

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 Unasienniania 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 rac 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).

Wyniki i omówienie

Ogółem odzyskano po rozmrożeniu 125 zarodków zamrażanych do temperatury -80 lub -100°C przed przełożeniem do ciekłego azotu (tab. 1 i 2).

na w linii białej pozwala na ocenę jakości metody mrożenia zarodków. Uzyskane wyniki w postaci żywo urodzonych cieląt (ryc. 1) oraz cielnych bioreczyń wskazują na możliwość uzyskania efektywności transplantacji w granicach 50% (tab. 3). Jakkolwiek największą

Tab. 1. Stan morfologiczny zarodków bydłych zamrażanych do temp. -80°C przed przełożeniem do ciekłego azotu

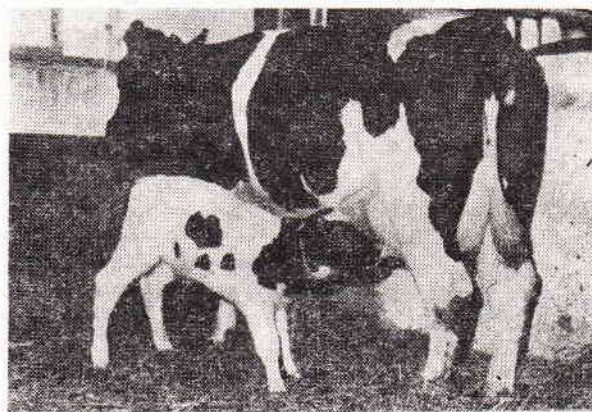
Stadium rozwoju mrożonych zarodków	Liczba zarodków odzyskanych po rozmrożeniu	Stan morfologiczny zarodków po rozmrożeniu: liczba i %			
		normalne	normalne z pękniętą osłonką przejrzystą	częściowo uszkodzone	częściowo uszkodzone z pękniętą osłonką przejrzystą
Późna morula i wczesna blastocysta	33	21 (63,7%)	10 (30,3%)	1 (3,0%)	1 (3,0%)
Blastocysta	14	12 (85,8%)	1 (7,1%)	0 (0,0%)	1 (7,1%)
Razem	47	33 (70,2%)	11 (23,4%)	1 (2,1%)	2 (4,3%)

Na 47 rozmrożonych zarodków, które były zamrażane do temp. -80°C , 33 zarodki (70,2%) oceniono jako morfologicznie normalne, a u pozostałych stwierdzono uszkodzenia osłonki przejrzystej, bądź niektórych blastomerów (tab. 1).

Na 78 zarodków zamrażanych do temp. -100°C , 64 (82,0%) oceniono jako morfologicznie normalne, a u pozostałych obserwowano podobne uszkodzenia, jak w grupie zarodków mrożonych do temp. -80°C , przy czym uległ zmniejszeniu odsetek zarodków z uszkodzoną osłonką przejrzystą (tab. 2). Ocena morfologiczna zarodków po rozmrożeniu wykazała ponadto, że niezależnie od końcowej temperatury ich zamrażania (-80 czy -100°C) wyższy odsetek zarodków morfologicznie normalnych osiągnęto w przypadku zarodków w stadium ekspandującej blastocysty niż w grupie zarodków znajdujących się w stadium rozwoju od późnej moruli do wczesnej blastocysty (tab. 1 i 2). Najniższy odsetek zarodków morfologicznie normalnych stwierdzono w grupie zarodków w stadium moruli, jednakże liczebność tej grupy była niewielka i trudno w tej sytuacji wnioskować o zamrażalności zarodków tego stadium rozwoju (tab. 2).

Na obecnym etapie opanowania metod wprowadzania zarodków jedynie metoda chirurgicz-

liczbę cielnych krów uzyskano po transplantacji zarodków w stadium od późnej moruli do wczesnej blastocysty zamrażanych do temp. -100°C , to dotychczasowy stan badań nie pozwala na wnioskowanie o skuteczności zamrażania zarodków w innych stadiach rozwoju czy też zamrażanych do temp. -80°C (tab. 3). Niemniej jednak pozytywne wyniki uzyskane po transplantacji ekspandujących blastocyst świadczą o możliwości skutecznego zamrażania zarodków w tym stadium rozwoju.



Ryc. 1. Pierwsze cielę urodzone w Polsce po transplantacji mrożonych zarodków

Fot. A. Turczański

Tab. 2. Stan morfologiczny zarodków bydłych zamrażanych do temp. -100°C przed przełożeniem do ciekłego azotu

Stadium rozwoju mrożonych zarodków	Liczba zarodków odzyskanych po rozmrożeniu	Stan morfologiczny zarodków po rozmrożeniu: liczba i %			
		normalne	normalne z pękniętą osłonką przejrzystą	częściowo uszkodzone	częściowo uszkodzone z pękniętą osłonką przejrzystą
Morula	5	2 (40,0%)	0	3 (60,0%)	0
Późna morula i wczesna blastocysta	57	47 (82,4%)	3 (5,3%)	5 (8,8%)	2 (3,5%)
Blastocysta	16	15 (93,7%)	0	0	1 (6,3%)
Razem	78	64 (82,1%)	3 (3,8%)	8 (10,3%)	3 (3,8%)

Tab. 3. Wyniki transplantacji mrożonych zarodków bydłych

Metoda transplantacji	Stadium rozwoju zarodków	Końcowa temperatura zamrażania przed przełożeniem do ciekłego azotu	Liczba biorczyń	Stan morfologiczny transplantowanych zarodków			Transplantacja do rogu		Wyniki
				normalne	normalne z pękniętą osłonką przejrzystą	częściowo uszkodzone	prawego	lewego	
W linii białej	późna moruła	-80°C	1	2	—	—	—	2	negatywny
	wczesna blastocysta	-100°C	9	18	1	—	8	11	2 wyciel. + 3 cielne
	blastocysta	-80°C	2	4	—	—	2	2	1 wycielona
	Razem		12	24	1	—	10	15	3 wyciel. + 3 cielne
Z boku	późna moruła	-80°C	7	6	4	1	7	4	negatywny
	wczesna blastocysta	-100°C	8	14	1	—	6	9	negatywny
	blastocysta	-80°C	3	5	1	—	4	2	2 wycielone
	blastocysta	-100°C	3	4	—	—	1	3	2 cielne
	Razem		21	29	6	1	18	18	2 wyciel. + 2 cielne
Niechirurgiczna	moruła	-100°C	2	2	—	—	2	—	2 cielne
	późna moruła	-80°C	2	3	1	—	—	4	negatywny
	wczesna blastocysta	-100°C	4	8	—	—	4	4	1 cielna
	blastocysta	-80°C	2	2	1	—	—	3	negatywny
	blastocysta	-100°C	7	11	1	1	6	7	negatywny
	Razem		17	26	3	1	12	18	3 cielne

Efektywność transplantacji metodą chirurgiczną w linii białej mrożonych zarodków bydłych osiągnięta w przedstawionych badaniach kształtuje się na poziomie rezultatów uzyskanych przez Willadsena i wsp. (16) oraz Lohn-Jonsena i Greve'a (2). Wyższą efektywność transplantacji uzyskali Willadsen i wsp. (15), jednakże zamrażali oni jedynie wybrane zarodki znajdujące się w stadium późnej moruli — wczesnej blastocysty. Autorzy ci przypisują zarodkom w tym stadium rozwoju najwyższą podatność na zamrożenie. Zamrożenie zarodków do temp. -100°C wydaje się korzystniejsze w porównaniu z zamrożeniem do temp. -80°C , o czym świadczyłyby również wyniki oceny morfologicznej.

Wydaje się, że obecnie uzyskane wyniki po transplantacji mrożonych zarodków bydłych umożliwiają już stosowanie tej metody w realizacji określonych celów praktycznych np. międzynarodowej wymiany zarodków. Szersze wprowadzenie zamrażania jako metody konserwacji zarodków wymaga dalszego zwiększenia jej efektywności. Mając na uwadze łatwość praktycznego zastosowania tej metody konserwacji, należałoby również uprościć postępowanie przy zamrażaniu, a zwłaszcza przy rozmrażaniu zarodków. Biorąc pod uwagę, że praktyczne zastosowanie transplantacji jest uwarunkowane niechirurgicznymi metodami wprowadzania zarodków, optymalnym rozwiązaniem byłoby zamrażanie zarodków w słomkach, bez skomplikowanych czynności laboratoryjnych po ich rozmrożeniu.

Piśmiennictwo

1. Bilton R. J., Moore N. W.: J. Reprod. Fert. 50, 363, 1977.
2. Lehn-Jensen H., Greve T.: Theriogenology. 1978 (w druku).
3. Moore N. W., Bilton R. J.: Proc. VIIIth Int. Cong. Anim. Reprod. A.I. 3, 306, 1976.
4. Renard J. P., du Mesnil du Buisson F.: Proc. VIIIth Int. Cong. Anim. Reprod. A.I. 3, 309, 1976.
5. Shea B. F., Ollis G. W., Jacobson M. E.: Can. J. Anim. Sci. 57, 301, 1977.
6. Smorąg Z., Kątska L., Wierzbowski S.: Roczn. Nauk. Zoot. 3, 21, 1976.
7. Smorąg Z., Wierzbowski S., Wierchoś E., Karetka W., Gajda Z.: Medycyna Wet. 9, 552, 1977.
8. Sreenan J., Scanton P., Gordon J.: J. agric. Sci., Camb. 74, 593, 1970.
9. Trounson A. O., Willadsen S. N., Rowson L. E. A., Newcomb R.: J. Reprod. Fert. 46, 173, 1976.
10. Whittingham D. G.: Nature, 233, 123, 1971.
11. Wierzbowski S., Wierchoś E., Smorąg Z., Gajda B.: Biuletyn VI Zjazdu PTNW Wrocław 1, 102, 1978.
12. Wierchoś E., Smorąg Z., Wierzbowski S., Gajda B.: Medycyna Wet., 34, 653, 1978.
13. Wierchoś E., Wierzbowski S., Smorąg Z., Gajda B.: Uzyskiwanie zarodków u bydła. Materiały na Zjazd PTNW, Wrocław 1978 (w druku).
14. Willadsen S. M., Polge C., Rowson L. E. A., Moor R. M.: Society for Cryobiology, 11th ann. meeting, 73, London 1974.
15. Willadsen S., Polge C., Rowson L. E. A.: J. Reprod. Fert. 52, 391, 1978.
16. Willadsen S. M., Trounson A. O., Polge C., Rowson L. E. A., Newcomb R.: Egg Transfer in Cattle. Ed. L. E. A. Rowson, Comm. Europ. Comm., Luxemburg, 117, 1965.
17. Willadsen S. M., Trounson A. O., Rowson L. E. A., Polge C., Newcomb R.: Proc. VIIIth Int. Cong. Anim. Reprod. A.I. 3, 329, 1976.
18. Wilmut I., Rowson L. E. A.: J. Reprod. Fert. 33, 352, 1973.
19. Wilmut I., Rowson L. E. A.: Vet. Rec. 92, 686, 1973.

Adres autora: dr Zdzisław Smorąg, 32-083 Balice k/Krakowa, Instytut Zootechniki.

Сморонг З., Вежбовский С., Вежхось Э., Контская Л., Гайда В. — Консервация зародышей крупного рогатого скота в температуре жидкого азота.

По методу Вилладсена и соавт. (1976 г) замораживали 125 зародышей крупного рогатого скота в стадии развития от морулы до бластоцисты. Первую группу зародышей (47) замораживали до температуры -80°C , а вторую (78 зародышей) — до температуры -100°C , перед помещением их в жидкий азот. Хра-

нение в жидком азоте продолжалось от нескольких дней до шести месяцев. Размораживание зародышей проводили со средней скоростью от 12 до 14°C/мин.

В морфологической оценке после размораживания установили: в первой группе 70,2% морфологически нормальных зародышей, а во второй — 82,2%.

После размораживания зародыши трансплантировали, применяя хирургические методы по белой линии или „сбоку”, а также нехирургическим методом.

- a) Хирургический метод по белой линии — трансплантировали 24 зародыша 12 реципиенткам, получая 6 стельностей (3 телки уже отелились).
- б) Хирургический метод „сбоку” — трансплантировали 29 зародышей 21 реципиентке, получая 4 стельности (2 телки уже отелились).
- в) Нехирургический метод — трансплантировали 26 зародышей 17-ти реципиенткам, получая 3 стельности.

На этом этапе освоения методов трансплантации зародышей только результаты, полученные при использовании хирургического метода по белой линии, могут быть приняты за показатели ценности замораживаемых зародышей. Указывают они на

возможность достижения эффективности трансплантации замороженных зародышей в пределах 50%.

Smorağ Z., Wierzbowski S., Wierzchoś E., Kańska L., Gajda B. — **Conservation of cattle embryos in liquid nitrogen and results of embryotransfer.**

One hundred and twenty five cattle embryos, developed from the morula to blastocyst stage, were frozen acc. to Willadsen et al. Group I containing 47 embryos were frozen to -80°C and 78 fetuses of group II up to -100°C before being placed in liquid nitrogen. The storage time in liquid nitrogen lasted from several days to six months. Thawing time averaged $12-14^{\circ}\text{C}/\text{min}$. After thawing 70.2% of the embryos were in group I normal morphologically and in group II 82.2%. Thawed fetuses were transferred surgically either by laparotomy or flank-section, or non-surgically. Twenty four embryos transplanted by laparotomy into 12 recipients resulted in 6 pregnancies, of 29 fetuses transplanted by surgical in flank into 21 recipients led to 4 pregnancies, and out of 26 embryos introduced to 17 recipients resulted in 3 pregnancies. The results obtained indicate that laparotomy is an effective method for transplanting frozen embryos. It appears to give a 50% success rate.

PRAKTYKA LABORATORYJNA

JADWIGA PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA, MARIA ŻUK

Trudności analityczne związane z chemicznym oznaczaniem aflatoksyn w paszach

Z Zakładu Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii w Puławach

Aflatoksyny zaliczane są obecnie nie tylko do związków szczególnie toksycznych, ale również do grupy najsilniejszych karcynogenów. Od kiedy dowiedziono, że mogą one przenikać z paszy do tkanek zwierząt i mleka, wykrywanie i oznaczanie ilościowe aflatoksyn i innych mikotoksyn w paszy dla zwierząt stało się podobnie ważne dla toksykologii, jak i higieny żywności. Wielu autorów zwraca uwagę na trudności analityczne i możliwość popełniania błędów przy oznaczaniu aflatoksyn w paszach, a zwłaszcza w mieszankach paszowych, na skutek występowania niekiedy tzw. związków interferujących, które w przebiegu analizy mogą zachowywać się podobnie jak aflatoksyny.

Ashworth i wsp. (1) stwierdzali w nasionach bawełny obecność niebiesko fluoryzujących substancji o takich samych wartościach R_f jak aflatoksyny B, które znikaly pod wpływem światła UV już po upływie 1 godz. i nie dawały reakcji charakterystycznych dla aflatoksyn. Stefaniakowa (18) zwróciła uwagę, że powszechnie stosowany antyoksydant etoksychina (Ethoxyquin, Kurasane, Santoquin) daje na chromatogramach cienkowarstwowych (TLC) plamy interferujące z aflatoksynami. Po do-

kładniejszych badaniach okazało się, że fluoryzujące związki nie były etoksychiną a towarzyszącymi jej w próbkach handlowych zanieczyszczeniami. Podczas badania próbek pszenicy na zawartość aflatoksyn Shotwell i wsp. (14) stwierdzili obecność szeregu fluoryzujących substancji zachowujących się na płytach TLC jak aflatoksyny B₁ i G₁. Interferujących związków nie udało się usunąć przez wytrącanie octanem ołowiu, stosowanie chromatografii podziałowej czy chromatografii na żelach krzemionkowych. Dopiero tworzenie pochodnych z kwasem trójfluorooctowym oraz mrówkowym i octowym w obecności chlorku tionylu pozwoliło ustalić, że związki te nie były aflatoksynami. Po dokładniejszych badaniach stwierdzono, że interferujące substancje występowały w łupinach ziarna.

Seitz i wsp. (13) wykazali w ziarnie sorga obecność fluoryzujących metabolitów pleśni z rodzaju *Alternaria* (alternariol i etylowy eter alternariolu), które mogą również powodować błędy przy oznaczaniu aflatoksyn. Podobnie Rambo i wsp. (12) obserwowali występowanie fluoryzujących substancji w ekstraktach ziarna kukurydzy zaszczepionego *Aspergillus flavus* i