

ANDRZEJ LYCZYŃSKI

Zdolność zapładniająca mrożonego nasienia knurów*)

Z Instytutu Hodowli i Technologii Produkcji Zwierzęcej AR w Poznaniu

Plodność mrożonego nasienia knurów, jak do tej pory, jest stosunkowo niska.

Celem niniejszej pracy było opracowanie rozcieńczalnika, technologii zamrażania i rozmrażania nasienia knurów oraz sprawdzenie jego zdolności zapładniającej w próbie inseminacyjnej.

Materiał i metody

Nasienie pobierano metodą manualną od 7 knurów, w tym: 6 rasy pbz, 1 — wbp. Do zamrażania wykorzystywano jedynie frakcję ejakulatu bogatą w plemniki. Bezpośrednio po pobraniu nasienia przesączano je przez jałową gazę, celem wychwycenia cząstek żeluz, po czym przeprowadzano ocenę ruchu i koncentracji plemników. Do mrożenia użyte zostały ejakulatory, których początkowa ruchliwość plemników wynosiła co najmniej 80%. Nasienie umieszczano w nagrzanym do 30°C termosie i przechowywano przez 1,5 godziny, celem stabilizacji. Do rozrzedzania nasienia użyto rozcieńczalnika o składzie:

glikoza	4%
żółtko jaja	30%
streptomycyna	0,1 g
aqua ad	100 ml
glicerol	2% v/v.

We wcześniejszych badaniach ustalono korzystny wpływ wirowania rozcieńczalnika na przeżywanie nasienia (4), dlatego każdorazowo rozcieńczalnik podstawowy bez glicerolu wirowano przy około 3 tys. obr./min. przez 15 minut, a do rozrzedzania stosowano supernatant. Rozrzedzanie nasienia przeprowadzano dwustopniowo:

wstępnie zamrożone nasienie zanurzano w ciepłym azocie i przetrzymywano je tam przez okres 17—57 dni w pudełkach plastikowych z wywierconymi otworami. Średnio w jednym pudełku gromadzono 272 kulki, jako dawkę inseminacyjną.

Ruchliwość plemników oceniano bezpośrednio po pobraniu ejakulatu, po ekwilibracji, po rozmrożeniu, oraz przed wykonaniem zabiegu unasiwienia. Nasienie rozmrażano do inseminacji w uprzednio natlenionym 0,9% roztworze NaCl w pojemnikach teflonowych o pojemności 250 ml w temperaturze 80°C, a następnie przetrzymywano je w 37°C przez około 15 minut — do czasu wykorzystania w inseminacji. Rozmrażania nasienia dokonywano w proporcji 1:3 (nasienie:rozcieńczalnik).

W próbie inseminacyjnej unasiwiono 30 loch w rui spontanicznej, wykonując dwukrotnie zabieg inseminacyjny w odstępie około 24 godzin, przy użyciu kateterów spiralnych wzoru Melrose i O'Hagan (5). Dawka inseminacyjna o objętości około 120 ml zawierała 5—7 × 10⁹ plemników wykazujących aktywny ruch postępowy. Właściwy moment unasiwienia określano przy użyciu knura próbnika.

Wyniki

W próbie inseminacyjnej wykorzystano 15 zamrożonych ejakulatów, których charakterystykę przedstawia tab. 1. Wyniki próby inseminacyjnej z użyciem nasienia mrożonego przedstawia tab. 2.

Z 20 loch unasiwionych nasieniem mrożonym 2 wyprosiły się, a u 1 podczas uboju kon-

Tab. 1. Charakterystyka nasienia użytego w próbie inseminacyjnej

Liczba pobranych ejakulatów do mrożenia	Liczba skutecznie zamrożonych ejakulatów	Wartości średnie						
		Objętość ejakulatu w ml		Koncentracja plemników tys./1 mm ³	Ogólna liczba plemników w ejakulacie × 10 ⁹	% plemników ruchliwych		Liczba plemników o ruchu postępowym w ejakulacie po rozmrożeniu nasienia × 10 ⁹
		całkowita	frakcji plemnikowej			po pobraniu nasienia	po rozmrożeniu nasienia	
25	15	368,7	61,3	1128,7	69,2	80	41,7	23,1

I — rozrzedzenie rozcieńczalnikiem podstawowym w stosunku 1:1, a następnie schładzanie nasienie do 10°—15°C przez okres 1—2 godzin,

II — rozrzedzenie rozcieńczalnikiem glicerolowym w stosunku 1:0,5.

Ostateczne rozrzedzenie (nasienie:rozcieńczalnik) wynosiło 1:2. Ekwilibrację przeprowadzano przez okres 1—2 godzin w temperaturze 5°C. Łączny czas od pobrania nasienia do jego zamrożenia wynosił 3,5—5,5 godzin. Po ekwilibracji nasienie zamrażano w kulkach objętości około 0,2 ml, stosując zestalony CO₂ (wg metody Nagase i Niwa) (6). Po upływie około 5 minut

trzonego po 105 dniach stwierdzono ciążę. Zapłodnione lochy były inseminowane nasieniem tego samego knura rasy pbz o numerze 1711/27. Z 60 zabiegów inseminacyjnych (unasiwiono dwukrotnie 30 loch), 6 wykonano nasieniem knura rasy wbp, co stanowi 10%. Natomiast nasieniem knurów pbz wykonano 54 zabiegi inseminacyjne, z czego 40% nasieniem knura 1711/27. Na ryc. 1 przedstawiono lochę nr 014 z pierwszymi prosiętami urodzonymi po inseminacji nasieniem mrożonym. W tab. 3 przedstawiono dane o prosiętach urodzonych przez lochy inseminowane mrożonym nasieniem.

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

Omówienie wyników

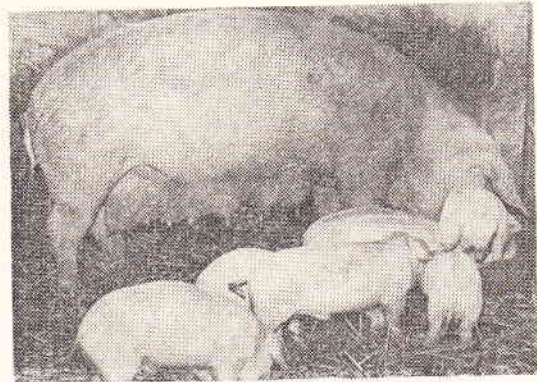
Ubojowi kontrolnemu po 105 dniach od momentu unasieniania poddano 6 loch. U jednej z nich stwierdzono 9 płodów, a u dwóch obserwowano rozwijające się pęcherzyki Graafa i świeże ciała żółte na jajnikach. Natomiast u pozostałych 3 loch zaobserwowano: w jednym przypadku po kilka cyst na obydwu jajnikach, w drugim — niezbyt błony śluzowej macicy, oraz w trzecim — wystąpienie bąblowca w zachyłku obydwu jajników i w prawym rogu macicznym.

Tab. 2. Wyniki próby inseminacyjnej z użyciem nasienia mrożonego

Wyszczególnienie	Liczba zwierząt
Unasieniono loch nasieniem mrożonym	30
Ubój z konieczności	4
Powtórzyło ruję	18
w tym: do 30 dni	9
30—70 „	4
70—105 „	5
Nie powtórzyło rui	8
Ubój kontrolny	6
w tym ciężę stwierdzono	1
Oprosiło się loch	2
Liczba płodów w kontrolnym uboju	9

Nie przeprowadzono dodatkowych badań stwierdzających ciężę u loch, które powtarzały ruję w różnych terminach po inseminacji nasieniem mrożonym. Przypuszczać można, że niektóre z nich szczególnie te, u których powtórna ruja po inseminacji pojawiła się po dłuższej przerwie mogły być zapłodnione, ale z przyczyn bliżej nieznanych nastąpiło u nich obumarcie i resorpcja zarodków. Wskazują na to badania Sokolovskiej (9) i Kozumpliaka (3). Baranov (1) obserwował występowanie rui u loch unasienianych nasieniem mrożonym 35—75 dni po inseminacji, a Salamon i Visser (8) po 49—56 dniach. Ci ostatni stwierdzili, że liczba wykonanych zabiegów unasieniania w tej samej rui ma wpływ na % wyproszeń. Po jednym zabiegu unasieniania w rui z 18 loch

wyprosiły się 2, natomiast po trzykrotnej inseminacji w tej samej rui z 23 unasienionych loch wyprosiło się 10. Einarsson i wsp. (2) wykazali również, że dwukrotnie wykonany zabieg unasieniania mrożonym nasieniem zwiększył % wyproszeń loch. Unasieniając 90 loch uzyskali oni średnio 55,6% wyproszeń przy dwukrotnej inseminacji, natomiast przy jednym zabiegu inseminacyjnym z unasienionych 7 loch do 90 dni nie powtórzyły 3, co stanowi 42,9% zapłodnień. Polge i wsp. (7) stwierdzili, że wprowadzenie rozmrożonego nasienia bezpośrednio do jajowodów znacznie zwiększa szansę zapłodnienia w porównaniu do tradycyjnego wprowadzania do macicy.



Ryc. 1. Locha nr 014 z prosiętami po inseminacji nasieniem mrożonym. Prosięta w wieku 34 dni

Fot. A. Rut

Znaczna liczba plemników w czasie technologii zamrażania i rozmrażania nasienia knurów zachowuje stosunkowo wysoką ruchliwość, tracąc jednocześnie prawie całkowicie zdolność zapładniającą. Pośrednią metodą oceny mrożonego nasienia, może być badanie stopnia uszkodzeń błon akrosomalnych plemników, jednak zdaniem Wierzbowskiego (10) próba inseminacyjna stanowi najwłaściwszą metodę oceny wartości biologicznej konserwowanego przez mrożenie nasienia knurów.

Obecne doświadczenie oraz cytowane piśmiennictwo wskazują na możliwość występo-

Tab. 3. Dane dotyczące prosiąt urodzonych przez lochy inseminowane mrożonym nasieniem

Numery loch	Długość ciąży (dni)	Liczba urodzonych prosiąt w miocie (żywych)	Płeć urodzonych prosiąt	Straty w 1 dniu po urodzeniu (szt.)	Ciężar miotu w 1 dniu po urodzeniu (kg.)	Ciężar prosiąt w miocie w 1 dniu (max./min.) (kg)	Straty do 21 dni od urodzenia (szt.)	Ciężar miotu w 21 dniu od urodzenia (kg)	Ciężar prosiąt w miocie w 21 dniu (max./min.) (kg)
014	114	7	6 knurków 1 loszka	—	10,5	1,85/1,2	—	36,1	6,7/3,7
084	114	9	2 knurki 5 loszek	2	10,3	1,6/1,3	1	36,4	7,0/5,1

Objaśnienie: płeć i ciężar miotu lochy nr 084 określono u 7 żywych prosiąt.

wania różnic indywidualnych u knurów w podatności ich nasienia na zamrażanie. Być może w grę wchodzi tutaj wydzieliny gruczołów płciowych dodatkowych, które w pewnym stopniu wpływają na przeżywanie nasienia po rozmrożeniu oraz na jego zdolność zapładniająca.

Piśmiennictwo

1. Baranov F. A.: *Zivotnovodstvo*, Moskwa, 2, 68, 1972.
2. Einarsson S., Swensson T., Viring S.: *Nord. Vet.-Med.* 25, 372, 1973.
3. Kozumplik J.: *Informacja osobista*, 1975.
4. Lyczynski A.: *Pr. Komis. Nauk Rol. Leś.* PTPN, t. XXXV: 219, 1973.
5. Melrose D. R., O'Hagan C.: *Proc. IVth Int. Congr. Anim. Reprod.* Hague, 4, 855, 1961.
6. Nagase H., Niwa T.: *Proc. Vth Int. Congr. Anim. Reprod.* Trento, 3, 410, 1964.
7. Polge C., Salamon S., Wilmut I.: *Vet. Rec.* 87, 424, 1970.
8. Salamon S., Visser D.: *Aust. J. Biol. Sci.* 26, 291, 1973.
9. Sokolovskaja I. I.: *Informacja osobista*, 1975.
10. Wierzbowski S.: *Informacja osobista*, 1975.

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

Лычиньски А. — Оплодотворяющая способность замораживаемого семени хряков.

Семя было взято мануальным методом от 7 хряков, в том — от 6 белой польской свислоухой породы и от 1 — крупной белой польской. Для замораживания была употреблена фракция эякулята, богатая сперматозоидами, начальная подвижность семени которой составляла 80%. Семя было продержано 1,5 часа в 30°C для стабилизации. Затем оно дважды было разбавлено до окончательного соотношения 1:2 (семя: разбавитель) с при-

менением глюкозо-желтково-глицеролового разбавителя. Эквilibрация семени проводилась в течение 1—2 часов в темп. 5°C, а потом семя замораживалось на консистентной CO₂ и хранилось в жидком азоте 17—57 дней. Размораживание семени происходило в темп. 80°C в растворе 0,9% NaCl, предварительно смешанном с кислородом.

Были дважды осеменены 30 свиноматок в спонтанной охоте с применением дозы 120 мл, содержащей 5—7×10⁹ сперматозоидов. Из 30 осемененных свиноматок 2 опоросились, а во время контрольного забоя 6 свиноматок через 105 дней у одной из них была обнаружена беременность. Все эти три свиноматки были осеменены семенем того же самого хряка.

Lyczynski A. — Fertilizing ability of the frozen semen of boars.

The semen was taken from seven boars of two breeds. For freezing purposes the fraction of the semen with high number of spermatozoons with 80 per cent of initial mobility was used. The semen was stored for 1.5 hr at 30°C for stabilization. Then it was diluted two-fold to the proportion 1:2 (semen:diluent) by the use of a glucose-yolk-glycerol diluent. Equilibration of the semen was carried out for 1—2 hrs at 5°C and then it was frozen using CO₂ and stored in a liquid nitrogen for 17—57 days. The semen was unfrozen at 80°C in the solution of a 0.9 per cent NaCl which had been prior mixed with oxygen. Thirty pigs were inseminated twice during natural heat applying 120 ml of the material containing 5—7×10⁹ spermatozoons. Out of thirty inseminated sows only two gave piglets; of six sows killed after 105 days it was stated that one was pregnant. All the three sows were inseminated with the semen derived from the same boar.

JACEK KRÓLIŃSKI

Wpływ *Pseudomonas aeruginosa* na przeżywalność plemników w nasieniu buhajów

Z Instytutu Patologii i Terapii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR we Wrocławiu

Do często spotykanych w nasieniu buhajów drobnoustrojów zaliczyć należy bakterie z rodzaju *Pseudomonas* (2, 4, 5, 6, 7). Zarazki te mogą łatwo rozprzestrzeniać się w dużych skupiskach tych zwierząt (3). Z obserwacji własnych wynika, że przestrzeganie higieny utrzymania stadników nie zawsze w pełni zabezpiecza przed infekcją. Źródłem zakażenia buhajów mogą być między innymi bakterie znajdujące się w rzadko odkażanych studzienkach ściekowych. W badaniach własnych udało się wyizolować bakterie rodzaju *Pseudomonas* ze ścieków, a także ze ściółki znajdującej się w boksach. Usytuowanie studzienek w obrębie stanowisk stwarza korzystne warunki do zakażenia układu płciowego buhajów. Bakterie rodzaju *Pseudomonas* umiejscowione w układzie płciowym na ogół nie powodują schorzeń tego narządu. Opisano sporadyczny przypadek zapalenia gruczołów pęcherzykowych na tle infekcji tymi drobnoustrojami (6). Zakażenie

układu moczopłciowego, w tym także napletka, może być natomiast źródłem drobnoustrojów zanieczyszczających nasienie.

Skąpe dane piśmiennictwa krajowego na temat pałeczki ropy błękitnej na przeżywalność plemników w zanieczyszczonym nasieniu (1), skłoniły autora niniejszego doniesienia do podjęcia badań w tym kierunku.

Material i metody

Do badań użyto 240 ejakulatów pochodzących od 66 buhajów zgrupowanych w jednym z Zakładów Unasieniania. Nasienie uzyskiwano przy pomocy sztucznej pochwy, według ogólnie przyjętych zasad. Brało pod uwagę wyłącznie pierwsze ejakulatory. Nasienie poddawano badaniu bakteriologicznemu oraz określano czas przeżywania plemników w temperaturze 46,5°C i 4°C. Uzyskany materiał wysiewano na podłoża stałe (agar zwykły i wzbogacony dodatkiem 5% odwiłkniętej krwi baraniej). Posiewy inkubowano w temperaturze 37°C w ciągu 24—48 godzin. Drobnoustroje z rodzaju *Pseudomonas* identyfikowano na podstawie wyglądu wyrosniętych kolonii, ich zabar-