

ANDRZEJ DUBIEL, JACEK KRÓLIŃSKI, KARL-PRITZ WEITZE*, JAN PILCH**

Sztuczne unasienianie królic nasieniem konserwowanym w niskich temperaturach przy użyciu minitub

Katedra Patologii Rozrodu Zwierząt i Klinika Położnicza Wydziału Weterynaryjnego AR, pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław
 * Klinika Andrologii i Sztucznego Unasieniania Zwierząt Wyższej Szkoły Weterynaryjnej w Hanowerze, Bischofsholer Damm 15, D-3000 Hanover 1

**Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt, Instytut Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa

Równoległe z tworzeniem dużych ferm króliczych, nastawionych na produkcję materiału hodowlanego i rzeźnego, rośnie zainteresowanie sztucznym unasienianiem i konserwacją nasienia tych zwierząt (2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 17). Nasienie przeznaczone do tych celów powinno odpowiadać normom przewidzianym dla ejakulatów samców płodnych i przydatnych do rozrodu (1, 3, 15, 18). Wykazano znaczne jakościowe różnice wytrysku, występujące pomiędzy poszczególnymi rasami, jak również w odniesieniu do samców tej samej rasy (3). Do celów sztucznego unasieniania najbardziej nadają się ejakulatory królików srokaczy niemieckich i białych nowozelandzkich, w mniejszym stopniu rasy czerwonej nowozelandzkiej (3).

Charakterystyczną cechą hodowli tych gryzoni jest szybki obrót materiału zwierzęcego, przeznaczonego do rozrodu. Chów w pokrewieństwie może doprowadzić do obniżenia płodności, plenności, żywotności królików, wykorzystania paszy i odporności na różne choroby zakaźne i pasożytnicze (9). Wprowadzenie konserwacji odpowiedniej jakości ejakulatu oraz hormonalnego wywoływania owulacji u samicy pozwala na sztuczne unasienianie nasieniem importowanym, poprawiając w ten sposób opłacalność hodowli królików (2, 18). Biorąc pod uwagę ważność przedstawionego zagadnienia, podjęto badania nad sztucznym unasienianiem królic nasieniem konserwowanym w niskich temperaturach przy użyciu minitub. Starano się również wykazać przydatność preparatu Dirigestran-Spofa do wywołania owulacji prowokowanej u tego gatunku zwierząt.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 6 królikach samcach, rasy srokacz niemiecki w wieku 1–2 lat. Nasienie pobierano za pomocą sztucznej pochwy. Po pobraniu ejakulatów przeprowadzano szacunkową ocenę wstępną nasienia, polegającą na określeniu jego objętości, barwy, woni, konsystencji, gęstości i odsetka plemników o ruchu prawidłowym. Po ocenie wstępnej określano koncentrację plemników w 1 mm³ nasienia oraz odsetek plemników wykazujących anomalie pierwotne i wtórne. Objętość frakcji plemnikowej wahała się od 0,5–1,0 ml. Nasienie charakteryzowało się białą barwą i mleczno-wodnistą konsystencją, procent plemników o ruchu prawidłowym wynosił 50–80. Zmiany pierwotne plemników stanowiły średnio 5%, a wtórne 10%.

Ejakulat rozrzedzano w stosunku 1:3 rozrzedzalnikiem o następującym składzie: tris — 3,028 g, kwas cytrynowy — 1,675, glukoza — 1,25 g, żółtko 17% i DMSO — 4,5% objętości rozrzedzalnika oraz woda

destylowana do 100 ml. Po ocenie procentu plemników o ruchu prawidłowym wprowadzano nasienie do minitub i ochładzano do 4°C w ciągu 1,5 godz. Po okresie ekwilibracji nasienie mrożono w parach azotu (20 min.) i umieszczano w ciekłym azocie. Do celów sztucznego unasieniania używano nasienia zawierającego po rozmrożeniu minimum 20% plemników o ruchu postępowym.

Królice otrzymały jednorazowo w formie iniekcji domięśniowej po 0,2–0,3 ml (8–12 µg) preparatu Dirigestran-Spofa w celu sztucznego wywołania owulacji prowokowanej. Preparat ten stanowi wodny roztwór syntetycznego GnRH/FSH, przy czym 1 ml zawiera 40 µg gonadoliberyny, odpowiadającej naturalnemu hormonowi uwalniającemu LH/FSH. Królice unasieniano bezpośrednio po podaniu GnRH-LH/FSH przy pomocy pistoletu inseminacyjnego dostosowanego do minitub. Objętość dawki inseminacyjnej wynosiła 0,25 ml i zawierała od 12,1 do 26,8 mil. plemników, w tym minimum 20% o ruchu prawidłowym. W sumie unasieniono 53 królice różnych ras w wieku od 8 miesięcy do 2 lat. Zabiegi inseminacyjne przeprowadzano w miesiącach wiosennych (kwiecień, maj).

Wyniki i omówienie

Spśród unasienionych 53 królic nasieniem od 6 samców rozpoznano badaniem klinicznym ciążę u 18 sztuk (34,0%), przy czym wyniki pozytywne dotyczyły samic poddanych inseminacji nasieniem tylko od 3 samców. Ich nasieniem unasieniono 30 królic (pierwsza grupa) uzyskując zapłodnienie i ciążę u 18 sztuk (60,0%). Ciąża trwała 31–34, średnio 33 dni. Poszczególne mioty liczyły od 4 do 10 królicząt, średnio 6 ± 4 osobników zdolnych do dalszego chowu. Unasienienie 23 królic (druga grupa) nasieniem pozostałych 3 samców okazało się nieskuteczne, pomimo postępowego ruchu ponad 20% plemników w dawce inseminacyjnej po rozmrożeniu.

Uzyskane wyniki wskazują, że preparat GnRH-LH Dirigestran-Spofa podany domięśniowo królicom w dawce 8–12 µg jest w stanie wywołać stymulowaną owulację. Dodatnie efekty sztucznego unasieniania królic można otrzymać dopiero po wstępnej selekcji samców w kierunku przydatności ich nasienia do celów konserwacji w niskich temperaturach, opartej nie tylko na określeniu odsetka plemników o ruchu prawidłowym i próbach płodności na odpowiedniej liczbie samic, ale również ocenie struktury akrosomu i teście zapłodnienia komórki jajowej (13, 22). Niektóre samce mogą produkować nasienie o obniżonej zdolności na proces zamrażania i rozmrażania.

Otrzymane wyniki badań w pierwszej grupie doświadczalnej (tab. 1) są zbliżone do przedsta-

Tab. 1. Płodność i plenność dwóch grup królic sztucznie unasiemionych nasieniem konserwowanym w niskich temperaturach przy użyciu minitub

Grupa	Liczba unasiemionych samic (n = 53)	Wyniki unasiemienia	
		Liczba królic ciężarnych %	Średnia liczba potomstwa w miocie
I	30	18 (60)	6±4
II	23	0 (0)	0

wionych przez Weitze i wsp. (20), którzy posługiwali się tą samą metodą konserwacji nasienia. Autorzy ci podają, że procent ciężarnych królic unasiemionych nasieniem świeżym i mrożonym był bardzo zbliżony. Po zastosowaniu świeżego i mrożonego nasienia ilość królicząt w miocie (plenność) wynosiła odpowiednio 7,64 i 6,30 i nie wykazała różnic statystycznych, co zgodne jest z własnymi obserwacjami. Cytowani autorzy stwierdzili również, że nasienie mrożone, przechowywane 5 dni, 12 i 15 miesięcy w atmosferze ciekłego azotu, nie zmienia zdolności do zapłodnienia. Odsetek ciężarnych królic wynosił odpowiednio 59,1, 70,8, 66,7 i nie wykazał istotnych różnic statystycznych.

Obserwacje (19) udowodniły, iż znajdujący się w rozrzedzalniku nasienia królika DMSO (2-metylo-sulfotlenek), w podanej przez nas dawce, wykazuje dodatni wpływ na ruch plemników, wyrażający się wybiórczą ochroną struktury i funkcji aparatu mitochondrialnego i elementów kurczliwych męskiej komórki płciowej. Jednocześnie DMSO (CH₃)₂SO znacznie uszkadza błonę akrosomalną plemników. Selektywne działanie ochronne tego krioprotektora prowadzi do wzrostu procentu plemników ruchliwych i znacznego zmniejszenia ilości komórek z nieuszkodzoną strukturą akrosomu. Z uwagi na to powiązanie Weitze (23) badał zależność pomiędzy doświadczalnymi zmianami morfologicznymi plemników a ich zdolnością do zapłodnienia. Liczba królicząt w miocie obniżała się znacznie, jeżeli liczba nieuszkodzonych plemników w dawce inseminacyjnej spadała poniżej minimalnego przedziału 0,15—0,5 miliona. Stwierdzono (25), że 1% dodatek glicerolu do rozrzedzalnika, zawierającego tris jako bufor z dodatkiem DMSO, nie wpływa dodatnio na właściwości mrożonych plemników (procent plemników o ruchu prawidłowym, jakość akrosomu) oraz płodność i plenność unasiemianych królic. Wymienieni badacze słusznie wnioskują, że nie należy stosować glicerolu chroniącego plemniki przed niskimi temperaturami, jeśli tris i DMSO znajdują się w rozrzedzalniku nasienia królika.

Użyta przez nas dawka nasienia konserwowanego w ciekłym azocie i liczba plemników o ruchu prawidłowym w dawce minimum 12 milionów wydają się być wystarczające do u-

zyskania zadowalającej płodności i plenności inseminowanych królic. Potwierdzają to wyniki uzyskane przez innych autorów (8, 15), którzy notowali również wysoką wartość wymienionych wskaźników unasiemiania, stosując 0,3 ml nasienia płynnego lub 0,5—0,6 ml mrożonego w dawce zawierającej minimum 12 milionów ruchliwych plemników.

Także preparat GnRH-LH (Lutal forte, Hoechst) nadaje się do indukowania i synchronizacji owulacji u królic. Po jego zastosowaniu w ośrodku wrocławskim (5), a następnie unasiemieniu 30 królic uzyskano ciążę u 82% zwierząt inseminowanych świeżym nasieniem. Objętość dawki nasienia wahała się od 0,2—0,5 ml, średnio 0,35 ml, koncentracja plemników o ruchu prawidłowym wynosiła 12—100 milionów, średnio 55 mln w dawce. Poszczególne mioty liczyły 1—8 królicząt zdolnych do dalszego chowu, średnio 5,1 sztuk. Płodność i plenność królic unasiemianych sztucznie po zastosowaniu preparatu Lutal forte i naturalnie nie różniły się między sobą.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują na przydatność syntetycznego preparatu GnRH-LH p.n. Dirigestran-Spofa w indukowaniu owulacji u królików. Łatwość podawania hormonu (iniekcja domięśniowa), a następnie ściśle określony termin inseminacji bezpośrednio po iniekcji preparatu nasieniem konserwowanym w minitubach, stanowią korzystne warunki z punktu widzenia praktycznego i ekonomicznego do zastosowania tej kombinowanej metody reprodukcji w fermach króliczych. Konserwacja nasienia w minitubach pozwala na lepszą identyfikację i ujednoczenie dawki inseminacyjnej pod względem objętościowym, jak również zabezpiecza ją przed niekorzystnymi wpływami środowiska, przede wszystkim przed infekcją. Wymaga ona jednak w warunkach krajowych dodatkowej produkcji plastikowych minitub o objętości 0,25 ml, plastikowych lub szklanych kuleczek do ich zamknięcia oraz użycia pistoletów inseminacyjnych do minitub.

Wnioski

1. Preparat Dirigestran-Spofa nadaje się do indukowania i synchronizacji owulacji u królic.
2. Królice unasiemione sztucznie nasieniem konserwowanym w niskich temperaturach przy użyciu minitub bezpośrednio po podaniu preparatu Dirigestran-Spofa rodzą zdrowe potomstwo, zdolne do dalszego chowu.
3. Pozytywne efekty sztucznego unasiemiania królic można uzyskać dopiero po wstępnej selekcji samców w kierunku przydatności ich nasienia do celów konserwacji w niskich temperaturach i próbach płodności na odpowiedniej liczbie samic.

Piśmiennictwo

1. Dubiel A.: *Medycyna Wet.* 29, 624, 1973.
2. Dubiel A., Króliński J.: *Hod. drob. inw.* 26, 14, 1978.
3. Dubiel A., Króliński J., Karpakowa C.: *Medycyna Wet.* 35, 175, 1979.
4. Dubiel A., Rokicki C., Samborski Z.: *Medycyna Wet.* 36, 409, 1980.
5. Dubiel A., Króliński J., Miernik A.: *Medycyna Wet.* 38, 92, 1982.
6. Fox R. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 108, 663, 1961.
7. Fox R. R., Burdick J. F.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113, 853, 1963.
8. Günter C.: *Untersuchungen zur Tiergefrierkonservierung vom Kaninchensamen.* Praca dokt., Wyższa Szkoła Weterynaryjna, Hanower, 1975.
9. Herman W.: *Hodowla królików*, PWRiL, Warszawa, 1973.
10. Kęska L.: *Ginekologia Pol.* 56, 725, 1986.
11. Maurer R., Stranzinger G., Paufler S. K.: *J. Reprod. Fert.* 48, 43, 1976.
12. Murdoch B. E., O'Shea R.: *Aust. J. Biol. Sci.* 26, 645, 1973.
13. O'Shea T., Wales R. G.: *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 709, 1969.
14. Rohlfaff D., Laiblin Chm.: *Berl. München. tierärztl. Wschr.* 89, 181, 1976.
15. Stranzinger G., Maurer R., Paufler S. K.: *J. Reprod. Part.* 24, 111, 1971.
16. Wales R. G., Martin L., O'Shea T.: *J. Reprod. Part.* 10, 64, 1965.
17. Wales R. G., O'Shea T.: *Austr. Z. Biol. Sci.* 21, 831, 1968.
18. Weitze K. F.: *Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Kaninchensperma.* Praca habil., Wyższa Szkoła Weterynaryjna, Hanower, 1977.
19. Weitze K. F.: *Zuchthyg.* 16, 212, 1981.
20. Weitze K. F., Scharnhölz A., Bader H.: *Zuchthyg.* 17, 172, 1983.
21. Weitze K. F., Scharnhölz A., Hellemann C.: *Zuchthyg.* 18, 67, 1983.

Adres autora: doc. dr hab. Andrzej Dubiel, pl. Grunwaldzki 6a/18, 50-384 Wrocław

Дубель А., Крулиньский Я., Вейтце К., Пилх Я. — Искусственное осеменение крольчих семенем, консервированным в низких температурах с применением минитюб

Цель исследований заключалась в искусственном осеменении крольчих семенем, консервированным в низких температурах, с применением минитюб и одновременным использованием препарата Dirigestran-Spofa для вызывания спровоцированной овуляции.

Наблюдения провели на семени 6 кроликов немецкой пестрой породы. Крольчихи получили однократно в виде внутримышечной инъекции по

0,2—0,3 мл (8—12 μ г) препарата Dirigestran-Spofa. Объем инсеминационной дозы был устойчив (0,25 мл) и содержал 12,1—26,8 млн живчиков, в том минимум 20% с правильным движением. В общем инсеминировали 53 крольчих.

Исследования показали, что препарат Dirigestran-Spofa пригоден к индуцированию и синхронизации овуляции у крольчих. Самки, искусственно инсеминированные семенем, консервированным в низких температурах, с применением минитюб, непосредственно после ввода представленного препарата рожают здоровое потомство, способное к дальнейшему выращиванию. Положительные эффекты искусственного осеменения крольчих можно получить лишь после предварительной селекции самцов относительно пригодности их семени к консервации в низких температурах и проб плодovitости на соответственном количестве самок.

Dubiel A., Króliński J., Weitze K.-P., Pilch J. — Artificial insemination of rabbits using minitubes and frozen semen at low temperatures

The objectives of the examinations were artificial insemination of rabbits using minitubes and frozen semen at low temperatures, simultaneously with provocation of ovulation by Dirigestran-Spofa. Semen of six german piebald males was used. Fifty three female rabbits were injected intramuscularly once Dirigestran-Spofa at a dose of 0.2—0.3 ml (8—12 μ g). Insemination dose of sperm contained 12.1—26.8 mil of spermatozoons in 0.25 ml of semen (above 20% of spermatozoons showing normal movement). Dirigestran-Spofa appeared to be very useful to induce and synchronize ovulation in rabbits. Female rabbits artificially inseminated with semen preserved at low temperatures by the use of minitubes just after injection of Dirigestran have normal progeny. The positive results of artificial insemination can be obtained after a preliminary selection of male rabbits for usefulness of their semen for preservation at low temperatures and after the trials of fertility performed with the use of the appropriate number of rabbit females.

WRATHALL A. E., WELS D. E., JONES P. C., FONKLES J. A.: *Zmiany sezonowe w poziomie progesteronu w surowicy ciężarnych macior.* (Seasonal variations in serum progesterone levels in pregnant sows). *Vet. Rec.* 118, 685—687, 1986 (25)

Observacje przeprowadzono w 7 stadach, każdorazowo na 20 maciorach między 40 i 90 dniem ciąży. Poziom progesteronu w surowicy oznaczono w jesieni i w zimie oraz na wiosnę i w lecie. U większości macior poziom progesteronu w surowicy krwi był znacznie niższy w jesieni w porównaniu do pozostałych pór roku. Średnie stężenie progesteronu w surowicy w jesieni wynosiło $14,80 \pm 0,67$ ng/ml w zimie $25,75 \pm 0,7$ ng/ml na wiosnę i $19,75 \pm 0,59$ ng/ml i w lecie $22,12 \pm 0,7$ ng/ml. Badania dodatkowe przeprowadzone od czerwca 1980 do czerwca 1981 w stadzie 250 macior w okresie 25-30 i 70-91 dnia ciąży wykazały, że stężenie progesteronu w surowicach było najniższe w okresie sierpień-październik, najwyższe w marcu. To sezonowe obniżenie poziomu progesteronu w surowicy może być następstwem zmniejszonej stymulacji luteotropowej. Może ono wiązać się też z występowaniem tzw jesiennego syndromu ronień u macior i z sezonowymi zaburzeniami płodności.

HOLMGREN N., HAGGMAR B., TOLLING S.: *Ocena terenowa przydatności Cefoperazone w leczeniu klinicznych postaci zapalenia gruczołu mlekowego u krów.* (A field trial evaluating the use of Cefoperazone in the treatment of bovine clinical mastitis). *Nord. Vet. Med.* 37, 228—233, 1985 (4)

Cefoperazone należą do trzeciej generacji cefalosporyn jest antybiotykiem o szerokim spektrum działania bakteriobójczego na drobnoustroje gram-dodatnie i gram-ujemne. Nie jest on przy tym rozkładany przez beta-laktamazę wytwarzaną przez niektóre szczepy gronkowców i *Escherichia coli*. W warunkach terenowych wykazano dużą efektywność cefoperazone zastosowanego jednorazowo w dawce 250 mg w iniekcji domięśniowej w leczeniu klinicznych postaci zapalenia gruczołu mlekowego u krów. Wyleczenia kliniczne notowano w 86% po 14 dniach, z tym że odsetek wyleczeń zapalenia wymion wywołanych przez pałeczki okrężnicy wynosił 92%, przez *Staph. aureus* 71%. Bakteriologiczne wyleczenie uzyskano w 63% przypadków. Najwyższy odsetek bakteriologicznych wyleczeń notowano w zapaleniach spowodowanych przez pałeczkę okrężnicy (96%), najniższy w zapaleniach wywołanych przez paciorkowce (51%) i *Staph. aureus* (43%).

G.

G.