

MARIAN TISCHNER, TADEUSZ PIESTRAK, ADAM ZACHARA, MACIEJ ROBORZYŃSKI

Sztuczne unasiennianie owiec nasieniem pobieranym metodą elektroejakulacji

Z Instytutu Stosowanej Fizjologii Zwierząt i z Instytutu Hodowli i Technologii Produkcji Zwierzęcej AR w Krakowie

Pobieranie nasienia od tryków przy użyciu elektroejakulacji stosuje się tylko w specjalnych przypadkach. Dlatego też, gdy w jednej z ferm owczych wystąpiły kłopoty z przeprowadzeniem w sezonie stanówki, zdecydowano się na użycie zabiegów sztucznego unasienniania nasieniem pobieranym od tryków metodą elektroejakulacji. Wydawało się, że sposób postępowania a także uzyskane rezultaty mogą być interesujące zarówno dla praktyków, jak i z punktu widzenia poznawczego procesów rozrodu u owiec.

Materiał i metody

Jedno z gospodarstw państwowych zakupiło w grudniu 1976 r. w Bułgarii około 2200 maciorek rasy merynos bułgarski. Są to zwierzęta o użytkowości wełnistej, niewyrównane zarówno w cechach pokroju, jak i wełny. Średni ciężar ciała maciorek w wieku 2 lat wynosił 48 kg, a średnia produkcja wełny 7,8 kg. Oznaczona grubość wełny metodą laboratoryjną dla całej owcy wynosiła 24,0 mikrona a rendement 46,5%.

Opisane zwierzęta wykorzystano do obserwacji nad ich adaptacją do naszych warunków, nad produkcją wełny i mięsa oraz nad ich krzyżowaniem z trykami merynos polski, Ile de France, czarnogłówka i kent. Dla kojarzenia maciorek zakupiono na terenie kraju w kilku owczarniach zarodowych 53 tryki: 43 rasy merynos polski, 4 czarnogłówka, 3 kent i 1 Ile de France. W chwili zakupu tryki były w wieku 1,5—2 lat, a ciężar ciała wynosił 60—80 kg. Tryki umieszczono w oddzielnym pomieszczeniu w odległości 30—50 m od pomieszczeń, gdzie przebywały importowane maciorki.

Zywnienie maciorek oparte było głównie na zielonkach kośnych, korzystały one jednak również z pastwiska oraz otrzymywały mieszankę C.J. Natomiast trykom podawano dziennie około 2 kg owsa, 3 kg zielonki (lucerna, rośliny motylkowe) oraz mieszankę C.J; zwierzęta korzystały z ocienionego wybiegu.

Na początku czerwca 1977 r. rozpoczęto stanowienie i wówczas okazało się, że tylko 12 tryków przejawia normalny popęd płciowy (10 tryków rasy merynos polski, 1 rasy czarnogłówka i 1 Ile de France). Do połowy września nadal tylko 12 wymienionych tryków przejawiało popęd płciowy. Do pokrycia pozostało w tym czasie około 1600 maciorek.

Dla uniknięcia dalszych strat powodowanych opóźnieniem kojarzeń przeprowadzono próbę sztucznego unasienniania maciorek nasieniem tryków nie przejawiających popędu płciowego, które pobierano przy użyciu aparatu do elektroejakulacji. Posłużono się odbytową dwubiegunową elektrodą pierścieniową (2).

Nasienie pobierane przy użyciu elektroejakulacji poddawano ocenie makro- i mikroskopowej. Do inseminacji przeznaczono tylko nasienie gęste („D”), zawierające co najmniej 80% plemników ruchliwych i średni ruch falowy („++”). Nasienie zlewano od kilku tryków do jednego wyjałowionego naczynia szklanego, a następnie rozcieńczano rozrzedzalnikiem żółtkowo-cytrynianowym. Do 100 ml wody destylowanej dodawano: 0,8 g glukozy, 2,8 cytrynianu sodu, 20 ml

żółtka jaja kurzego oraz antybiotyki w ilości 50 tys. j.m. penicyliny i 50 mg streptomycyny. Każdego dnia przygotowywano świeży rozcieńczalnik, tylko wyjątkowo zostawiano część rozcieńczalnika w lodówce do następnego dnia. Nasienie rozcieńczano w stosunku 1:1 lub 1:2 (1 cz. nasienia i 2 cz. rozcieńczalnika) i przechowywano w temperaturze pokojowej nie dłużej niż 6 godzin.

Maciorki w rui wybierano ze stada przy użyciu tryka próbnika z podwiązanym fartuchem. Zabiegi unasienniania przeprowadzono za pomocą wziernika oraz szklanych pipet połączonych ze strzykawką o pojemności 2 ml. Około 70% maciorek unasienniano doszyjkowo, wprowadzając 0,2 ml rozcieńzonego nasienia do zewnętrznego ujścia szyjki macicznej. Pozostałe 30% maciorek o bardzo wąskiej pochwie unasienniano dopochwowo, wprowadzając pipetę po górnej ścianie sklepienia pochwy. Dla tak unasiennianych maciorek objętość wstrzykiwanego rozcieńzonego nasienia wynosiła 0,5 ml. Zabieg unasienniania wykonywano w rui tylko jeden raz, w krótkim czasie po wykryciu jej zewnętrznych objawów, w godzinach przedpołudniowych.

Wyniki

Badanie zachowania płciowego 43 tryków wykazało zarówno przy doprowadzeniu do maciorek w rui, jak i po wprowadzeniu maciorki do pomieszczeń tryków, brak odruchów płciowych. Po wprowadzeniu maciorki tryki gromadziły się zazwyczaj w jednym rogu pomieszczenia, a następnie pozostawione w spokoju zachowywały się w stosunku do niej całkiem obojętnie.

Tryki nie przejawiające popędu płciowego nie odbiegały od norm tak pod względem ogólnego stanu zdrowia, jak i stanu układu rozrodczego. Około 80% tryków posiadało normalną wielkość jąder. Konsystencja, wrażliwość jąder, najądrzy, powrózka nasiennego, napletka i prącia nie wykazywały żadnych zmian chorobowych. Jedynie w małej grupie tryków (20%) stwierdzono niewielkie jądra o wiotkiej konsystencji.

W wyniku przeprowadzonej elektroejakulacji okazało się, że po 4—7 impulsie elektrycznym większość tryków reaguje oddawaniem nasienia. Nasienie to u 80% tryków charakteryzowało się dobrą ruchliwością, gęstością i ruchem falowym. Koncentracja plemników wahała się, zależnie od objętości pobranego nasienia od $1,2—2,4 \times 10^9$ /ml. Pod względem morfologicznym plemniki również nie odbiegały od norm przyjętych dla wartościowych ejakulatów.

Nasieniem pobranym metodą elektroejakulacji od tryków nie przejawiających popędu

plciowego unasieniono ogółem 1380 maciorek. Po pierwszym zabiegu unasieniania nie powtórzyły rui 894 maciorki (65%). Pozostałe 486 maciorek inseminowano po raz drugi, z czego powtórzyło ruję 68 maciorek. Spośród inseminowanych maciorek 902 (66%) urodziły 960 jagniąt, w tym 58 bliźnięt. Poza tym zanotowano 21 poronień w 3—4 miesiącu ciąży i 12 martwo urodzonych jagniąt (tab. 1).

Tab. 1. Niektóre wskaźniki płodności maciorek krytych naturalnie lub unasienianych nasieniem tryków nie przejawiających popędu płciowego

	Krycie naturalne	Unasienianie
Termin	1.06.—4.08.1977	1.09.—15.10.77 r.
Liczba maciorek	521	1380
Niepowtarzalność rui po pierwszym zabiegu	425 (90%)	894 (65)
Wskaźnik porodów	468 (90%)	902 (66)
Liczba jagniąt żywych do 3 dnia po urodzeniu	500	960
Wskaźnik: plenności	1,09	1,06
poronień (%)	0,01	0,01
martwo urodzonych	0,02	0,01

Po naturalnym kryciu 521 maciorek w tym samym stadzie, nie powtórzyło rui 425 maciorek (82%). Po raz drugi ruję powtórzyło 10 szt. i zostały one następnie włączone do grupy maciorek inseminowanych. Z tej grupy 468 maciorek (90%) urodziło 500 jagniąt, w tym 32 bliźnięta. Zanotowano również 4 poronienia i 8 martwo urodzonych jagniąt.

Użycie metody elektroejakulacji u tryków nie przejawiających popędu płciowego i powtarzanie zabiegów przez około 6 tygodni nie spowodowało u nich żadnych zakłóceń zdrowia, a urodzone po inseminacji jagnięta niczym nie różniły się od jagniąt urodzonych w tym samym stadzie miesiąc wcześniej w wyniku naturalnego krycia maciorek trykami, które przejawiały normalny popęd płciowy.

Dyskusja

Uzyskane wyniki zapłodnień maciorek unasienianych nasieniem pobieranym metodą elektroejakulacji należy uznać za zadowalające. W stadzie owiec normalnie żywionych zachodzi w ciążę po naturalnym kryciu w sezonie trwającym 6—8 tygodni, około 90% maciorek (1). Rozdział czasowy, wynoszący jeden miesiąc pomiędzy grupą maciorek krytych naturalnie i inseminowanych, pozwolił na szczegó-

łowe zebranie wyników tych dwu grup maciorek, utrudnił natomiast bliższe porównanie wyników. Nie wiadomo bowiem, w jakim stopniu płodność tych grup była uzależniona od czynników sezonowych. Czynnikiem, który na pewno obniżył wskaźnik zapłodnień były maciorki o wąskiej pochwie, u których nie można było wprowadzić wzziernika do pochwy. Maciorki te były unasieniane dopochwowo. Przy tym typie zabiegu niepowtarzalność po pierwszym unasienianiu wynosi 30—40% (3).

Brak popędu płciowego u tak licznej grupy tryków zakupionych w kilku owczarniach na terenie Polski stanowi oddzielny problem. Płodność tych tryków oraz zachowanie płciowe nie było badane przed wprowadzeniem ich do omawianej fermy. Niemniej jednak nie można wykluczyć czynników hamujących odruchy płciowe oddziałujących już w czasie pobytu na omawianej fermie. Mogły to być odmienne substancje zapachowe niż pobudzające feromony wydzielane przez importowane maciorki, które w ten sposób mogły zahamować reakcje seksualne niedojrzałych całkiem tryków. Tryki te w ciągu następnego roku nadal nie przejawiały popędu płciowego i w końcu zostały wybrakowane. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają nasze wcześniejsze obserwacje, że ten gatunek zwierząt jest szczególnie wrażliwy na działanie czynników zapachowych (4).

Wnioski

Sztuczne unasienianie maciorek nasieniem pobranym metodą elektroejakulacji od tryków klinicznie zdrowych, lecz nie przejawiających popędu płciowego pozwoliło na:

- uzyskanie żywo urodzonych jagniąt od 66% maciorek,
- wykonanie planu pokryć.

Piśmiennictwo

- Bielanski W.: Rozród zwierząt. PWRiL, 1977.
- Bielanski W., Wierzbowski S.: Medycyna Wet. 12, 94, 1956.
- Frazer A. F.: Proc. 6 Int. Congr. Reprod. Anim. Insem. Paryż. 2, 1033, 1968.
- Tischner M.: Zesz. Probl. Post. Nauk roln. 95, 243, 1969.

Adres autora: doc. dr hab. Marian Tischner, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków.

Autorzy składają podziękowanie technikowi Stanisławowi Adamczykowi i Stanisławie Putowskiej za bezpośrednią pomoc przy unasienianiu i zebraniu materiału.

Тишнер М., Пестрак Т., Захара А., Робожинский М. — Искусственное осеменение овец семенем, взятым методом электроэякуляции.

Из 53 баранов, приобретенных по стране для спаривания их с 2200 овцематками, импортрованными из Болгарии, 41 баран не проявлял полового влечения. Эти бараны клинически не отличались от норм как в отношении общего состояния здоровья, так и состояния органов размножения. Семенем, взятым методом электроэякуляции, осеменили 1380 овцематок. После первого осеменения охоты не повторило 65% маток. В общем получили 960 ягнят от 902 маток, осемененных семенем, взятым методом электроэякуляции от баранов, не проявлявших полового влечения.

Tischner M., Piestrak T., Zachara A., Roberzyński M.
— Artificial insemination of sheep with the semen
obtained by electroejaculation method.

Among 53 Polish rams destined for mating with
2200 ewes imported from Bulgaria, 41 did not reveal
any sexual desire. Their healthy state and reproducti-

ve organs were normal. With the semen obtained by
an electroejaculation method 1380 ewes were artifi-
cially inseminated. After the first insemination, oes-
trus did not appear in 65% of females. Generally 960
lambs from 902 artificially inseminated ewes were
obtained.

ZDZISŁAW SMORAĞ, STEFAN WIERZBOWSKI, EDWARD WIERZCHOŚ,
LUCYNA KAŃSKA, BARBARA GAJDA

Konserwacja zarodków bydłych w temperaturze ciekłego azotu oraz wyniki transplantacji

Z Zakładu Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt Instytutu Zootechniki,
w Balicach k. Krakowa

W latach 70-tych obserwuje się duże zainteresowanie transplantacją zarodków jako metodą rozrodu w hodowli bydła. Jakkolwiek cele, jakie można osiągnąć poprzez zastosowanie transplantacji mogą być różne, to wydaje się, że ich realizacja zależy przede wszystkim od efektywności i możliwości praktycznych prowadzenia tej metody. Jednym z głównych problemów, jaki powinien być rozwiązany, aby metoda transplantacji spełniała wymienione warunki, jest opracowanie metody długotrwałej konserwacji zarodków. W warunkach laboratoryjnych bowiem zarodki bydłce zachowują zdolności życiowe jedynie przez kilka godzin, a możliwość ich konserwacji w środowisku płynnym, wynosząca około 1—2 dni (4, 8, 9), nie rozwiązuje problemów organizacyjnych transplantacji.

Warunkiem udanej transplantacji, jak wiadomo, jest ścisła synchronizacja biorczyń i dawczyń. Z drugiej strony wyniki superowulacji u bydła są bardzo różne, co w praktyce stwarza duży problem organizacyjny przy przygotowaniu właściwej liczby biorczyń. Wszystkie te trudności rozwiązuje konserwacja zarodków przez zamrażanie w ciekłym azocie, zezwalające na ich wykorzystanie w dowolnym miejscu i czasie, w zależności od potrzeb.

Pierwsze cielę po transplantacji mrożonych zarodków bydłych uzyskano w 1973 r. w Cambridge (19). Kolejne porody krów po transplantacji mrożonych zarodków miały miejsce w następnych latach również w Cambridge (16, 17, 18) i w Australii (1, 3), a ostatnio w Danii (2) i Kanadzie (5).

Prace nad zamrażaniem zarodków zwierząt gospodarskich, owiec i krów, rozpoczęli autorzy w 1975 r. W efekcie tych prac uzyskano na początku 1977 r. (7) pierwsze jagnięta. Równolegle prowadzono badania nad zamrażaniem zarodków bydłych, w wyniku których uzyskano na początku bieżącego roku pierwsze cielęta po transplantacji mrożonych zarodków.

Materiał i metody

A. Przygotowywanie zwierząt i uzyskiwanie zarodków. Dawczyniami zarodków były jałówki ras ncb, cp i krzyżówki tych ras w wieku od 18 do 24 miesięcy. Jałówki przygotowywano do superowulacji wg metody opisanej przez Wierzchosia i wsp. (12). Wypłukiwanie zarodków przeprowadzano operacyjnie (13) w 7 dniu od wystąpienia objawów ruń (dzień ruń = dzień 0). Zarodki uzyskane w tym czasie znajdowały się w stadium rozwoju od późnej moruli do ekspandującej blastocysty. Do płukania używano uzupełnionego płynu Dulbecco (10) o temp. 35—37°C. Od momentu pobrania zarodków do rozpoczęcia mrożenia upływały ok. 2 godziny. Był to czas potrzebny na wyszukanie zarodków, ich ocenę i pozostałe czynności związane z przygotowaniem do mrożenia.

B. Zamrażanie i rozmrażanie zarodków. Po przeprowadzeniu oceny morfologicznej uzyskane zarodki, oceniane jako morfologicznie normalne, dzielono w zależności od stadium rozwoju i zamrażano w oddzielnych próbkach. Metody zamrażania i rozmrażania zarodków były zbliżone do podanych wcześniej w pracy dotyczącej zamrażania zarodków owczych (7). Różnica dotyczyła szybkości schładzania zarodków od temperatury pokojowej do temp. —6°C, które następowało w tempie ok. 1,5°C/min. Bezpośrednio po osiągnięciu w próbkach temperatury —6°C dokonywano posiewania kryształków lodu (6). Mrożenie przeprowadzano ze stałą szybkością 0,27°C/min. do temp. —80 lub —100°C. Po osiągnięciu wymienionych temperatur próbki z zarodkami przenoszono do ciekłego azotu, gdzie były przechowywane przez okres od kilkunastu dni do pół roku.

Rozmrażanie wykonywano ze średnią szybkością ok. 12—14°C/min. Po osiągnięciu przez próbki temperatury od —8 do —6°C przenoszono je do łaźni wodnej o temp. +25°C na 5 minut, a następnie dokonywano oceny morfologicznej zarodków i przeprowadzano je przez malejące stężenia DMSO w płynie Dulbecco (14).

Transplantacja zarodków następowała w ciągu 1 godziny od momentu rozmrożenia.

C. Transplantacja. Zarodki transplantowano jałówkom lub krowom znajdującym się w naturalnym lub zsynchronizowanym cyklu płciowym w dniu odpowiadającym wiekowi transplantowanego zarodka. Wprowadzanie zarodków odbywało się albo metodą chirurgiczną przez wykonanie laparotomii w linii białej, bądź też przez cięcie z boku zwierzęcia, albo metodą niechirurgiczną (11).