WIESŁAW BIELAS

Ocena jakości nasienia knura zamrażanego w słomkach

Katedra Rozrodu Zwierząt i Klinika Położnicza Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, Pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Summary

Estimation of the quality of boar semen freezing in straws

The techniques of freezing boar semen in 5 ml straws was evaluated *in vitro*. Semen was processed and frozen according to the method described by Westendorf et al. (1975). The average post-thaw motility in 72 ejaculates from 3 boars was 21% and the percentage of spermatozoa with normal apical ridges was 54%. A significant decrease in the percentage of spermatozoa with a proper motility and an increase in the percentage of spermatozoa with acrosomal damages were observed during dilution, cooling, freezing and thawing.

Początkowo zamrażano nasienie knura w formie kulek na suchym lodzie (3, 10, 11). Na korzyść metody kulkowej przemawiała krótsza ekspozycja nasienia na niską temperaturę, która w znacznej mierze minimalizowała szkodliwy wpływ zamrażania na właściwości biologiczne plemników knura (10). Następnie konserwowano nasienie knura w niskich temperaturach w słomkach plastykowych o różnej objętości i polu przekroju (1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 12). W przeciwieństwie do nasienia zamrażanego w kulkach, nasienie konserwowane w słomkach w minimalnym stopniu narażone jest na możliwość zainfekowania, ponieważ stwierdzono, iż mikroby przeżywają proces krioprezerwacji (5). Nasienie zamrażane w metodzie kulkowej może zostać zakażone w trakcie składowania w ciekłym azocie, jak również w procesie rozmrażania. Nasienie zamrażane w tej formie wymaga większej powierzchni składowania niż słomki, ponadto jest trudniejsze do oznaczenia i rozmrażania, do jednej dawki inseminacyjnej niezbędna jest większa ilość kulek. Podstawowym warunkiem w metodzie kulkowej jest stała dostępność suchego lodu w laboratorium. Natomiast w przypadku metody słomkowej, nasienie wewnątrz opakowania jest skutecznie zabezpieczone przed ujemnymi aspektami zamrażania w formie kulek.

Celem badań było określenie wpływu zamrażania w statycznych parach ciekłego azotu, na jakość nasienia knura konfekcjonowanego w słomkach o objętości 5 mililitrów.

Materiał i metody

Doświadczenia wykonywano na 72 ejakulatach pobieranych ręcznie jeden raz w tygodniu od 3 knurów w wieku od 2 do 5 lat, znajdujących się w Katedrze Rozrodu Zwierząt AR we Wrocławiu. Badano wyłącznie frakcję nasienia bogatą w plemniki, którą filtrowano natychmiast po pobraniu. Oceniano ruchliwość nasienia, do zamrażania przeznaczano ejakulaty o ruchliwości powyżej 70%. Przygotowanie do zamrażania oraz właściwą konserwację nasienia w niskich temperaturach przeprowadzano według zmodyfikowanej metody dużych słomek lub makrotub, wprowadzonej przez Westendorfa (12).

Nasienie o odpowiedniej ruchliwości i koncentracji, po pobraniu umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 32°C na okres 15 minut w celu wyrównania temperatur. Rozrzedzenie wstępne nasienia wykonywano w stosunku 1:1 lub 1:2 w rozrzedzalniku Mercka w izolowanych pojemnikach szklanych o objętości 250 ml. W skład rozrzedzalnika Merck wchodzi glukoza – 60,0 g; cytrynian sodu $\times 2H_2O$ – 3,7 g; EDTA – 3,7 g; $NaHCO_3$ – 1,2 g; gentamycyna – 0,018 g; woda destylowana do 1000 ml. Po rozrzedzeniu schładzano nasienie przez 3 godziny do 15°C. Po tym czasie próbki rozrzedzonego nasienia wirowano przez 10 minut przy 800 g w temperaturze 15°C bez hamowania. Osad składający się z plemników rozrzedzano rozcieńczalnikiem „zimnym" składającym się z 80% – 11% roztworu laktozy i 20% żółtka jaja kurzego. Rozrzedzone nasienie schładzano w lodówce do 5°C przez okres 1,5 godziny, stopniowo dodając odpowiednią ilość rozrzedzalnika „zimnego" aż do otrzymania docelowej koncentracji $1,5 \times 10^9$ plemników w 1 mililitrze. Próbki rozrzedzano następnie rozrzedzalnikiem „zamrażalniczym" do koncentracji końcowej wynoszącej 1 miliard plemników w 1 mililitrze nasienia. Skład rozrzedzalnika „zamrażalniczego": 92,5% rozrzedzalnika „zimnego", 6% glicerolu oraz 1,5% substancji despergującej frakcję lipoproteinową żółtka jaja kurzego – Orvus Es Pastę, (produkt Minitüb GmbH). Po rozrzedzeniu ostatecznym napełniano makrotuby przygotowanym nasieniem przy pomocy strzykawki o pojemności 20 ml z igłą Łopatyńskiego. Makrotuby można również określać mianem dużych rurek lub słomek. Są to pojemniki wykonane z polietylenu na Politechnice Wrocławskiej o wymiarach: długość – 28 cm, średnica zewnętrza – 7 mm, grubość ścianki – 0,5 mm, objętość – 5 ml odpowiadająca w tym przypadku koncentracji rzędu 5 miliardów plemników w słomce. Dokładnie oznaczone rurki zamykano stalowymi kulkami o odpowiedniej średnicy, ustalając w centrum opakowania pęcherzyk powietrza. Słomki zamrażano w parach azotu przez horyzontalne umieszczenie ich na stalowym wieszaku, w styropianowym pudełku o wymiarach 40×30×15 cm, 5 cm nad lustrem ciekłego azotu przez okres 20 minut. Poziom ciekłego azotu w kontenerze wynosił 3 cm, w strefie gdzie znajdowały się słomki temperatura kontrolowana termometrem kontaktowym wahała się w granicach -120°C. Po zamrożeniu rurki umieszczano w kontenerze z ciekłym azotem. Słomki rozmrażano najwcześniej po 24 godzinach przez zanurzenie i obracanie w łaźni wodnej o temperaturze 50°C przez 40 sekund, temperatura nasienia po rozmrożeniu wynosiła od 20 do 25°C. Rozmrożone nasienie niezwłocznie rozrzedzano rozrzedzalnikiem Merck o temperaturze pokojowej w stosunku 1:10.

Ruchliwość nasienia badano po pobraniu, po rozrzedzeniu, przed zamrożeniem oraz po 30 minutowej i 3 godzinnej inkubacji w temperaturze 30°C po rozmrożeniu i rozrzedzeniu rozrzedzalnikiem Merck.

Po rozmrożeniu szczególną uwagę zwracano na ocenę morfologii akrosomów plemników, które utrwalano roztworem formalinowo-cytrynianowym o składzie: cytrynian sodu – 2,9 g, formaldehyd – 4 ml, woda destylowana do 100 ml. Morfologię akrosomów rozpatrywano w oparciu o powszechnie stosowaną

w ocenie rozmrożonych plemników knura metodę Pursela, uwzględniając odsetek plemników z normalnym, niezmienionym akrosomem (9).

Koncentrację nasienia określano przy użyciu komory Thoma-Zeissa. Z każdego badanego ejakulatu po pobraniu sporządzano preparaty mikroskopowe barwione metodą bydgoską do oceny morfologicznej plemników.

Wyniki i omówienie

Badania przed zamrożeniem i po rozmrożeniu przeprowadzono na 72 ejakulatach. Po wirowaniu przeciętnego ejakulatu około 20% komórek pozostawało w płynie nad osadem, procesowi zamrażania poddawano pozostałe 80% – średnio około 30×10^9 plemników. Z każdego ejakulatu sporządzano 6 dużych słomek o zawartości 5×10^9 plemników każda. Jakość nasienia po rozmrożeniu oceniano na podstawie odsetka plemników o ruchu prawidłowym oraz procentu komórek płciowych z nieuszkodzonym akrosomem. Odsetek plemników o ruchu prawidłowym badano po oddzieleniu frakcji żelowej od ejakulatu, po rozrzedzeniu wstępnym i ostatecznym przed zamrożeniem i po rozmrożeniu. Morfologię akrosomów badano bezpośrednio po rozmrożeniu. Ocenę ruchliwości przeprowadzano 30 minut po rozmrożeniu ze względu na lepkość rozrzedzalników stosowanych do zamrażania. Test przeżywalności plemników po rozmrożeniu przeprowadzano w temperaturze 30°C przez okres 3 godzin.

Wyniki laboratoryjnych badań jakości nasienia przed zamrażaniem i po rozmrożeniu prezentuje tab. 1.

Tab. 1. Jakość nasienia knurów przed procesem zamrażania i po rozmrożeniu

Nr knura	Liczba badanych ejakulatów	Objętość frakcji plemnikowej w ml	Koncentracja w tys/mm^3	Zmiany plemników		Procent plemników o ruchu prawidłowym				Procent plemników z niezmienionym akrosomem tuż po rozmrożeniu
				pierwotne	wtórne	wkrótce po pobraniu i rozrzedzeniu wstępnym	po wirowaniu i schłodzeniu do +5°C	po rozmrożeniu i 0,5 h inkubacji w temperaturze 30°C	3 h po rozmrożeniu i inkubacji w temperaturze 30°C	
D	29	83,50	441	3,30	5,75	75,00	63,50	18,00	5,10	55,96
14	23	81,00	486	2,65	3,55	72,80	58,70	22,60	14,20	53,65
19	20	77,50	448	1,70	4,10	76,80	57,10	23,25	13,70	52,65
suma – *	72	81,00	456	3,00	4,45	74,90	59,70	21,28	11,00	54,08
średnio – +	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Zaobserwowano istotne obniżenie odsetka plemników o ruchu prawidłowym po procesie wirowania i schłodzeniu do 5°C. Po rozmrożeniu nasienia i 30 minutowej inkubacji w temperaturze 30°C, 21% plemników poruszało się ruchem postępowym. Po dalszych 3 godzinach inkubacji, właściwości ruchowe posiadało około 10% komórek płciowych. Bezpośrednio po rozmrożeniu nieuszkodzony akrosom stwierdzono u 54% plemników.

Jako kryterium badań jakości nasienia przed i po rozmrożeniu przyjęto ocenę ruchliwości plemników i integralności ich akrosomów. Są to najczęściej na świecie stosowane wskaźniki oceny jakości mrożonego nasienia knura (1). Wymienione testy przeprowadza się w celu określenia zdolności do zapłodnienia komórki jajowej przez rozmrożone plemniki. Przy ocenie jakości mrożonego nasienia knura zauważono wysoką wzajemną korelację pomiędzy badanymi wskaźnikami (6). Niemniej jednak zauważono, iż parametry te nieco słabiej skorelowane są z wskaźnikiem oproszeń i liczebnością miotów po inseminacji nasieniem mrożonym (1, 5). Ponadto nadal najbardziej miarodajnym wyznacznikiem jakości mrożonego nasienia pozostaje próba biologiczna polegająca na inseminacji samic nasieniem mrożonym (7).

Wynikiem wczesnych doświadczeń w badaniach nad konserwacją nasienia knura w niskich temperaturach w oparciu o metody zamrażania nasienia buhaja, było utrzymanie zdolności ruchowej plemników, nie rokującej jednak zapłodnienia komórki jajowej i urodzenia żywych prosiąt od loch (6, 7). Dlatego ocena ruchliwości plemników knura po rozmrożeniu, uważana jest za mniej miarodajny wskaźnik w przewidywaniu o zdolności do zapłodnienia samic nasieniem mrożonym. Obniżenie procentu plemników o ruchu prawidłowym jest naturalną konsekwencją konserwacji w niskich temperaturach. Jest to poważnym problemem dotyczącym szczególnie mrożonego nasienia knura, co potwierdza również przeprowadzone doświadczenie. Udowodniono, iż rozrzedzanie, wirowanie, schładzanie, mrożenie i rozmrażanie istotnie obniża odsetek plemników o ruchu prawidłowym (1, 6, 7, 10, 12). Po rozmrożeniu nasienia zamrażanego w kulkach, plemniki o ruchu postępowym stanowią od 20 do 50% ogólnej liczby komórek płciowych, natomiast po rozmrożeniu nasienia konfekcjonowanego w dużych słomkach odpowiednio od 20 do 40% (1, 3, 8, 10, 11, 12).

Ocena budowy akrosomu plemnika jest obok ruchliwości, jednym z głównych wskaźników oceny jakości nasienia po rozmrożeniu, użytecznym szczególnie w rokowaniu o spodziewanej zdolności do zapłodnienia komórek jajowych samicy (7). Udowodniono dużą przydatność tego wskaźnika przy ocenie jakości rozmrożonego nasienia knura (1, 5, 7). Plazma błon oraz zewnętrzna partia akrosomu plemnika knura jest szczególnie podatna na uszkodzenia spowodowane procesem konserwacji w niskich temperaturach (4, 6, 9). W nasieniu świeżym po pobraniu, nieuszkodzony akrosom posiada powyżej 90% komórek, natomiast tuż po rozmrożeniu zarówno kulek jak i słomek, naruszoną strukturę akrosomu wykazuje od 40 do 60% plemników knura (1, 2, 7, 8).

Reasumując należy stwierdzić, że procesy rozrzedzania, schładzania, zamrażania i rozmrażania nasienia knura w słomkach o objętości 5 ml istotnie obniżają procent plemników o ruchu prawidłowym oraz podnoszą odsetek komórek z uszkodzonym akrosomem.

Piśmiennictwo

1. *Almlid T.*: Zuchthyg. 22, 193, 1987.
2. *Aumüller R.*: Tiefgefrierung von Ebersamen in Kunstoffrohren Uberprüfung des Einflusses der Zentrifugationstechnik im Besumungsversuch unter Praxisbedingungen. Praca dokt., Hannover 1982.
3. *Badura J.*: Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 263, 225, 1986.
4. *Bwanga C.*: Cryopreservation of Boar Semen. Studies on Freezing, Packing and Fertilizing Capacity. Praca dokt., Uppsala 1990.
5. *Hammit D. G., Martin P. A.*: Theriogenology 32, 359, 1989.
6. *Hofmo P. O., Almlid T.*: 2-nd Int. Conf. Deep Freezing of Boar Semen. Beltsville 1990, s. 111.
7. *Johnson L. A.* w: 1-st Int. Conf. Deep Freezing of Boar Semen. Uppsala 1986, s. 199.

8. *Leps H. J.*: Zur Kryokonservierung von Ebersperma. Einfluss verschiedener Konfektionierungsarten, insbesondere von Flachbehaltnissen auf Gefrier- und Auftauvorgange sowie Auftauqualität. Praca dokt., Hannover 1988.
9. *Pursel V. G., Park G. S.*: Theriogenology 5, 683, 1987.
10. *Pursel V. G., Johnson L. A.*: J. Anim. Sci. 40, 99, 1975.
11. *Strzeżek J., Głogowski J., Hopfer E., Wojtkiewicz K.*: Medycyna Wet. 42, 349, 1986.
12. *Westendorf P., Riczter L., Treu H.*: Dt. tierärztl. Wschr. 62, 261, 1975.

Adres autora: lek. wet. Wiesław Bielas, ul. Długa 44/2, 53-658 Wrocław

JAN KRZYŻANOWSKI, ZYGMUNT WRONA

Wpływ synchronizacji owulacji i reinseminacji na liczebność miotów u loszek i wieloródek

Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Summary

The influence of synchronization of ovulation and reinsemination on the number of litters in gilts and sows

The aim of the study was to investigate the influence of pharmacological synchronization of ovulation and reinsemination on the number of litters in gilts and sows. The investigations were done on 207 gilts and 206 sows. Ovulation was synchronized by the use of Receptal (2 ml/animal) or Chorulon (500 iu/animal). Reinsemination was performed 24 h after the first insemination.

It was found that reinsemination and ovulation synchronization significantly increased the number of piglets in litters of gilts and decreased the number of still born piglets. The procedure used did not significantly increase the number of piglets in litters of sows. However, it decreased the percentage of still born piglets.

Konkurencyjność w stosunku do innych działów produkcji zwierzęcej jak i zyski z prowadzenia chowu trzody chlewnej zależą w dużej mierze od produktywności stada zarodowego. Produktywność loch mierzona liczbą prosiąt przypadających na samicę rocznie jest funkcją wielkości miotu w chwili odsadzenia prosiąt oraz liczby miotów przypadających na lochę rocznie. Tak więc opłacalność tej gałęzi produkcji zwierzęcej zależy z jednej strony od liczebności miotów z drugiej zaś od liczby prosiąt odsadzonych (2). Zwiększona liczba prosiąt uzyskanych od maciory rocznie zmniejsza także wydatnie koszty utrzymania stada reprodukcyjnego. Amerykański producent trzody chlewnej aby mieć dochód musi odchować ponad 12 prosiąt od maciory rocznie. Każde odsadzone prosię ponad 12 sztuk od maciory w roku, stanowi zysk rzędu 40–60 dolarów.

Jedną z metod podnoszących produkcyjność macior jest zwiększenie liczebności prosiąt w miocie. Stąd też celem podjętych badań było określenie wpływu reinseminacji oraz synchronizacji owulacji środkami farmakologicznymi na liczebność miotów u loszek i macior wieloródek.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 207 loszkach (grupa I) i 206 maciorach wieloródkach (grupa II) w jednej z chlewni zarodowych położonych w środkowo-wschodnim rejonie Polski. Samice w każdej z grup podzielono na cztery podgrupy. Loszki podgrupy Ia (n=50 szt.) i maciory podgrupy IIa (n=41 szt.) stanowiły kontrolną grupę dla samic pozostałych podgrup. U macior tych wykonywano tylko pojedynczą inseminację. U loszek podgrupy Ib (n=50 szt.) i macior podgrupy IIb (n=50 szt.) wykonano zabieg inseminacji a po upływie 24 godzin reinseminacji. U samic podgrupy Ic (n=52 szt.) i IIc (n=55 szt.) wykonano zabieg inseminacji z równoczesnym podaniem gonadoliberyny (Receptal 2,0 ml na szt.), zaś loszkom podgrupy Id (n=54 szt.) i lochom podgrupy IId (n=60 szt.) po jednorazowym zabiegu inseminacji podano choriogonadotropinę (Chorulon w ilości 500 I. U. na szt.). Do inseminacji użyto nasienia standardowo rozrzedzonego w 1 i 2 dniu po pobraniu, od 3 knurów tej samej rasy.

Podczas porodów u macior objętych doświadczeniem rejestrowano liczbę urodzonych prosiąt. Część wyników badań poddano analizie statystycznej testem t–Studenta.

Wyniki i omówienie

Liczbę urodzonych prosiąt w miocie w zależności od liczby inseminacji w jednej rui i stosowanych preparatów do synchronizacji owulacji, przedstawiono w tab. 1. Analiza uzyskanych wyników badań wskazuje jednoznacznie, że zastosowanie reinseminacji i synchronizacji owulacji spowodowały statystycznie istotny wzrost liczebności miotów w grupie samic po raz

Tab. 1. Wielkość miotu w zależności od liczby zabiegów inseminacji i stosowanych środków do synchronizacji owulacji ($\bar{x} \pm s$)

Grupa	Grupa kontrolna	Reinseminacja	Receptal 2,0 ml/szt.	HCG 500 I.U./szt.
I	n =50	n = 51	n = 52	n = 54
Loszki	7,94±2,16	9,72±2,41*	9,42±0,52*	9,68±2,06*
II	n = 41	n = 50	n = 55	n = 60
Wieloródki	11,22±2,60	11,28±2,17	11,71±1,55	11,77±1,30

Objaśnienie: * – różnica istotna przy $p \geq 0,05$.