

ANDRZEJ ŁYCZYŃSKI, HILARY KORZYNIEWSKI

Wpływ przetrzymywania nasienia knurów przed zamrożeniem w atmosferze wodoru na jego zdolność zapładniającą*)

Z Instytutu Hodowli i Technologii Produkcji Zwierzęcej AR w Poznaniu

Doświadczenia przeprowadzone przez Chaćpuridze (3), Kononova i wsp. (4), Milovanova i wsp. (10) wskazują, że przetrzymywanie nasienia knurów w warunkach tlenowych po jego pobraniu przez okres 1 godziny, a następnie wysycenie go wodorem i przetrzymywanie przez okres kilku godzin przed zamrożeniem w tych warunkach, pozwala na uzyskanie dobrych wyników płodności loch w próbach inseminacyjnych.

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie ww. technologii w naszych warunkach, oraz zbadanie zdolności zapładniającej tak przygotowanego nasienia.

Materiał i metody

Pobieranie, ocenę i wstępną obróbkę nasienia przeprowadzono w sposób opisany poprzednio (6, 9).

Bezpośrednio po ocenie makro- i mikroskopowej nasienia (2, 7), umieszczano je w nie zamkniętych naczyniach szklanych w termosie o temperaturze pokojowej (20°C) i przetrzymywano bez rozrzedzenia 1–1,5 godziny. Uprzednio przygotowany rozcieńczalnik wirovano przy około 3 tys. obr./min. przez 15 minut, a do rozrzedzania stosowano supernatant. Rozrzedzanie nasienia przeprowadzano w stosunku 1:2 (nasienie:rozcieńczalnik), rozcieńczalnikiem o składzie:

glikoza	4 g
żółtko jaja	20% v/v
woda do iniekcji do	100 ml
glicerol	2% v/v.

Bezpośrednio po rozrzedzeniu nasienia zlewano je do kolby Erlenmayera, szczelnie zamykano korkiem i przy pomocy pompy próżniowej wysysano powietrze, jednocześnie delikatnie mieszając rozrzedzone nasienie. Następnie drugim kranem wprowadzano wodór, aż do pełnego wysycenia, trzymając kolbę Erlenmayera do góry dnem. Nasyczone wodorem nasienie pozostawiano w temperaturze pokojowej przez okres 4–5 godzin. Po tym czasie nasienie przenoszono do chłodzi i przetrzymywano je w łaźni wodnej w temperaturze 0°–5°C przez okres 1 godziny. Zamrażania nasienia dokonywano na płytach zestalonego CO₂, wg metody Nagase i Niwa (11) w objętości 0,13 ml, a po około 5 minutach przenoszono je do ciekłego azotu i przechowywano przez około 30 dni. Z 20 pobranych ejakulatów 13 uznano za przydatne do unasieniania, a zawierały one po rozmrożeniu 20–40% plemników o ruchu postępowym.

Nasienie do inseminacji rozmrażano w łaźni wodnej o temperaturze 65°–80°C (w zależności od objętości rozmrażanego nasienia) w rozcieńczalniku o składzie:

glikoza	315 mM
streptomycyna	0,1 g
oxytocylna	2 j.m.
woda do iniekcji do	100 ml.

W czasie rozmrażania następowało rozrzedzenie nasienia w stosunku 1:3 (nasienie:rozcieńczalnik). Do próby inseminacyjnej odłączono 40 loch od prosiąt. Raz dziennie sprawdzano u wszystkich występowanie rui przy użyciu knurów próbników. Z 40 loch unasieniono nasieniem mrożonym 25. Te które wykazywały zmiany w układzie rozrodczym (brak możliwości wprowadzenia katetera spiralnego do szyjki macicznej, wyciek ropy z szyjki macicznej) nie były unasieniane. Dawka inseminacyjna o objętości około 150 ml zawierała 5×10^9 plemników wykazujących aktywny ruch postępowy.

Wyniki

W tab. 1 przedstawiono wyniki próby inseminacyjnej z użyciem nasienia mrożonego.

Tab. 1. Wyniki inseminacji loch nasieniem mrożonym

Wyszczególnienie	Liczba zwierząt
Unasieniono loch	25
Powtórzyło ruję	22
w tym: 19–25 dni	18
41–46 „	3
w 69 dniu	1
Nie powtórzyło rui	3
Ubój z konieczności	1
w tym ciężę stwierdzono	1
Oprosiło się loch	2
Liczba płodów po uboju z konieczności	10

Z 25 unasienionych loch nasieniem mrożonym 2 wyprosiły się, a u 1 podczas uboju po 24 dniach od inseminacji (ubój z konieczności) przeprowadzono sekcję macicy i stwierdzono ciężę. 4 lochy powtórzyły ruję między 41 a 69 dniem od inseminacji. Wszystkie zapłodnione 3 lochy i te, które powtórzyły ruję między 41 a 69 dniem, były unasieniane nasieniem knurów o nr 2154/36/2 i 2154/36/5 — bracia. Z 50 zabiegów inseminacyjnych (unasieniono dwukrotnie 25 loch) 29% wykonano ww. knurami.

Tab. 2 przedstawia niektóre dane o miotach urodzonych przez lochy inseminowane mrożonym nasieniem.

Omówienie wyników

U loch powtórnie wystąpiła ruja po inseminacji nasieniem mrożonym między 41–46 dniem, a u 1 w 69 dniu. Wszystkie lochy, które powtórzyły ruję po inseminacji nasieniem mrożonym były kryte knurami. U 4 loch, które powtórzyły ruję w późniejszym czasie po inseminacji nasieniem mrożonym, wystąpiły trudności z ich zapłodnieniem przez knury. Wystę-

*) Praca wykonana w ramach problemu resortowego 132-E, koordynowanego przez Instytut Zootechniki.

Tab. 2. Dane o prosiętach urodzonych przez lochy po inseminacji mrożonym nasieniem

Numery loch	Długość ciąży	Liczba urodzonych prosiąt w miocie			Płeć urodzonych prosiąt żywych		Ciężar miotu w 1 dniu po urodzeniu (w kg)	Ciężar prosięcia w miocie w 1 dniu po urodzeniu (w kg)		
		żywych	martwych	razem	knurki	loszki		średni	maksymalny	minimalny
67/6/17	118	10	1	11	5	5	11	1,13	1,7	0,8
645/6/15	119	—	7	7	—	—	—	—	—	—

Objaśnienie: locha nr 645/6/15 urodziła miot, w którym wszystkie prosięta były słabo rozwinięte i nie wykazywały oznak przeżycia jednego dnia.

powanie powtórnej rui w spóźnionym terminie, nasuwa podejrzenie, że u loch tych po zapłodnieniu doszło do obumarcia zarodków.

Nietypowe opóźnione wystąpienie rui po unasienianiu nasieniem mrożonym stwierdziło wielu badaczy (1, 5, 8, 13, 15). Stąd ocenia wyniki unasieniania nasieniem mrożonym na podstawie wczesnej diagnozy ciąży (po uboju), wydaje się nie celowa. W każdym przypadku winno się w sprawdzaniu metod konserwacji nasienia w stanie zamrożonym czekać do terminu wyproszenia loch podejrzanych o ciążę.

Milovanov i wsp. (10), Kononov i wsp. (4), Chačapuridze (3) w prowadzonych badaniach nad mrożeniem nasienia knurów stwierdzili, że przetrzymywanie nasienia bezpośrednio po jego pobraniu w temperaturze pokojowej z dostępem powietrza przez okres 60 minut, a po rozrzedzeniu wysycenie go wodorem i przetrzymanie przez okres 4—6 godzin przed zamrożeniem w temperaturze 18°—20°C, powodowało lepszą przeżywalność nasienia. W kolejnych próbach inseminacyjnych, w zależności od stosowanego rozcieńczalnika i metody zamrażania oraz rozmrażania nasienia, uzyskali od 11% do 77% wyproszeń loch. Autorzy niniejszej pracy stosując podobną metodykę postępowania z nasieniem, ale inny rozcieńczalnik, uzyskali zaledwie 2 wyproszenia i 1 stwierdzoną ciążę z 25 unasienionych loch.

Być może jedną z przyczyn uzyskania przez autorów znacznie niższego poziomu wyproszeń loch po inseminacji nasieniem mrożonym był wpływ rasy knurów. Paquignon i Courot (12) stwierdzili w swoich badaniach znacznie niższy % wyproszeń loch, po inseminacji mrożonym nasieniem, knurów Landrace w porównaniu z rasą Large White, a właśnie w niniejszych badaniach wszystkie ejakulatory pochodziły od rasy pbz, genetycznie zbliżonej do Landrace.

Wielu badaczy doszukuje się również w błędach żywieniowych knurów obniżonej podatności ich nasienia na zamrażanie. Między innymi Schwabe (14) stwierdził, że brak w żywieniu knurów dodatku pasz pochodzenia zwierzęcego, wpływa ujemnie na jakość nasienia oraz na zdolność do przeżywania poza ustrojem.

Wniosek

1. Badania wykazały, iż wysycanie rozrzedzonego nasienia i przetrzymywanie go przed zamrożeniem w atmosferze wodoru, nie wywiera korzystnego wpływu na wyniki unasieniania.

Piśmiennictwo

1. Baranov F. A.: *Zivotnovodstvo*, Mosk. 2, 68, 1972.
2. Bielański W.: *Rozród zwierząt*. PWRiL, 1972.
3. Chačapuridze E.: *Vsesojuznyj Ordena Trudovogo Krasnogo Znameni, Naučno-Issledovatel'skij Institut Zivotnovodstva*, Dubrovicy, ZSRR, 1975.
4. Kononov V., Golyšev N., Chačapuridze E.: *Svinovodstvo*, Mosk. 6, 23, 1975.
5. Kozumplik J.: *Symposium Naukowe*, 13—21.XII., Dubrovicy, ZSRR, 1975.
6. Lyczynski A., Pawlak H.: *Prz. Hod.* 7, 18, 1974.
7. Lyczynski A., Pawlak H.: *Unasienianie trzody chlewnej*. Poznań PWRiL, 1975.
8. Lyczynski A., Pawlak H.: *VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod.* Kraków, Communication Abstracts, 162, 1976.
9. Lyczynski A.: *Medycyna Wet.* (w druku).
10. Milovanov V. K., Kononov V., Golyšev N., Chačapuridze E., Letjago V. V., *Pochodnja P. S.*: *Zivotnovodstvo*, Mosk. 12, 50, 1974.
11. Nagase H., Niwa T.: *Proc. Vth Int. Congr. Anim. Reprod.* Trento. III, 410, 1964.
12. Paquignon M., Court M.: *VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod.* Kraków, Communications Abstracts, 193, 1976.
13. Salamon S., Visser D.: *Aust. J. Biol. Sci.* 26, 291, 1973.
14. Schwabe T. Z. D.: *Schweinezucht Schweinemast* 22, 1, 10, 1974.
15. Sokolovskaja I. I.: *Informacja osobista*, 1975.

Adres autora: dr Andrzej Lyczynski, Os. Bohaterów II Wojny Światowej 36/65, 61-386 Poznań.

Лычиньский А., Кожиневский Г. — Влияние хранения семени хряков до замораживания в атмосфере водорода на его оплодотворяющую способность.

Для исследований употребляли фракцию эякулята, избивающую живчиками, от 7 хряков польской белой длинноухой породы. Семя держали без разреживания с доступом воздуха в комнатной температуре 1—1,5 часа. Непосредственно после этого разбавляли его глюкозо-желточно-глицероловым разбавителем и помещали в герметичный стеклянный сосуд. При помощи вакуумного насоса отсасывали воздух, а накачивали водород. Таким образом насыщенное водородом семя держали в комнатной температуре 4—5 часов. После этого переносили его в холодильник и держали 1 час в температуре 0°—5°C. Семя замораживали в шариках объемом 0,13 мл на пластинках консистентного CO₂ и по истечении ок. 5 минут переносили в жидкий азот. Размораживание проводили в температуре 65—80°C в 315 мМ глюкозы с прибавкой антибиотика и окситоцина.

Осеменяли двухкратно 25 свиноматок в спонтанной течке, применяя в дозе съемом 150 мл 5×10⁹ подвижных живчиков. Оপরোসились 2 свиноматки, а у 1 во время забора обнаружили беременность.

Lyczyński A., Korzyniewski H. — **The influence of semen storage in hydrogen atmosphere before freezing on its fertilizing value.**

The studies were performed with an ejaculate fraction rich in spermatozoa derived from 7 boars. The semen was stored without dilution in a normal atmosphere at room temperature for 1–1.5 hr. Then it was diluted with an glucose-egg yolk-glycerol diluent and preserved in a hermetic glass utensil. By the use of a vacuum-pump, the air was aspirated and hydrogen introduced. The semen saturated with hyd-

rogen was stored at room temperature for 4–5 hr. Then it was stored at refrigerator at 0–5°C for 1 hr. The semen was frozen in the form of pills (0.13 ml content) on the plates of solidified carbon dioxide, and after about 5 min. it was inserted into a liquid nitrogen. Thawing was performed in a 315 mM glucose with the addition of antibiotics and oxytocin at 65–80°C. Twenty five sows were inseminated twice in the course of spontaneous estrus with 150 ml of semen containing 5×10^9 mobile spermatozoa. Two sows farrowed and in the third gravidity was diagnosed after post-slaughter examination.

STEFAN JACZEWSKI, IRENEUSZ DYNAROWICZ, JERZY MONKIEWICZ

Wpływ długotrwałego podawania związków miedzi i ołowiu na cechy nasienia królików

Z Instytutu Nauk Fizjologicznych Wydziału Weterynaryjnego
AR we Wrocławiu

Z Instytutu Hodowli i Technologii Produkcji Zwierzęcej
AR we Wrocławiu

W rolnictwie sprzed okresu intensywnego stosowania środków chemicznych przypadki bezpłodności zwierząt były stosunkowo rzadkie. W miarę nasilania się jego chemizacji, forsownego nawożenia gleb nawozami mineralnymi oraz wprowadzeniu nowych metod chowu zwierząt, obserwuje się nasilenie jałowości. Przyjmuje się, że zakłócenia płodności spowodowane są w 20% cechami dziedzicznymi, 20% infekcją organów rodnych, 50–55% błędami w żywieniu i utrzymywaniu, zaś 5–10% stanowią inne przyczyny (15). Niektórzy autorzy (12) są zdania, że aż 70% zaburzeń w reprodukcji zwierząt stanowią nowoczesne metody żywienia, a pozostałe 30% to inne przyczyny wpływające bezpośrednio lub pośrednio na ograniczenie płodności. Maletto (13) określa te przyczyny jako bezpłodność spowodowaną cywilizacją i techniką. Jedną z nich, mającą ujemny wpływ na cechy związane z rozplodem zwierząt, jest skażenie środowiska naturalnego. W rejonach uprzemysłowionych stwierdzono dodatnią korelację między zawartością miedzi, ołowiu i cynku w glebie a ich kumulacją w roślinach (11, 17). Rośliny te wchodziły w skład paszy podawanej zwierzętom.

Fizjologiczne i biochemiczne mechanizmy działające wewnątrz układu płciowego odgrywają bardzo ważną rolę w produkcji pełnowartościowego ejakulatu. Nadmiar lub niedobór jonów miedzi oraz innych mikroelementów może mieć istotny wpływ na funkcje płciowe organizmu (10). W nasieniu buhajów utrzymywanych w skażonym środowisku stwierdzono nadmierne nagromadzenie metali ciężkich (Pb, Cu) oraz skrócony okres przeżywalności plemników (14). Wykonanie badań porównawczych, określających wpływ skażonego środowiska na badane cechy, wymaga spełnienia wielu wymogów związanych z żywieniem, wiekiem, cięża-

rem i linią hodowlaną zwierząt doświadczalnych. Spełnienie tych warunków możliwe jest tylko przy wykonaniu badań ścisłych, w których wszystkie wymienione parametry są wyrównane.

Celem pracy było określenie wpływu podawanych związków miedzi i ołowiu na koncentrację i próbę przeżywalności plemników królików, jako podstawowych kryteriów oceny ich nasienia.

Material i metody

Badania wykonano na 14 królikach — samcach rasy średniej białej polskiej, o wyrównanym ciężarze i wieku. Od każdego samca, w odstępach 2–3 dniowych, pobierano nasienie do sztucznej pochwy. Po jego uzyskaniu i mechanicznym usunięciu bagietką galaretowatego żelu nasienie poddawano ocenie mikro- i makroskopowej oraz wykonywano badania uzupełniające, określając koncentrację plemników i próbę przeżywania, stosując rozrzedzalnik mlekowo-żółtkowy. Po uzyskaniu od każdego samca 1,5 ml nasienia, niezbędnego do oznaczeń chemicznych, zwierzęta losowo podzielono na dwie grupy doświadczalne (po 7 osobników w grupie). Pierwsza z nich otrzymywała codziennie, *per os*, miedź w postaci CUSO_4 w ilości równej 1 mg czystego Cu na sztukę, a druga — ołów w postaci $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ w ilości równej 0,25 mg czystego Pb na sztukę. Po 74 dniach podawania związków chemicznych, chcąc uchwycić ewentualne zaburzenia w spermatogenezie, zaczęto z taką samą częstotliwością pobierać od zwierząt nasienie i poddawać je takiej samej ocenie jak w okresie wyjściowym. Przez cały okres czasu trwania eksperymentu zwierzęta karmiono identycznie granulowaną paszą dla królików z dodatkiem siana, marchwi pastewnej i wody *ad libitum*.

Oznaczanie zawartości metali ciężkich w nasieniu królików wykonano metodą polarograficzną (5). W analizach uwzględniono również zawartość cynku, chcąc przekonać się, w jaki sposób podawanie związków miedzi lub ołowiu wpłynie na ilość tego pierwiastka w nasieniu zwierząt doświadczalnych. Wyniki badań poddano analizie statystycznej, stosując test t-Studenta dla stwierdzenia istotności różnic.