie tylko 5 ejakulatów (tj. 35,7%) tego tryka z 14 pobranych dobrze się zamroziło. Ogółem, w sezonie 1969, kiedy nasienie zamrażano na miejscu w owczarni bezpośrednio przed inseminacją (maj), współczynnik efektywności zamrażania wynosił 48,2%. W sezonie 1970, kiedy mrożenie przeprowadzano w Balicach (listopad — styczeń) współczynnik ten osiągnął wartość 69,5%. Z jednego ejakulatu uzyskiwano średnio 32 porcje nasienia.

W wyniku przeprowadzonej inseminacji 204 owiec uzyskano średnio 48% płodności przy czym w 1969 r. wykociło się 47,1% a w 1970 r. — 48,2% inseminowanych owiec (tab. 1). Nasieniem z jednego ejakulatu unasieniano średnio 8 — 9 owiec. W 1969 r. nie zaobserwowano różnic między ilością owiec niepowtarzających a wykończonych, natomiast w 1970 r. 5 owiec nie wykazujących rui po inseminacji okazało się jałowymi (ok. 3%).

Płodność po poszczególnych trykach kształtowała się od 28,6% do 62,5%, jednak wobec nielicznych tylko sztuk inseminowanych nasieniem tryków nr 1671 oraz nr 2703 wyniki po tych trykach mają tylko ograniczoną wartość. Występująca w sezonie 1970 różnica w ilości wykończonych owiec po tryku nr 1671 wynosząca między owczarniami około 10% była spowodowana prawdopodobnie trudniejszymi warunkami w jakich była prowadzona inseminacja w pierwszej owczarni (tab. 1).

Tab. 1. Podatność nasienia na zamrażanie i płodność po poszczególnych trykach

Rok	Numer tryka	Ejakulatów			Inseminowano owiec	Nie powtórzyło rui (NR)		Wykończonych		
		Pobrano liczba	Zamrożono efektywnie			owiec	owiec	%	owiec	%
			liczba	%						
1969	1671	14	5	35,7	7	2	28,6	2	28,6	
	3101	15	9	60,0	27	14	51,8	14	51,8	
1970	1671	44	39	88,6	70	32	45,7	30*	42,8	
					55	31	56,4	29	52,7	
	03048	28	21	75,0	37	19	51,3	18	48,6	
	2703	23	6	26,1	8	5	62,5	5	62,5	
Razem:		124	80	64,5	204	103	50,5	98	48,0	

* — w tym 1 owca poroniła na 10 dni przed przewidywanym terminem wykotu.

Zestawiając wyniki wykotów w zależności od ilości stosowanych zabiegów inseminacyjnych stwierdzono, że po dwukrotnej inseminacji 127 owiec wykociło się 60 tj. 47,2%. Natomiast z 40 owiec, które ze względu na dłuższy okres grzania się unasieniono trzykrotnie, wykociło się 23 co stanowiło 57,5% (tab. 2). Stwierdzona różnica była statystycznie istotna ($P < 0,05$).

Tab. 2. Wyniki wykotów w zależności od ilości zabiegów inseminacyjnych i głębokości wprowadzania nasienia do szyjki macicznej

Ilość zabiegów inseminacyjnych	Głębokość wprowadzenia	Dopochwowo i doszyjkowo na głębokość do 0,5 cm	Doszyjkowo na głębokość		Razem
			0,5—1,5 cm	>1,5 cm	
			Insemin.	Wykończonych	
II	Insemin.	14	52	61	127
	Wykończonych	4	23	33	60
	%	28,6	44,2	54,1	47,2
III	Insemin.	4	16	20	40
	Wykończonych	2	10	11	23
	%	50,0	62,5	55,0	57,5
Razem	Insemin.	18	68	81	167
	Wykończonych	6	33	44	83
	%	33,3	48,5	54,3	49,7

U w a g a: nie uwzględniono owiec u których głębokość deponowania nasienia nie była ściśle ustalona.

Przeprowadzono również analizę wpływu głębokości wprowadzania nasienia na wynik inseminacji. Przy deponowaniu nasienia dopochwowo w okolicy zewnętrznego ujścia szyjki macicznej względnie doszyjkowo na głębokość do 0,5 cm zakociło się 33,3% inseminowanych sztuk. W grupie owiec, u których wprowadzano nasienie do szyjki macicznej na głębokość 0,5—1,5 cm zakociło się 48,5%. Najwyższy odsetek zakończonych owiec, bo 54,3% za-

rejestrowano w grupie inseminowanej doszyjkowo na głębokość powyżej 1,5 cm (tab. 2). Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami były jednak statystycznie nieistotne ($P < 0,05$).

Dyskusja

W stosunku do metodyki mrożenia nasienia tryka podanej w 1968 r. (10) nie zostały tu wprowadzone zasadnicze zmiany ani w zakresie składu rozcieńczalnika ani też procesu zamrażania nasienia. Uzyskaną poprawę zapłodnialności, wynoszącą ok. 27% w stosunku do poprzednich wyników, należy przypisać w pierwszym rzędzie daleko posuniętej selekcji tryków pod względem przydatności nasienia do mrożenia. Z 14 badanych tryków jedynie od 4 uzyskiwano nasienia poddające się mrożeniu w stopniu rokującym jego późniejszą płodność. Obserwacje te wskazują na indywidualną podatność nasienia na zamrażanie u tego gatunku na co zwrócili uwagę również Zelfelf i Kautz (23).

Następnym czynnikiem, który mógł również wpływać na poprawę wyników była ostra selekcja nasienia mrożonego wybranych tryków. W rezultacie zakwalifikowano do wykorzystania w jednym sezonie 48%, a w drugim 69% zamrożonych ejakulatów. Zaznaczyła się tutaj różnica w efektywności mrożenia w zależności od pory roku. W okresie jesienno-zimowym uzyskiwano nieco lepsze rezultaty niż pod koniec zimy i z początku wiosny. Obserwacje te znalazły potwierdzenie również w okresie 1970—1971, gdzie w marcu i kwietniu wyniki mrożenia były znacznie gorsze niż w miesiącach zimowych.

Istotnym czynnikiem wydaje się także zabezpieczenie możliwie jak najlepszych warunków postępowania z nasieniem. Jest to praktycznie nieosiągalne w owczarniach, w związku z tym od 1969 r. wprowadzono zasadę przewożenia tryków-dawców na okres mrożenia nasienia do Balic.

Uzyskanie w dwóch kolejnych sezonach średnio 48% wykoceń po inseminacji w jednej rui nie jest jeszcze rezultatem zadawalającym dla potrzeb praktyki hodowlanej. Odpowiada on w przybliżeniu wynikom uzyskanym przez Salamona i Lightfoota (21), którzy zamrażając nasienie w kulkach uzyskali 46,3 i 49,3% wykoceń. Stosując tę samą metodę mrożenia Frazer (6) osiągnął 31% wykoceń. Z kolei Colas i Brice (4) po inseminacji owiec nasieniem zamrażanym w słomkach uzyskali 44% i 68% zaś Łoginowa i Żółtobrjucha (14) po nasieniu mrożonym w ampulkach otrzymali 32,5% wykoceń.

Jak z tego wynika stosując trzy podstawowe metody mrożenia nasienia, a więc w kulkach, słomkach i ampulkach uzyskiwano zbliżone wyniki. Trudniejsze do porównania są rezultaty oceniane na podstawie niepowtarzal-

ności. Stosując takie kryterium Kalew i wsp. (8) uzyskali 28,6 i 41% a Colas (3) — 60% prawdopodobnie zakończonych owiec. Natomiast Aamdal i Andersen (1) diagnozując ciężę przy pomocy promieni Rentgena oraz przeprowadzając kontrolę poubojową stwierdzili 61 i 62,5% kotności zaś Colas (2) stosując endoskopię stwierdził 42,5% zapłodnień.

Rezultaty te są jednak niższe od uzyskiwanych po inseminacji nasieniem płynnym co wskazuje, że w procesie mrożenia niezależnie od stosowanej metody postępowania dochodzi prawdopodobnie do uszkodzenia części plemników powodując obniżenie płodności nasienia mrożonego. Wyjaśnienie to bazuje na wynikach prac Healey'a (7) oraz Quinn'a i wsp. (20), którzy opierając się na obrazie uzyskanym przy pomocy mikroskopu elektronowego stwierdzili uszkodzenie akrosomów występujące u znacznego procentu plemników tryka po mrożeniu.

Przeprowadzone badania pozwoliły też na zebranie informacji o wpływie samego zabiegu inseminacji nasieniem mrożonym na wyniki zapłodnień. Wystąpiła wyraźna tendencja w kierunku poprawy wyników w zależności od głębokości deponowania nasienia w drogach rodnych owiec przy czym najlepsze rezultaty uzyskano wprowadzając nasienie do szyjki macicznej na głębokość powyżej 1,5 cm. Odmienne rezultaty uzyskali Salamon i Lightfoot (21), którzy lepsze wyniki osiągnęli przy płytszym deponowaniu nasienia w szyjce (49%), a wprowadzając je na głębokość powyżej 2 cm tylko 2%. Podciąganie szyjki macicznej celem ułatwienia wprowadzenia pipety stanowiło zdaniem Ten Jen Bon'a (22) czynnik warunkujący poprawę wyników o 10,6% natomiast Salamon i Lightfoot (21) stosując podobny sposób postępowania stwierdzili obniżenie procentu zapłodnień średnio o 13,2% zależnie od głębokości deponowania nasienia.

Następnym czynnikiem, który być może wpływa na wyniki inseminacji nasieniem mrożonym jest krotność inseminacji owiec podczas tej samej rui. Przy dwukrotnej inseminacji wystąpiła tendencja do poprawy wyników w miarę wzrostu głębokości deponowania nasienia. Natomiast przy trzykrotnym unasienianiu różnica ta uległa prawie zatarciu. Rezultaty te w pewnym sensie potwierdzają obserwacje Łoginowej i Żółtobrjucha (14), którzy uważają, że nasienie mrożone nie przeżywa w drogach rodnych owiec dłużej niż 9 godzin i zalecają inseminację w odstępach 10—12 godzin (13).

W naszym doświadczeniu przetrzymywanie wyszukanych owiec przez 12 godzin do pierwszej inseminacji a następnie przeprowadzanie drugiego i trzeciego zabiegu w odstępach 12 godzinnych miało zapewnić obecność zdolnych do zapłodnienia plemników w jajowo-

dach w czasie zstępowania komórki jajowej. Wprowadzenie trzeciego zabiegu podwyższyło wyniki wykotów o 13,9%. Koresponduje to z danymi Łoginowej i Żeltobryjucha (14) jednak przy niższej ogólnej płodności osiągniętej przez tych autorów. W przeciwieństwie do powyższych danych Kuźniecowa i Wołkow (11) nie stwierdzili dodatniego wpływu wielokrotnej inseminacji owiec. Lightfoot i Salomon (12) uważają jednak, że plemniki zachowują zdolność zapładniającą w ciągu 18–35 godzin przebywania w drogach rodnych owiec. Stosując jednorazową inseminację w ciągu rui uzyskali 22,6 i 39,7% kotności, a po dwukrotnej inseminacji 38,8 i 53%.

Stosunkowo niewielka rozpiętość pomiędzy najniższą i najwyższą ilością plemników w dawce inseminacyjnej utrudniła wywartościowanie tego czynnika w naszym doświadczeniu. Zaznaczyła się jednak tendencja do nieco lepszych wyników przy niższych ilościach plemników ruchliwych w dawce. Tymczasem większość autorów zwraca szczególną uwagę na konieczność podawania dużej ilości plemników w dawce. Zwiększając dawkę plemników z 50 do 150×10^6 Salomon i Lightfoot (21) uzyskali poprawę zapłodnień z 21,6 na 43,8%. Jeszcze wyższe dawki stosował Colas (3) wprowadzając minimum 190×10^6 plemników żywych i osiągając 42,5% zapłodnień stwierdzonych techniką endoskopii. Natomiast Kalew i wsp. (8) stosując dawki zawierające $50-60 \times 10^6$ plemników żywych uzyskali średnio 32,9% niepowtarzających sztuk. Obserwowana przez nas różnica na korzyść niższej dawki plemników może być tłumaczona wyższym procentem plemników o ruchu postępowym po mrożeniu w ejakulatach o większym stopniu rozcieńczenia.

Dotychczasowy stan badań wskazuje na rozpiętość zagadnień wiążących się z długotrwałą konserwacją nasienia tryka. Zagadnieniem pierwszoplanowym wydają się być badania takich środowisk osłaniających, które będą dostatecznie zabezpieczały nasienie tryka przed ujemnymi skutkami zjawisk zachodzących w procesie obniżenia i podwyższania temperatury.

Piśmiennictwo

1. Aamdal J., Andersen K.: Proc. Vith Int. Congr. Anim. Reprod., A. I., II, 677, 1968.
2. Branny J., Pilch J., Wierzbowski S.: Medycyna Wet., 22, 290, 1966.
3. Colas G.: Assoc. Franc. de Zootech., Rapport nr 4, 1969.
4. Colas G., Brice G.: Anns Zootech., 3, 353, 1970.
5. Feredean T., Bragaru Fl.: Lucr. stiint. Inst. Cerc. zootech., 21, 357, 1964.
6. Fraser A. F.: Proc. Vith Int. Congr. Anim. Reprod., A. I., II, 1033, 1968.
7. Healey P.: J. Reprod. Fert., 18, 21, 1969.
8. Kalev G., Zagorski Dr., Zakhariev Zd., Kicev G., Georgiev G.: Vet. Nauki, VI, 13, 1969.
9. Korotkov A. I.: Ref. Zhurn., 17, 58, 136, 1964.
10. Kareta W.: Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. (w druku).
11. Kuzniecov M. P., Volkov A. S.: Doklady sov. uc. na mezhdunar. kongr. po razmnozh. i iskusstv. osem. zhiv., 159, 1968.
12. Lightfoot R. J., Salomon S.: J. Reprod. Fert., 22, 385, 1970.
13. Loginova N. V.: Ovcevodstvo, 8, 20, 1962.
14. Loginova N. V., Zheltobryukh N. A.: Ovcevodstvo, 9, 22, 1968.

15. Lopatko N. I., Ostasko F. I.: Ovcevodstvo, 8, 15, 1962.
16. Lopyrin A. I.: Ovcevodstvo, 9, 29, 1970.
17. Mackepladze I. B., Gugusvili K. F., Bregadze M. A., Kharatisvili G.: Zhivotnovodstvo, 2, 77, 1960.
18. Morozov V. A.: Ref. Zhurn., 15, 58, 127, 1964.
19. Oktaba W.: Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalnictwa, PWN, 1966.
20. Quinn P. J., White J. G., Clelland K. W.: J. Reprod. Fert., 18, 209, 1969.
21. Salomon S., Lightfoot R. J.: J. Reprod. Fert., 22, 409, 1970.
22. Ten Jen Bon: Ovcevodstvo, 8, 11, 1965.
23. Zelfel S., Kautz M.: Fortpfl. Haust., 2/3, 167, 1965.

Adres autora: Wiesław Kareta, Balice k. Krakowa, Instytut Zootechniki.

Карета В., Пильх Е., Вежбовски С. — Замораживание семени баранов в низких температурах. III. Плодовитость овец осеменяемых замороженным семенем

Семя разбавляли в соотношении 1:2–8 желточно-лимонно-фруктозовым разбавителем содержащим 8% глицерина, в температуре 30°. Эквилибрацию производили 4–6 часов при температуре 2–3°. Пробирки, содержащие по 0,5 мл семени, замораживали в температуре –180° на перфорированном подносе подвешенном на 10 см над уровнем азота. Снижение температуры равнялось около 35°/мин. Через 5 минут семя вкладывали в азот. Размораживали семя в водяной бане в температуре 40°. Осеменительная доза ёмкостью 0,2 мл содержала $28-72 \times 10^6$ живичков оказывающих поступательное движение. Овец находящихся в охоте отыскивали два раза в день при помощи пробника. Первое осеменение производили в 12 часов после определения охоты у овец, а второе в 12 часов после первого. Третьему осеменению подвергли 24% овец обнаруживающих в дальнейшем симптоме охоты. Осеменение проводили вводя семя в шейку матки при помощи влагалищного зеркала. В результате селекции в направлении хорошего выдерживания семенем замораживания закалифицировали для инсеминации 4-х баранов, что составляло 28,5% исследуемых производителей. Из 124 взятых эякулятов с успехом заморозили 80, т.е. 64,5%. Из 204 овец оплодотворенных в одной охоте родили ягнята 98 т.е. 48%. По мере глубины введения семени в шейку матки, увеличивалась оплодотворяемость от 33,3 до 54,3%. Применение 3-кратного осеменения увеличило число окотов на 13,9%.

Kareta W., Pilch J., Wierzbowski S. — Deep freezing of ram semen. III. Fertility of ewes after insemination with frozen semen.

The semen was diluted at 30°C in the rate of 1:2 — 1:8 with an egg yolk-citrate-fructose diluent to which glycerol (8.0%) had been added. Equilibration lasted for 4–6 hours at 2–3°C. Freezing was performed at –180°C on a perforated rack suspended 10 cm over the level of liquid. Ampules of 1.5 ml each containing 0.5 ml of semen were used. The decline of temperature was about 35°C/min. The semen was put into liquid nitrogen after 5 min. Thawing was carried out in a water bath at 40°C. Each 0.2 ml insemination dose contained $28-72 \times 10^6$ progressively moving spermatozoa. Oestrus of ewes was detected with a teaser ram twice a day. First insemination was carried out 12 hrs after oestrus had been demonstrated and the second one 12 hrs later. The third insemination involved 24% of ewes being still in oestrus. Insemination was performed by speculum method introducing semen into the cervix uteri. On the basis of semen susceptibility to freezing, 4 rams were chosen which constituted 28.5% of the total number of sires tested. Out of 124 ejaculates 80 (64.5%) were effectively frozen. The insemination of 204 ewes resulted in 98 lambings (48%). The deeper the semen was deposited into the cervix the higher rate of conception was stated which ranged from 33.3 to 54.3%. Three-fold inseminations improved the lambing results by 13.9%.