

Wpływ formy konfekcjonowania i metody mrożenia nasienia knura na wybrane wskaźniki użytkowości rozrodczej loch

WIESŁAW BIELAS, ANDRZEJ DUBIEL, ANNA RZAŚA,
JAN TWARDOŃ, WOJCIECH NIŻAŃSKI

Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką Zwierząt Gospodarskich Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,
pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Bielas W., Dubiel A., Rzaśa A., Twardoń J., Niżański W.

Effect of packaging form and methods of boar semen freezing on chosen reproductive indexes of sows

Summary

The aim of this work was to estimate the influence of packaging forms and freezing methods of the semen of boars on the reproductive performance of sows. Experiments were carried out with 50 sows in a large swine farm. The females in experimental groups were inseminated with FT whilst in the control groups with liquid semen. Ejaculates from 4 boars were frozen in a polystyrene box onto static LN nitrogen vapor in 5 ml maxi and 0.5 ml medium straws according to methods A and B, modifications of the Westendorf et al (1975) and of the Pursel and Park (1987) technique, respectively. The sows were divided into five research groups, ten pigs in each group. The sows in experimental groups 1, 2, 3, and 4 were inseminated with frozen semen whilst in control group 5 with liquid semen. The females in groups 1 and 2 were inseminated with the semen frozen using method A and confectioned in a 0.5 ml medium and in 5 ml maxi straws, respectively. Whilst the sows in the group 3 and 4 were inseminated with the semen frozen according to method B and packaged in 0.5 ml and 5 ml straws, respectively, in each group. One insemination dose consisted of either 5 billion spermatozoa placed into one 5 ml maxi straw or of ten 0.5 ml medium straws with 500 million spermatozoa. The sows were inseminated twice or three times every ten hours with frozen semen. The first insemination took place 24 h after the sow had first shown a standing reflex. Females inseminated with frozen semen were inseminated post cervically, three times every 10 h during each oestrus. One insemination dose comprises 5×10^9 of sperm and 5mg of PGF₂ α . The occurrence of ovulation was detected by ultrasonography. Efficiency of insemination and reproductive performance of sows have been evaluated on the basis of conception and farrowing rates and total piglets born in a litter. The conception rate, the farrowing rate and the total piglets born in a litter in all five groups (1, 2, 3, 4, 5) were: 100, 90, 100, 90, 100%; 80, 70, 90, 70, 100% and 10.62 ± 1.92 ; 9.42 ± 1.51 ; 10.77 ± 2.53 ; 9.71 ± 1.79 ; 12.0 ± 1.8 , respectively. A total of 40 females were inseminated with frozen (experimental) and 10 with liquid semen. There were no statistically significant differences in pregnancy and farrowing rates between all the experimental groups. Sows inseminated with liquid semen gave significantly higher percentages of litter size than females inseminated with frozen semen (12.00 vs. 10.19) (Table 1). Sows in groups 1 and 3 inseminated with semen frozen in 0.5 ml straws according to methods A and B had significantly higher litter sizes than sows in groups 2 and 4 inseminated with semen frozen in 5 ml straws according to corresponding methods A and B (10.62 and 10.77 vs. 9.42 and 9.71), respectively (Table 2). Animals inseminated with semen frozen in 0.5 ml straws had significantly higher percentages of litter size than females inseminated with semen frozen in 5 ml straws (10.7 vs. 9.57) (Table 3). There were no significant differences in litter size between females inseminated with semen frozen according to methods A and B (10.06 vs. 10.31) (Table 4). Acceptable reproductive performance of female pigs after AI with frozen semen was probably achieved because special attention was paid to the heat detection and timing of insemination related to ovulation (with the aid of rectal and abdominal ultrasonography), post-cervical insemination, addition of PGF₂ α to each insemination dose, improvement of the freezing-thawing methods and good freezability of the sperms' donors. Both freezing methods are relatively simple, but method B is less time consuming in preparation than method A. Fertility results obtained with frozen-thawed boar semen in our experiments are quite satisfactory. These results indicate that under good conditions (insemination strategy) frozen boar semen can give results that approach those obtained with fresh semen.

Keywords: reproductive performance, frozen semen, sow, boar, artificial insemination

Pomimo potencjalnych możliwości zastosowania kriokonserwacji nasienia knura w kierowanym rozrodcie trzody chlewnej, nadal nasienie mrożone wykorzystywane jest bardzo rzadko. Spośród najważniejszych przyczyn ograniczonego zastosowania nasienia mrożonego do inseminacji samic w warunkach fermowych zaliczyć należy niższą płodność i plenność inseminowanych loch, większą niż u innych gatunków podatność plemników na szok chłodowy, spowodowaną unikalną budową błony komórkowej. Plemniki ruchliwe po rozmrożeniu niejednokrotnie nie są w stanie doprowadzić do zapłodnienia dzięki destabilizacji błony komórkowej (3). Aby temu przeciwdziałać, podawano dwukrotnie wyższą liczbą gamet w inseminacji doszyjkowej, a plemniki zamrażano w różnych typach opakowań, ażeby zminimalizować niekorzystny wpływ zmian temperatury w czasie zamrażania i rozmrażania (11, 17, 22). Próby te nie przyniosły jednak spodziewanego efektu (18). Pewną nadzieję na przełamanie tego impasu może przynieść podawanie niższych dawek rozmrożonych plemników konfekcjonowanych w opakowaniach plastikowych oraz wprowadzanie nasienia jak najbliżej miejsca zapłodnienia (20). Niemniej ważne wydaje się ustalenie długości rui, ponieważ, jak wiadomo, owulacja występuje po upływie 2/3 rui, bez względu na długość trwania objawów. Krótki okres życia plemników rozmrożonych w drogach rodnych wymaga inseminacji do 8 godzin przed owulacją (18). Gwałtowny rozwój ultrasonografii pozwala obecnie w miarę precyzyjnie ustalić moment owulacji przy użyciu badania przezskórnego lub rektalnego lochy (6, 12). Interesujące są również informacje na temat pozytywnego wpływu PGF₂ alfa na właściwości plemników oraz użyteczność rozrodczą świń inseminowanych nasieniem konserwowanym w stanie płynnym (13, 16). Uważa się, że porozmrożeniowa ocena plemników powinna opierać się zazwyczaj na badaniach laboratoryjnych. Kosztowne i czasochłonne inseminacyjne doświadczenia fermowe mogą być obciążone wpływem zdrowia oraz środowiska, w jakim przebywają lochy po unasiennianiu (3, 11). Niemniej jednak wydaje się, że decydującym kryterium porozmrożeniowej oceny jakości kriokonserwowanego nasienia jest fakt zapłodnienia komórki jajowej, a następnie normalny rozwój zarodka i płodu. W ośrodku wrocławskim opracowano dwie nowatorskie metodyki mrożenia nasienia knura, a skuteczność i efektywność tych technologii potwierdzono na lochach w terenowych warunkach fermowych (4).

Celem badań było określenie wpływu metody mrożenia oraz formy konfekcjonowania plemników knura na użyteczność rozrodczą loch w warunkach fermowych z uwzględnieniem wskaźnika zapładnialności, wskaźnika oproszeń i ogólnej liczby prosiąt urodzonych w miocie.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 50 lochach wieloródkach mieszańcach F1 rasy wbp i pbz oraz 4 knurach różnych ras (wbp, pbz, pi × du, ha × pi) w wieku 2 do 5 lat w fermie trzody chlewnej w Żernikach Wielkich w okresie od 2007 do 2009 r. Zwierzęta przez okres badań odżywiano zgodnie z normami przewidzianymi dla tego gatunku. Do doświadczeń inseminacyjnych w danym tygodniu losowo wybierano 5 loch z puli około 30 samic, które wchodziły w cykl produkcyjny po odsadzeniu prosiąt. Dzięki temu nie dezorganizowano pracy na fer-

mie w sektorze rozrodu opartego na zasadzie „całe pomieszczenie zajęte – całe pomieszczenie wolne” (all in all out). Część inseminacyjna doświadczenia dobiegła końca, gdy liczba samic osiągnęła 50 sztuk. Lochy rozdzielano losowo po 10 samic do czterech grup doświadczalnych nr: 1, 2, 3, 4 i jednej grupy kontrolnej nr: 5. Lochy w grupie 1, 2, 3 i 4 inseminowano nasieniem mrożonym/rozrożonym, zaś w grupie kontrolnej nr 5 – nasieniem konserwowanym w stanie płynnym w rozrzedzalniku BTS. Nasienie od 4 knurów pobierano metodą manualną na fantomie jeden raz w tygodniu. Zakwalifikowany pełny ejakulat o objętości powyżej 200 ml, w którym co najmniej 80% plemników poruszało się ruchem prawidłowym, bezpośrednio po ocenie rozdzielano na dwie równe części. Każdą część ejakulatu zamrażano równolegle wg innej metody, pierwszą konserwowano wg metody A, zaś drugą wg metody B. Dokładny opis obydwu metod został uprzednio przez nas opisany (3, 5). Metoda A jest modyfikacją technologii Westendorfa i wsp. (22), zaś metoda B powstała w oparciu o oryginalną procedurę Pursela i Parka (17). Modyfikacja własna metodologii Westendorfa i wsp. (22) polegała na zastosowaniu rozrzedzalnika BTS (Beltsville Thawing Solution) (w miejsce rozrzedzalnika Mercka) do rozrzedzenia nasienia wkrótce po ocenie i pobraniu. W zmodyfikowanej do badań własnych metody Pursela i Parka (17) zwiększono współczynnik *g* w czasie odwirowywania plazmy nasienia z 300 do 800 *g*. Ekwiwalowane nasienie w obydwu metodach konfekcjonowano w słomkach plastikowych firmy Minitüb o objętości 5 i 0,5 ml, i zamrażano w statycznych parach ciekłego azotu –120°C w pojemnikach ze styropianu. Po zamrożeniu słomki składowano w kontenerach z ciekłym azotem. Słomki 5 ml rozmrażano w łaźni wodnej w temperaturze 42°C przez okres 40 s, zaś słomki 0,5 ml w temperaturze 60°C przez 8 sekund. Do inseminacji wykorzystywano słomki, w których co najmniej 30% plemników poruszało się ruchem postępowym. Przed inseminacją przygotowywano dawki inseminacyjne, rozrzedzając rozmrożone nasienie rozrzedzalnikiem BTS do objętości 40-50 ml. Schemat układu doświadczenia podano w tab. 1. Samice w grupie 1 i 2 unasienniano nasieniem mrożonym wg metody A, natomiast w grupie 3 i 4 mrożonym wg metody B. Lochy w grupie 1 i 3 inseminowano nasieniem konfekcjonowanym w słomkach 0,5 ml, zaś w grupie 2 i 4 konfekcjonowanym w słomkach o objętości 5 ml. Dawkę inseminacyjną dla loch w grupach doświadczalnych sporządzano albo z 1 słomki o objętości 5 ml o koncentracji 5×10^9 plemników, albo z 10 słomek o objętości 0,5 ml o koncentracji 5×10^9 plemników w słomce. Lochy w grupie kontrolnej inseminowano w sposób rutynowo stosowany na fermie nasieniem konserwowanym w stanie płynnym w rozrzedzalniku BTS, przy liczbie plemników w dawce inseminacyjnej od 3 do 4×10^9 . Tuż przed inseminacją do każdej porcji nasienia mrożonego dodawano 5 mg prostaglandyny PGF₂ alfa w formie 1 ml preparatu Dinolytic (Pharmacia Animal Health). Objętość dawki inseminacyjnej

Tab. 1. Układ doświadczenia

Metoda konserwacji nasienia	A		B		Konserwacja w stanie płynnym
	1	2	3	4	
Grupa doświadczalna	1	2	3	4	5
Objętość słomki w ml	0,5	5	0,5	5	Inseminacja nasieniem schłodzonym
Liczebność samic w grupach	10	10	10	10	10

Objaśnienia: A – zmodyfikowana technologia zamrażania nasienia knura Westendorfa i wsp. (22); B – zmodyfikowana technologia zamrażania nasienia knura Pursela i Parka (17)

dla loch inseminowanych nasieniem mrożonym wynosiła 50 ml, zaś dla loch inseminowanych nasieniem schłodzonym 100 ml. Samice inseminowane nasieniem mrożonym inseminowano w obecności knura (14) kateterem jednorazowym do inseminacji pozaszylkowej (IMV, Francja). Lochy unasienniano w naturalnej rui po odsadzeniu miotu po upływie co najmniej 24 godzin od początku wystąpienia odruchu tolerancji. Samice unasienniane nasieniem mrożonym reinseminowano dwukrotnie, co 10 godzin, zaś lochy w grupie kontrolnej po 24 godzinach od pierwszego zabiegu. Lochy w grupie kontrolnej inseminowano kateterem do inseminacji doszylkowej. Prosięta od loch odsadzano na fermie w czwartek, później samice umieszczano w pojedynczych okratowanych stanowiskach, jedno obok drugiego. W poniedziałek i wtorek przeprowadzano badania ultrasonograficzne jajników u loch wykazujących odruch tolerancji. Badania USG wykonywano ultrasonografem Animal Skaner Dрамиński Polska przy pomocy głowicy sektorowej abdominalnej o częstotliwości 5 MHz. U loch większych i spokojniejszych badania jajników prowadzono głowicą sektorową, rektalną, również o częstotliwości 5 MHz. Badanie jajników oraz pęcherzyków przedowulacyjnych wykonywano wg procedury opisanej przez Kaufolda i Althouse (12). Skuteczność unasienniania i użyteczność rozplodową loch oceniano na podstawie wskaźnika zapłodnialności, wskaźnika oproszeń i ogólnej liczby prosiąt urodzonych w miocie. Badania w kierunku ciąży wykonywano 28-35 dni od zabiegu inseminacji. 3 lochy inseminowane nasieniem mrożonym zostały wybrakowane po poronieniu pod koniec ciąży. Zebrany materiał liczbowy opracowano statystycznie za pomocą programu Statistica 6.0 metodą jednoczynnikowej analizy wariancji w układzie ortogonalnym. Istotność różnic między średnimi oszacowano testem Duncana. Badania zostały przeprowadzone po zaaprobowaniu procedur przez II Lokalną Komisję Etyczną we Wrocławiu.

Wyniki i omówienie

W tab. 2 podano wyniki analizy użyteczności rozrodczej loch inseminowanych nasieniem mrożonym i schłodzonym. W porównaniu z nasieniem mrożonym lochy inseminowane nasieniem schłodzonym uzyskiwały istotnie więcej prosiąt w miocie (o 1,81 prosięcia), odpowiednio: $10,19 \pm 2,00$ i $12,00 \pm 1,8$ prosięcia ($p \leq 0,05$). Lochy inseminowane nasieniem mrożonym rodziły o 1,2 dnia później niż samice inseminowane nasieniem schłodzonym, odpowiednio: $115,7 \pm 1,55$ w stosunku do $114,5 \pm 0,88$ dni ciąży, ($p \leq 0,05$).

Tab. 3 przedstawia użyteczność rozrodczą uzyskaną w 5 grupach loch. Istot-

ne różnice stwierdzono pomiędzy wartościami wskaźnika prosiąt żywo urodzonych. Najmniej prosiąt urodziło się w grupach 2A i 4B, gdzie lochy inseminowano nasieniem konfekcjonowanym w słomkach 5 ml metody A i B (9,42 i 9,71 prosięcia), istotnie więcej w grupach 1A i 3B, gdzie nasienie konfekcjonowano w słomkach 0,5 ml metody A i B (10,62 i 10,77 prosięcia), zaś najwięcej w grupie 5, gdzie lochy inseminowano nasieniem schłodzonym: $12,00 \pm 1,8$ prosięcia ($p \leq 0,05$).

W tab. 4 zamieszczono wyniki dotyczące wpływu opakowania, w którym zamrażano plemniki knura, na użyteczność rozrodczą loch. W porównaniu do słomek 5 ml konfekcjonowanie plemników w słomkach 0,5 ml podnosi wysoko istotnie (o 1,13 prosięcia) średnią wartość wskaźnika prosiąt żywo urodzonych, odpowiednio: z $9,57 \pm 1,6$ do $10,7 \pm 2,2$ prosięcia ($p \leq 0,01$).

Tab. 5 przedstawia wpływ metody kriokonserwacji na użyteczność rozrodczą loch inseminowanych nasieniem mrożonym. W porównaniu z technologią A kriokonserwacja plemników knura wg metody B podnosi istotnie (o 0,3 prosięcia) średnią wartość wskaźnika prosiąt żywo urodzonych, odpowiednio: z $10,06 \pm 1,79$ do $10,31 \pm 2,24$ prosięcia ($p \leq 0,05$).

Wielu autorów twierdzi, że porozmrożeniowa ocena plemników knura powinna opierać się przede wszystkim na badaniach laboratoryjnych *in vitro*, ponieważ kosztowne i czasochłonne doświadczenia inseminacyjne obciążone są dodatkowym, trudnym niekiedy do uchwycenia, wpływem zdrowia samic oraz środowiska, w jakim przebywają zwierzęta po unasiennianiu. Niestety, żadna z metod laboratoryjnej oceny jakości nasienia nie jest w stanie samodzielnie wyselekcjonować ani osobnika o dobrej zamrażalności nasienia, ani prognozować o jego płodności *in vivo* (1, 3, 8, 11). Dlatego wydaje się, że wskaźniki użyteczności rozrodczej – oproszeń oraz liczebności miotu – są miarodajnym kryterium oceny płodności oraz

Tab. 2. Wpływ inseminacji loch nasieniem mrożonym i schłodzonym na wybrane wskaźniki rozrodu świń ($\bar{x} \pm s$; n = 50)

Liczba loch	Wskaźnik zapłodnień (%)	Wskaźnik oproszeń (%)	Liczba prosiąt urodzonych (n)	Liczba prosiąt martwych (n)	Długość ciąży (dni)
Nasienie mrożone n = 40	95 ± 22	79 ± 40	10,19 ± 2,00 ^a	0,62 ± 0,82	115,7 ± 1,55 ^b
Nasienie płynne n = 10	90 ± 31	90 ± 31	12,00 ± 1,80 ^b	0,67 ± 0,87	114,55 ± 0,88 ^a

Objaśnienie: a, b – średnie wartości w kolumnie z różnymi indeksami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Tab. 3. Wpływ metody kriokonserwacji nasienia na wybrane wskaźniki użyteczności rozrodczej świń ($\bar{x} \pm s$; n = 50)

Grupa	Metoda	Rodzaj słomki	Wskaźnik zapłodnień (%)		Wskaźnik oproszeń (%)		Ogólna liczba prosiąt (n)	Prosięta martwo urodzone (n)	Długość ciąży (dni)
			n	%	n	%			
1 (n = 10)	A	0,5 ml	10	100	8	80	10,62 ± 1,92	0,78 ± 0,83	115,70 ± 1,66
2 (n = 10)	A	5 ml	9	90	7	70	9,42 ± 1,51 ^a	0,44 ± 0,73	115,33 ± 2,60
3 (n = 10)	B	0,5 ml	10	100	9	90	10,77 ± 2,53	0,60 ± 0,71	115,88 ± 1,26
4 (n = 10)	B	5 ml	9	90	7	70	9,71 ± 1,79 ^a	0,57 ± 1,13	115,71 ± 1,60
5 (n = 10)	Nasienie płynne		9	90	9	90	12,00 ± 1,8 ^b	0,67 ± 0,87	114,55 ± 1,05

Objaśnienia: a, b – jak w tab. 2; A, B – jak w tab. 1

Tab. 4. Wpływ formy konfekcjonowania mrożonego nasienia knura na wskaźniki rozrodu loch ($\bar{x} \pm s$; $n = 50$)

Opakowanie	Wskaźnik zapłodnień (%)	Wskaźnik oproszeń (%)	Ogólna liczba prosiąt w miocie (n)	Liczba prosiąt martwych (n)	Długość ciąży (dni)
Słomki 0,5 ml n = 20	100 ± 0,00	85 ± 36	10,70 ± 2,20	0,72 ± 0,75	115,82 ± 1,42 ^b
Słomki 5 ml n = 20	90 ± 30	73 ± 45	9,57 ± 1,60 ^A	0,57 ± 0,94	115,53 ± 1,76
Nasienie schłodzone n = 10	90 ± 31	90 ± 31	12,00 ± 1,80 ^B	0,67 ± 0,87	114,55 ± 0,88 ^a

Objaśnienia: a, b – jak w tab. 2; A, B – średnie wartości w kolumnie z różnymi indeksami różnią się istotnie przy $p \leq 0,01$

Tab. 5. Wpływ metody konserwacji nasienia knura na skuteczność i efektywność unasienniania loch nasieniem mrożonym i schłodzonym ($\bar{x} \pm s$; $n = 50$)

Metoda konserwacji nasienia	Wskaźnik zapłodnień (%)	Wskaźnik oproszeń (%)	Ogólna liczba prosiąt urodzonych	Liczba prosiąt martwych	Długość ciąży (dni)
Metoda A n = 20	95 ± 22	75 ± 44	10,06 ± 1,79 ^a	0,69 ± 0,79	115,57 ± 1,78
Metoda B n = 20	95 ± 22	84 ± 37	10,31 ± 2,24 ^a	0,63 ± 0,91	115,81 ± 1,37 ^b
Nasienie schłodzone n = 10	90 ± 31	90 ± 31	12,00 ± 1,80 ^b	0,67 ± 0,87	114,55 ± 0,88 ^a

Objaśnienia: a, b – jak w tab. 2; A, B – jak w tab. 1

plenności sów po inseminacji loch nasieniem mrożonym, ponieważ decydującym kryterium porozmrożeniowej oceny jakości kriokonserwowanego nasienia knura jest zapłodnienie komórki jajowej, a następnie normalny rozwój zarodka i płodu (11).

Porównanie średnich wartości wybranych wskaźników użyteczności rozrodczej loch inseminowanych nasieniem mrożonym i schłodzonym w niniejszych badaniach ujawniło istnienie różnic istotnych statystycznie odnośnie do wskaźnika liczby prosiąt urodzonych w miocie. W każdym z rozpatrywanych aspektów lochy inseminowane nasieniem schłodzonym rodziły więcej prosiąt, a pozostałe wskaźniki zwykle nie różniły się istotnie w porównaniu z lochami inseminowanymi nasieniem mrożonym. Wyniki użyteczności rozrodczej loch uzyskane w pilotażowych badaniach własnych nad wpływem inseminacji loch nasieniem mrożonym w aspekcie wskaźnika oproszeń oraz liczebności miotu wyniosły, odpowiednio: 66% i 7,2 (4). W niniejszym doświadczeniu wymienione wskaźniki osiągnęły wartość, odpowiednio: 79% i 10,19. Wyniki te potwierdzają hipotezę Almlida i Homo mówiącą, że można uzyskać więcej niż 10 prosiąt w miocie oraz wysoki wskaźnik oproszeń po inseminacji loch nasieniem mrożonym. Podobnie wysoką liczbę prosiąt w miocie (10,5) uzyskał Badura (2) w 1988 r. po inseminacji 112 loch nasieniem mrożonym w kulkach (2). Jednak początki nie były tak obiecujące, co wynika z badań Łyczyńskiego (15), w których na 30 loch inseminowanych nasieniem mrożonym w kulkach zaledwie 2 samice urodziły w sumie 16 prosiąt. Od tego czasu poczyniono ogromny postęp i wskaźnik loch zapłodnionych oraz wielkość miotu u loch inseminowanych nasieniem mrożonym w kulkach wynosił, odpowiednio: od 30,8 do 81,1% oraz od 5,2 do 10,6.

W słomkach zamrażanych w statycznych parach ciekłego azotu te same wskaźniki wahały się w granicach, odpowiednio: od 60 do 69,2% oraz od 8,4 do 9,0 (10, 18). Jedną z innowacji było wprowadzenie zamrażania nasienia metodą komputerową (10). Wzrost jakości nasienia po rozmrożeniu przekładał się na polepszenie wskaźników rozrodu trzody chlewnej. Jednak wzrost ten nie był przełomowy, ponieważ wskaźnik oproszeń i liczebność miotu wynosiły, odpowiednio: od 40 do 72,2% oraz od 6,4 do 10,7 (18, 23). Abstrahując od wyników niniejszych badań, niższy poziom płodności uzyskiwany dotychczas w doświadczeniach inseminacyjnych z nasieniem mrożonym w porównaniu z nasieniem schłodzonym mógł być spowodowany tradycyjnym deponowaniem nasienia do szyjki macicy. Stwierdzono, że w tym przypadku do miejsca zapłodnienia w jajowodzie dociera 10 razy mniej plemników, pomimo podwojenia koncentracji plemników w dawce nasienia mrożonego (18, 20). Dlatego wydawało się, że kolejną innowacją może być stosowanie inseminacji głębokiej nasienia mrożonego o koncentracji zwyczajowo

stosowanej w inseminacji nasieniem schłodzonym (20). W świetle wyników uzyskanych przez innych autorów rezultaty badań własnych nie odbiegają negatywnie od średniej światowej. Mogło to być między innymi spowodowane deponowaniem nasienia mrożonego katetrami do inseminacji pozasztykowej (20).

Uzyskanie wysokich wskaźników użyteczności rozrodczej loch inseminowanych nasieniem mrożonym uwarunkowane jest synchronizacją pomiędzy owulacją a inseminacją. Zróżnicowanie długości interwału od początku rui do momentu owulacji u loch w zależności od wpływu środowiska czy zmienności osobniczej doprowadziło do rozwoju ultrasonograficznej kontroli gonad, kontrolowania długości trwania odruchu tolerancji oraz wykonywania zabiegu inseminacji w obecności knura szukarka (6, 12, 14). Ponieważ w dużej fermie trudno dokładnie ustalić początek odruchu tolerancji, bezpośrednim impulsem do przeprowadzania inseminacji nasieniem mrożonym była niemożność ponownego znalezienia na jajnikach pęcherzyków jajnikowych, których średnica przekraczała 7 mm.

Badania Peny i wsp. (16) oraz Kosa i Bilkei (13) wykazały, że można istotnie podnieść wskaźnik oproszeń oraz liczebności miotu u loch po podaniu pod słówkę przedstonka pochwy 5 mg $PGF_2\alpha$ w czasie wykonywania zabiegu inseminacji. Mechanizm działania $PGF_2\alpha$ polega na usprawnieniu wędrówki plemników przez zmniejszenie czynności skurczowej mięśniówki narządu płciowego oraz przyspieszeniu owulacji. W niniejszych badaniach w celu zweryfikowania uzyskanych informacji do każdej dawki nasienia mrożonego bezpośrednio przed inseminacją dodawano 5 mg preparatu Dinolytic (prostaglandyny nie podawano przy inseminacji loch w grupie kontrolnej). Jak

już nadmieniono, użytkowość rozrodcza loch inseminowanych nasieniem mrożonym/rozrożonym w obecnym doświadczeniu nie odbiega od wyników prac przedstawionych przez innych autorów. Mogło to zostać spowodowane zarówno przez włączenie PGF₂ alfa do procedury inseminacji nasienia mrożonego, przez podawanie nasienia mrożonego specjalnym kateterem do wnętrza jamy macicy, jak również ultrasonograficzną oceną rozwoju pęcherzyków jajnikowych na gonadach loch.

Metoda A została opracowana na podstawie oryginalnej technologii Westendorfa i wsp. (22), zaś metoda B według techniki mrożenia nasienia knura opracowanej przez Pursela i Parka (17). Powyższe technologie różnią się sposobem inkubowania nasienia po pobraniu ejakulatu oraz temperaturą, w której oddziela się plemniki od plazmy nasienia przez wirowanie. W niniejszym doświadczeniu zauważalnie wyższa, choć nie potwierdzona statystycznie, liczba prosiąt urodzonych przez lochy inseminowane nasieniem mrożonym według metody B (o 0,25) koresponduje z wynikami wcześniejszych badań własnych, w których stwierdzono wyższą jakość plemników zamrażanych wg metody B w porównaniu z metodą A w aspekcie odsetka plemników o ruchu prawidłowym i z nieuszkodzonym akrosomem (3, 5).

W trakcie rozwoju technologii kriokonserwacji nasienia knura skoncentrowaną zawiesinę plemników zamrażano w formie kulek na suchym lodzie lub w opakowaniach plastikowych i tubach aluminiowych w parach ciekłego azotu. Obecnie mrożone nasienie knura konfekcjonuje się w dużych tubach plastikowych o objętości 5 ml, minitubach o objętości 0,5-1 ml, torebkach plastikowych o objętości 6-12 ml, tubach płaskich o objętości 1,7-2 ml lub w tubach aluminiowych (3, 7-9, 17, 19, 22). Z przyczyn praktycznych preferuje się opakowania o większej objętości, które zawierają od 2 do 5 × 10⁹ plemników. Nasienie knura w opakowaniach o dużym przekroju narażone jest na niekorzystne warunki kriobiologiczne w czasie kriokonserwacji w porównaniu do nasienia konfekcjonowanego w pojemnikach płaskich i o mniejszej objętości. Plemniki zamrażane w statycznych parach ciekłego azotu w słódkach o dużym przekroju podlegają niekorzystnemu procesowi przechłodzenia (supercooling), a następnie przedłużonemu okresowi krystalizacji (freezing point plateau) (7). Ponadto w czasie rozmrażania dużej słódky plemniki leżące w środku rozmrażają się prawie 4 razy wolniej niż komórki leżące peryferyjnie. Suboptymalne tempo zamrażania i rozmrażania plemników leżących w środku dużej słódky związane jest z niekorzystnym stosunkiem powierzchni do objętości tego opakowania (duża objętość, a mała powierzchnia) (22). Istotnie wyższą jakość nasienia po rozmrożeniu osiąga się, gdy nasienie konfekcjonowane jest w opakowaniach o przekroju płaskim lub/i okrągłym, o mniejszej objętości. Spowodowane jest to stosunkiem dużej powierzchni do małej objętości opakowania, co sprzyja szybkiej wymianie ciepła pomiędzy zawartością opakowania a otoczeniem. Proces zamrażania i rozmrażania jest dzięki temu bardziej jednorodny w centrum i na obwodzie opakowania, co manifestuje się wysoką jakością nasienia po rozmrożeniu próbek (7, 8, 17, 21, 22). Zapewne wobec powyższego lochy inseminowane nasieniem konfekcjonowanym w słódkach 5 ml rodziły istotnie mniej prosiąt

niż lochy inseminowane słódkami o objętości 0,5 ml mrożonym wg metody A (o 1,2) i B (o 1,06). W zestawieniu biorącym pod uwagę wyłącznie typy słódek (5 i 0,5 ml) różnica była już wysoko istotna i wynosiła 1,13 prosiąt więcej urodzonych po inseminacji loch nasieniem konfekcjonowanym w słódkach 0,5 ml.

Na podstawie uzyskanych wyników badań nad porównawczą oceną jakości wybranych wskaźników użytkowości rozrodczej loch inseminowanych nasieniem wg metody A i metody B w słódkach 0,5 i 5 ml można stwierdzić, iż metody te oraz opakowania spełniają kryteria przeprowadzonych analiz i mogą być wykorzystywane do inseminacji loch w warunkach fermowych.

Piśmiennictwo

1. Almlid T., Homo P. O.: A brief review of frozen semen application under Norwegian AI service conditions. Repr. Dom. Anim. 1996, 31, 169-173.
2. Badura J.: Zamrażanie nasienia knurów przy użyciu różnych metod. Roczn. Nauk. Zoot. 1988, 15, 25-34.
3. Bielas W.: Wpływ różnych metod konserwacji nasienia knura w niskich temperaturach na wybrane właściwości plemników. Praca doktorska, Wrocław 1999.
4. Bielas W., Dubiel A.: Wpływ inseminacji nasieniem mrożonym na płodność loch, [w:] Malinowski E., Klossowska A., Twardoń J. (red.): Zaburzenia w rozrodczości zwierząt wysokoprodukcyjnych. PIWet, Puławy 2003, 17-20.
5. Bielas W., Dubiel A., Niżański W.: Wpływ metod konserwacji oraz form konfekcjonowania na jakość plemników knura po rozmrożeniu. Medycyna Wet. 2003, 59, 172-175.
6. Bolarin A., Roca J., Rodriguez-Martinez H., Hernandez M.: Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. Theriogenology 2006, 65, 669-680.
7. Bwanga C. O., Hofno P. O., Grevle I. S., Einarsson S., Rodriguez-Martinez H.: In vivo fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in plastic bags and maxi-straws. J. Vet. Med. A 1991, 38, 281-286.
8. Ericsson B. M., Petersson H., Rodriguez-Martinez H.: Field fertility with exported boar semen frozen in the new PlatPack container. Theriogenology 2002, 1065-1079.
9. Fraser L., Strzeżek J.: Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. Anim. Reprod. Sci. 2007, 99, 317-329.
10. Hammit D. G., Martin P. A.: Fertility of frozen-thawed porcine semen following controlled-rate freezing in straws. Theriogenology 1989, 32, 359-367.
11. Johnson L. A., Aalbers J. G., Willems C. M. T., Sybesma W.: Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. J. Anim. Sci. 1981, 52, 1130-1136.
12. Kaufold J., Althouse G. C.: An update on the use of B-mode ultrasonography in female pig reproduction. Theriogenology 2007, 67, 901-911.
13. Kos M., Bilkei G.: Prostaglandin F_{2α} supplemented semen improves reproductive performance in artificially inseminated sows. Anim. Reprod. Sci. 2004, 80, 113-120.
14. Langendijk P., Soede N. M., Kemp B.: Uterine activity, sperm transport, and the role of boar stimuli around insemination in sows. Theriogenology 2005, 63, 500-513.
15. Łyczynski A.: Zdolność zapładniająca mrożonego nasienia knurów. Medycyna Wet. 1977, 33, 296-298.
16. Pena F., Dominguez J. C., Alegre B., Pelaez J.: Effect of vulvomucosal of PGF_{2α} at insemination on subsequent fertility and litter size in pigs field conditions. Anim. Reprod. Sci. 1998, 52, 63-69.
17. Pursel V. G., Park C. S.: Duration of thawing on post acrosome morphology and motility of boar spermatozoa frozen in 5 ml maxi-straws. Theriogenology 1987, 28, 683-690.
18. Roca J., Vázquez J. M., Gil M. A., Cuello C., Parilla I., Martinez E. A.: Challenges in Pig Artificial Insemination. Reprod. Dom. Anim. 2006, 41 (Suppl. 2), 43-53.
19. Strzeżek J., Glogowski J., Hopfer E., Wojtkiewicz K.: Kortowska metoda zamrażania nasienia knura. Medycyna Wet. 1986, 41, 349-353.
20. Watson P. F., Behan J. R.: Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. Theriogenology 2002, 57, 1683-1693.
21. Weitz K. F., Rath D., Baron.: Neue Aspekte der Tiefgefrierkonservierung von Ebersperma in Plastikrohren. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 1987, 94, 485-488.
22. Westendorf P., Richter L., Treu H.: Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger Pailletten-Verfahren. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 1975, 82, 261-300.
23. Woelders H., Matthijias C. A., Zuidberg C. A., Chaveiro A. E. N.: Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. Theriogenology 2005, 63, 383-395.

Adres autora: dr Wiesław Bielas, pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław;
e-mail: wieslaw.bielas@up.wroc.pl