

## SZTUCZNE UNASIENIANIE KONI. IV. WSTĘPNE WYNIKI UNASIENIANIA KLACZY NASIENIEM MROŻONYM

*Jan Baczyński, Władysław Bielański, Kazimierz Bilik, Stefan Draus,  
Zbigniew Zapletal*

Katedra Rozrodu i Higieny Zwierząt WSR w Krakowie  
Kierownik: prof. dr Władysław Bielański  
Państwowy Zakład Unasieniania Zwierząt, Zagórzycy koło Brzeska  
Dyrektor: mgr Jan Bąk

Próby mrożenia nasienia ogierów rozpoczęto w r. 1967. Materiałem doświadczalnym były ogiery RZD Przegorzały koło Krakowa oraz Stacji Unasieniania Klaczy PZUZ Zagórzycy. W pierwszym okresie doświadczenia poświęcono całą uwagę samej technice zamrażania, mianowicie starano się dobrać metodę, która dawałaby dobre wyniki i jednocześnie była możliwa w stosowaniu w szerokiej praktyce terenowej. Po opracowaniu metody [2], przystąpiono do zabiegów unasieniania klaczy.

Pierwsze zabiegi unasieniania klaczy nasieniem konserwowanym w ciekłym azocie przeprowadzono w 1968 r. przez zespół pracowników Katedry Rozrodu i Higieny Zwierząt (K. Bilik, Z. Zapletal). W zabiegach tych stosowano nasienie mrożone sposobem Nagase i współ. [5]. Sposób ten polegał na mrożeniu nasienia w kulkach na tafli suchego lodu ( $-79^{\circ}\text{C}$ ) i magazynowaniu w kontenerze z ciekłym azotem ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Bezpośrednio przed zabiegiem, 30-40 kulek rozmrażano w odtłuszczonym mleku o temperaturze  $38^{\circ}\text{C}$ . Sam zabieg poprzedzano sprawdzeniem żywotności plemników (oceniając nasienie makroskopowe na podgrzanymszkiełku Bloma).

Nasieniem zamrożonym według powyższej metody unasieniono 2 klacze jałowe, z których jedna, należąca do WSR w Krakowie, zażrebiła się. Poza tym nasieniem mrożonym zostały unasienione przez pracowników SK Stubno 2 klacze Stadniny Koni Stubno, które mimo kilkakrotnego pokrycia w sezonie 1968, nie zostały zażrebite. Klacze te po unasienieniu nasieniem mrożonym również nie zażrebiły się.

Pozytywny wynik unasieniania nasieniem mrożonym uzyskano w następujących warunkach: klacz Lara, urodzona w 1962 r. szarogniada b.o., własność WSR Kraków, RZD Zwierzyniec (gospodarstwo Bielany), zakupiona w Dębnie (pow. Brzesko), bez udowodnionego pochodzenia, w ty-

pie półkrwi angielskiej, zaczęła wykazywać objawy rui ok. 10 V 1968 r., przy czym kontrola jajników wykazała dopiero w dniu 25 maja w pełni rozwinięty pęcherzyk Graafa ( $F_4$ ). W dniu tym klacz była unasieniona po raz pierwszy nasieniem ogiera Iskar (tab. 1), z dnia 22 IV 1968 r., a następnie w dniu 27 maja nasieniem z dnia 4 IV 1968 r. W dniu 28 maja stwierdzono zmiany poowulacyjne w jajniku. Badania na żrebność klaczy Lara przeprowadzone po 3 tygodniach, 4 miesiącach i 6 miesiącach po unasienieniu, wykazywały stały rozwój płodu i normalnie przebiegającą ciążę. W dniu 5 V 1969 r., klacz Lara urodziła źrebię płci żeńskiej, maści gniadej z małymi odmianami. Rozwój źrebięcia przebiegał normalnie. Badania grupy krwi ogiera Iskar, klaczy Lara oraz źrebięcia nazwanego Mrozonka potwierdziły pochodzenie po ogierze Iskar.

Tabela 1

Właściwości nasienia ogiera Iskar użytego do unasienienia klaczy Lara

Data pobrania	Ocena nasienia świeżego		Sposób zamrażania	Ruchliwość po zamrożeniu (w %)	Dawka nasienia rozcieńczana mlekiem (ml)
	ruchliwość	koncentracja (w 1 mm <sup>3</sup> )			
22 IV 1968	3/80	100 000	w kulkach, rozcieńczalnik wg recepty japońskiej z rafin.	55	30
4 IV 1968	3/80	50 000	w kulkach, rozcieńczalnik wg recepty japońskiej z sachar.	55-60	30

Pod koniec 1968 i w 1969 r. rozpoczęto prace dotyczące zamrażania nasienia w ampułkach, w atmosferze par ciekłego azotu. Badania laboratoryjne przeprowadzono z nasieniem ogierów doświadczalnych WSR, RZD Przegorzały koło Krakowa oraz nasieniem ogierów Stacji Unasieniania klaczy Zagórzycy koło Brzeska. W ciągu tego okres zamrożono od 8 ogierów ok. 270 ejakulatów. Ruchliwość nasienia po rozmrożeniu wynosiła przeciętnie 45% (30-70%). Przygotowanie nasienia do inseminacji sprowadzało się do rozmrożenia porcji zawartej w jednej próbce w łaźni wodnej o temperaturze 40°C i rozpuszczeniu jej w 20 ml odtłuszczonego mleka (płynnego lub sproszkowanego).

W r. 1969 rozpoczęto zamrażać nasienie w PZUZ Zagórzycy, stosując metodę wypróbowaną poprzednio w próbach laboratoryjnych. Do prób zamrażania i unasieniania wzięto nasienie 4 ogierów. Czas konserwacji nasienia przed unasienieniem wynosił od kilku dni do 3 miesięcy.

W Stacji Unasieniania Klaczy PZUZ Zagórzycy na miejscu unasieniono 24 klacze oraz 20 klaczy na zorganizowanych punktach w terenie,

do których codziennie dojeżdżano (Borzęcin Jurków pow. Brzesko — 7 klaczy i Wienclawice pow. Kraków — 13 klaczy). Do punktów dojazdowych doprowadzono ogółem 90 klaczy, z których unasieniono tylko 20. Pozostałe eliminowano, gdyż nie wykazywały rozwoju pęcherzyka Graafa — mimo zewnętrznych objawów rui. Wśród 90 doprowadzonych klaczy było 64<sup>0</sup>/<sub>0</sub> jałowiejących, 24<sup>0</sup>/<sub>0</sub> po oźrebieniu 8<sup>0</sup>/<sub>0</sub> pierwiastek i 3,2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> po poronieniu. Wszystkie unasienione klacze zostały poddane klinicznemu badaniu w kierunku ciąży między 20-40 dniem po ostatnim unasienieniu. Z 44 unasienionych klaczy u 23 stwierdzono charakterystyczne zmiany ciążowe macicy (co stanowi 52,2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> źrebności — tabela 2) i określono je jako źrebne.

Ponowne badanie przeprowadzono po upływie 6-8 miesięcy i stwierdzono utrzymującą się ciążę tylko u 12 klaczy (co stanowi 27,2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> źrebności). Wyniki unasieniania klaczy nasieniem poszczególnych ogierów (tab. 3) wahają się od 66,6 do 20,0<sup>0</sup>/<sub>0</sub> przy pierwszym badaniu na ciążę oraz 0-33,3<sup>0</sup>/<sub>0</sub> przy drugim badaniu, po 6 miesiącach. Przerwanie ciąży wskutek ronienia lub prawdopodobnie obumierań zarodków wystąpiło u 11 klaczy, czyli u 47,8<sup>0</sup>/<sub>0</sub> w stosunku do klaczy zażrebionych (tab. 2).

#### DYSKUSJA

Próby unasieniania klaczy nasieniem mrożonym, podejmowane były od początku lat pięćdziesiątych, jednakże pozytywne wyniki zażrebień klaczy były sporadyczne [1, 4]. Dalsze próby unasieniania klaczy nasieniem mrożonym rozpoczęto od r. 1964, po opracowaniu metody mrożenia nasienia ogierów przez Nagase i wsp. [5]. W r. 1964 unasieniono w Japonii [6] 2 klacze, uzyskując w dwu wypadkach pozytywny rezultat, w r. 1965 unasieniono 42 klacze, z czego 14 zażrebiło się, co stanowi 33,3<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. W unasienianiu klaczy nasieniem poszczególnych ogierów stwierdzono wahania w źrebności w granicach 12,5-42,0<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. Próby unasieniania nasieniem mrożonym podejmowano w NRF, ZSRR, a szczególnie intensywnie w USA, skąd w r. 1968 podano wiadomość o unasienieniu ok. 2000 klaczy, z których 70<sup>0</sup>/<sub>0</sub> nie wykazywało powtórnej rui po unasienieniu [3]. Wyniki uzyskane nasieniem mrożonym w naszym doświadczeniu (52,2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> i 27,2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> źrebnych) są niższe, niż uzyskane nasieniem tych samych ogierów w stanie płynnym, a wynoszące przy 71 unasienionych klaczach 57,5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (przy jednorazowym badaniu 66 klaczy). Równocześnie trzeba stwierdzić, że możliwości dysponowania nasieniem mrożonym, niezależnie od czasu pobrania i odległości do unasienianych klaczy, stanowi tak duże możliwości dysponowania wybranymi ogierami, że ze względów hodowlanych każdy wysiłek w kierunku usprawnienia tej metody będzie mieć poważne znaczenie.

Tabela 2

## Wyniki unasienniania klaczy w poszczególnych grupach

Grupa klaczy	Liczba klaczy unasiennionych	Żrebne (kontrola kliniczna)				Poronienia lub zamieranie zarodków		Ilość zabiegów unasienniania przypadających na 1 klacz	
		do 6 tygodni		po 6 miesięcy		liczba	%	żrebnym do 6 tygodni	żrebnym po 6 miesięcy
		liczba klaczy	% żrebnosci	liczba klaczy	% żrebnosci				
I po oźrebieniu	11	7	63,3	4	36,3	3	42,8	1,7	2,0
II po poronieniu	3	1	33,3	1	33,3	0	0,0	2,0	2,0
III pierwiastki	6	2	33,3	0	0,0	2	100,0	1,5	0,0
IV jałowe (1-7 lat)	24	13	54,2	7	25,4	6	46,1	2,6	2,57
Razem	44	23	52,2	12	27,2	11	47,8	1,95	2,19

Tabela 3

## Wyniki unasienniania klaczy nasieniem różnych ogierów

Nazwa ogiera	Liczba klaczy unasiennionych	Żrebne (kontrola kliniczna)				Poronienia lub zamieranie zarodków		Ilość zabiegów unasienniania przypadających na 1 klacz	
		do 6 tygodni		po 6 miesięcy		liczba	%	żrebnym do 6 tygodni	żrebnym po 6 miesięcy
		liczba klaczy	% żrebnosci	liczba klaczy	% żrebnosci				
Ing x0	10	5	50,0	3	30,0	2	40,0	3,0	4,0
Iskar x0	18	12	66,6	6	33,3	6	50,0	2,2	1,6
Prąd	11	5	45,3	3	27,2	2	40,0	1,6	2,0
Ural Hucul	5	1	20,0	0	0,0	1	100,0	1,0	0,0
Razem	44	23	52,2	12	27,2	11	47,8	1,95	2,53

## WNIOSKI

1. Zastosowana metoda konserwacji nasienia ogierów w płynnym azocie pozwala na uzyskanie ciąży u ok. 30% klaczy.
2. Płodność nasienia poszczególnych ogierów wykazuje znaczną zmienność, od 0 do 33%.
3. Istnieje uzasadnione podejrzenie, że 47,8% ciąży rozpoznawanych po ok. 6 tygodniach od unasieniania nasieniem mrożonym jest przerywana wskutek ronień lub wczesnego zamierania zarodków.
4. Uzyskane wyniki należy traktować jako wstępne do dalszych badań nad zagadnieniem metod zamrażania i posługiwania się tym nasieniem.

## PIŚMIENNICTWO

1. Barker A. I., Gaudier J. V. C.: Pregnancy in mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. Can. J. Comp. Med. 21, 47-52, 1957.
2. Bielański W., Bilik K., Zapletal Z.: Sztuczne unasienianie koni. II. Wstępne próby konserwacji nasienia ogierów w płynnym azocie w  $-196^{\circ}\text{C}$ . Med. wet. 25, 5, 1969.
3. Knoop C. E.: Freezing equine semen for use in A.I. A.I. Digest 16 (11), 8, 1968.
4. Skatkin cyt. wg Bielański W.: Rozród zwierząt gospodarskich. PWRiL, Warszawa 1962.
5. Nagase H., Soejima S., Niwa T., Oshida H., Sagara Y., Ishiraki N., Hishi S.: Studies on the freezing storage of stallion semen. Fertility results of semen in concentrated pellet form. Jap. J. Anim. Prod. 12, 48, 1968.
6. Nishikawa Y., Waide Y., Shinomlaya S.: Studies on deep freezing of horse spermatozoa. VI<sup>e</sup> Congr. Int. Repr. Anim. Paris 2, 1539, 1968.

*Я. Бачиньски, В. Белянски, К. Билик, С. Дваус, З. Заплеталь*

## ИСКУССТВЕННОЕ ОСЕМЕНЕНИЕ ЛОШАДЕЙ.

IV. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОСЕМЕНЕНИЯ ЛОШАДЕЙ  
ЗАМОРОЖЕННЫМ СЕМЕНЕМ

## Резюме

Поведено пробное осеменение кобыл семенем консервированным в жидком азоте, которое затем сравнивали с результатами осеменения в жидком состоянии. Семенем консервированным в шариках были осеменены 4 кобылы, которые становились уже бесплодными; одна из них ожеребилась. Семенем консервированным в ампулах осеменили 44 кобылы, которые обследовались клинически два раза, чтобы установить, сколько кобыл оплодотворилось. Первое обследование проводили между 20-40-ым днём по последнем осеменении; у 23 кобыл установлены характерные для беременности изменения (что составляет 52,2% жеребности — печень 2). Второе исследование проводили через 6-8 месяцев, причем удерживающаяся беременность была установлена только у 12 кобыл (27,2% жеребности). Аборты или умирание зародышей обнаружены у 11 кобыл, т.е. у 47,8% по отношению к зажеребённым кобылам (перечень 2).

Результаты осеменения кобыл семенем отдельных жеребцов колебались от 20,0% до 66,6% при первом обследовании на беременность, а также от 0 до 33,3% при втором обследовании. Результаты полученные с семенем тех самых жеребцов в жидком состоянии, составляли 57,5% из 77 осеменных кобыл (при однократном обследовании 66 кобыл).

*J. Baczyński, W. Bielański, A. Bilik, S. Draus, Z. Zapletal*

#### ARTIFICIAL INSEMINATION IN HORSE. IV. PRELIMINARY RESULTS OF MARE INSEMINATION WITH FROZEN SEMEN

##### Summary

Artificial insemination of mares was performed with semen preserved in liquid nitrogen and then the results were compared with those of insemination with liquid semen. Semen preserved in concentrated pellet form was used to inseminate 4 mares suspected to be infertile, of which one foaled. With semen stored in ampoules 44 mares were inseminated, and then subjected twice to clinical examination for pregnancy. The first examination was carried out between the 20th and 40th day following the last insemination, at which 23 mares (52.5%) were found with characteristic pregnancy symptoms (Table 2). The second examination conducted after 6-8 months revealed pregnancy continuing in 12 mares only (27.2% of the total). Stoppage of pregnancy due to abortions or presumably as a result of the resorption of embryos was recorded in 11 mares (47.8% of pregnant mares — Table 2).

The results of the insemination of mares with frozen semen of particular stallions fall between 20.0-66.6% at the first examination for pregnancy and 0-33.3% at the second one. The results obtained with the liquid semen from the same stallions amounted to 57.5% in 71 inseminated mares (with 66 mares after a singly examination).