

PRZEGLĄD PRAC NAUKOWYCH Z ZAKRESU BIOLOGII I KONSERWACJI NASIENIA

przedstawionych na IV Międzynarodowym Kongresie Rozmnażania Zwierząt w Hadze oraz na konferencji przedstawicieli państw Rady Wzajemnej Pomocy Gospodarczej w Karlovych Varach

LECH JAŚKOWSKI

Zakład Inseminacji i Zwalczania Bezpłodności Instytutu Weterynarii w Bydgoszczy

Kierownik: prof. dr L. Jaśkowski

Prace naukowe przedstawiane na międzynarodowych kongresach rzadko odzwierciedlają całość osiągnięć w określonej dyscyplinie wiedzy, pozwalają jednak przeważnie zorientować się w kierunkach zainteresowań badawczych w poszczególnych krajach. Na ogólną liczbę 200 doniesień wygłoszonych na obydwóch zjazdach przeszło 40 dotyczyło biologii i konserwacji nasienia. Większość tych doniesień miała aspekt wybitnie praktyczny, a mianowicie dotyczyła przedłużenia witalności i zdolności zapładniającej nasienia *in vitro*.

Trzy kierunki badań były najsilniej reprezentowane: 1) badania nad biochemią nasienia i wiążące się z tym badania nad oceną płodności samców, 2) badania nad znaczeniem drobnoustrojów w nasieniu, 3) badania nad przechowywaniem nasienia. Ostatniemu z kierunków poświęcono najwięcej miejsca.

Prace poświęcone biochemii nasienia otworzył bardzo interesujący referat T. M a n n a (Haga) nad biochemią plemników. Był to referat przeglądowy stanowiący próbę syntezy ostatnich osiągnięć z wymienionego zakresu. T. M a n n, autor znanej monografii — Biochemia nasienia — był najbardziej przygotowany do przeprowadzenia takiej syntezy, bowiem większość prac z zakresu biochemii gonad i układu rozrodczego zwierząt domowych wyszła z jego szkoły. Praktyczne uzupełnienie referatu Manna stanowił referat wygłoszony przez v a n d e r S l u i s a (Haga), poświęcony wynikom obszernych, przeprowadzonych w Holandii, badań narządów rozrodczych buhajów.

DONIESIENIA DOTYCZĄCE BIOCHEMII I OCENY NASIENIA

Do bardziej interesujących prac biochemicznych przedstawionych w Hadze należą doniesienia White, Wallace, Wales i Scott o biologicznym znaczeniu gliceryl-fosforyl-choliny w nasieniu. Dawson, Mann i White (1957) wykazali w nasieniu tryka, buhaja, knura, capa i ogiera obecność znacznych ilości wymienionej substancji. Jednakże znaczenie jej w nasieniu nie było dostatecznie jasne. W przeciwieństwie do innych składników odkrywanych w ostatnich latach w nasieniu (np. sorbitol, inositol) nie ulegał on rozszczepianiu przez enzymy nasienne, nie mógł więc dla nich stanowić źródła energii egzogennej, mimo tego że takie jego składniki jak fosfoglicerol, cholina mogły być przez plemniki metabolizowane. Badania White'a i współpracowników wykazały, że enzymy układu rozrodczego samicy dokonują tego, do czego nie są zdolne plemniki. Uwolniony enzymatycznie z gliceryl-fosforyl-choliny fosfoglicerol może być dalej rozszczepiany przez plemniki. Można sobie więc wyobrazić, że glicerol-fosforyl-cholina stanowi ich materiał energetyczny zablokowany aż do czasu wprowadzenia nasienia do dróg rodnych samicy.

W ostatnich latach odkrycie pani Leuchtenberger (1955) wyjaśniło przyczynę pewnych przypadków niepłodności mężczyzn. Przypadków tych nie udawało się wykrywać za pomocą metod konwencjonalnych. Według wymienionej autorki — niepłodność wiązała się z obniżeniem zawartości kwasu dezoksyrybonukleinowego w plemnikach, w związku z czym skierowano uwagę na zawartość tego kwasu również w plemnikach zwierząt gospodarskich. Prace te nie wykazały na ogół wyraźnego związku między płodnością samców a zawartością wymienionego kwasu w plemnikach. Chociaż Welch, Hanly i Guest na podstawie zbadanych wielu próbek nasienia 275 buhajów rasy Santa Gertruda stwierdzili pewną współzależność między zawartością DNA (kw. dezoksyrybonukleinowy) w plemnikach a jakością nasienia, mianowicie nasienie gorszej jakości było uboższe w DNA. Z dotychczasowych badań nad zawartością DNA w nasieniu buhaja zdaje się wynikać, że anomalia plemników typu opisanego przez Leuchtenberger zdarzają się u buhajów niesłychanie rzadko.

Do bardzo interesujących doniesień należy zaliczyć pracę Salisbury'ego i Flerchinger'a (Haga), omówioną szerzej przez Hoppego, o przechodzeniu DNA z plemników do środowiska w czasie ich konserwowania.

Josifow (Karlove Vary) określił aktywność oksydazy kwasu bursztynowego w nasieniu zwierząt domowych stwierdzając najwyższą aktywność tego enzymu w nasieniu tryka, a następnie kolejno w nasieniu buhaja, knura i ogiera. Chury (Karlove Vary) stwierdził w nasieniu

knura obecność peptydu zbliżonego budową do gonadotropin przysadkowych. Zdaniem autora ciało to stanowi bądź substrat stanowiący materiał do produkcji FSH¹, bądź też czynnik pobudzający przysadkę do tej produkcji. Substancja ta jest odpowiedzialna za znane zjawisko pobudzania układu rozrodczego samicy wchłanianiem nasienia.

K a r g i G a s s n e r (Haga) przeprowadzili badania nad wpływem eksploatacji płciowej na poziom kwasu askorbinowego w nasieniu knura. Jak wynika z ich badań, częste pobieranie nasienia nie powoduje wyraźnego obniżenia zawartości kwasu askorbinowego.

Z zakresu diagnostyki niepłodności buhajów na uwagę zasługuje praca S z u m o w s k i e g o (Haga). Autor ten wspólnie ze S t ö b e r e m jeszcze w 1955 r. stwierdził, że w nasieniu ogierów o obniżonej płodności wzrasta zawartość frakcji albuminowej osocza nasienia. W doniesieniu zjazdowym podkreślił, że podobne zjawisko można stwierdzić również u buhajów. Przy elektroforezie osocza nasienia buhaja — przeciętna zawartość albumin waha się w około 2,5% ogółu białek osocza. U buhajów niepłodnych zawartość albumin wzrasta do 12 i więcej procent. Na uwagę zasługuje, że niejednokrotnie buhaje niepłodne wykazujące zmianę zawartości albumin nie wykazują innych zmian jakościowych nasienia. Proteinografia osocza, obok badania zawartości DNA, może więc stanowić cenną metodę pomocniczą przy ustalaniu przyczyn niepłodności, trudnych do stwierdzenia metodami konwencjonalnymi.

B a n e (Haga) przedstawił wyniki badań elektromikroskopowych nad anomalią plemników knura określoną jako uszkodzenie akrosomu. Anomalia ta opisana po raz pierwszy przez T e u n i s s e n a (1946) u buhaja, a przez H a n c o c k a (1949) uznana za defekt dziedziczny została opisana u knura po raz pierwszy w 1958 r. przez L i e s s a. Również u knura ma ona tło dziedziczne (W o l f a r t h, 1961). Z badań B a n e'g o wynika, że w plemnikach zniekształconych można wyróżnić dwa typy tej anomalii. Typ A polega na wydłużeniu i zawinięciu do tyłu akrosomu, typ B — na maczugowatym zgrubieniu przedniego bieguna główki i na nienormalnej strukturze akrosomu. Oba zniekształcenia w preparatach barwionych, pod zwykłym mikroskopem, przedstawiają się w postaci ciemnej plamy wydającej się na przednim biegunie główki.

W ostatnich latach przedmiotem dyskusji stała się sprawa diagnostycznego znaczenia występowania tzw. elementów wielojądrzastych w tkance plemnikotwórczej i w nasieniu. Niektórzy uważali to zjawisko za objaw ciężkiego uszkodzenia spermatogenezy, inni, np. T i l l m a n n (cyt. za E i b l e m, 1959), nie uważają go za objaw patologiczny na podstawie stwier-

¹ FSH jest to symbol oznaczający *Follicule Stimulating Hormone* — hormon dojrzewania pęcherzyków.

dzania obecności wspomnianych tworów w nasieniu płodnych samców. Ve z n i k (Karlove Vary), na podstawie swych badań nad sztucznie wywołanymi zaburzeniami w spermatogenezie u 26 buhajów, 32 królików i 12 szczurów, dochodzi do wniosku, że zwiększone występowanie elementów wielojądrzastych w tkance plemnikotwórczej i w nasieniu należy traktować jako pierwszy objaw zaburzenia czynności plemnikotwórczej.

WPLYW CZYNNIKÓW ZEWNĘTRZNYCH NA JAKOŚĆ NASIENIA

W kompleksowej pracy nad wpływem żywienia buhajów (szczegółowo zreferowanej przez G ł o d a) na produkcję nasienia przeprowadzonej przez badaczy czeskich (V a l e n t a, P e t r o v s k y, N o v a k o v a — Karlove Vary) zajęto się wpływem żywienia obfitego, lub umiarkowanego na zawartość niektórych składników chemicznych nasienia.

Z wyjątkiem fosforu i suchej masy, które w nasieniu buhajów żywionych obficie wykazywały wyższy poziom niż w nasieniu buhajów żywionych umiarkowanie, pozostałe składniki, a mianowicie: N, Ca, K i Mg wykazywały poziom jednakowy. Przy okazji swych badań autorzy wykazali wyraźną negatywną korelację między zawartością azotu i fosforu w nasieniu, tłumacząc ją zmianami w składzie osocza nasienia pod wpływem pobudzenia płciowego różnego stopnia.

Wpływowi podniecenia płciowego na jakość nasienia buhajów poświęcił swe badania S i g n o r e t (Haga). Badał on wpływ najczęściej w praktyce stosowanych sposobów pobudzania buhajów, a mianowicie: 1) wstrzymywania od skoku po doprowadzeniu do partnera kopulacyjnego, 2) tzw. ślepe skoki, 3) oprowadzania za partnerem kopulacyjnym, na objętość i gęstość ejakulatów oraz ruchliwość nasienia. Z załączonych tabel wynika, że bodźcami pobudzającymi silnie wydajność ejakulatów jest: wstrzymywanie od skoku, a przede wszystkim — ślepe skoki (tab. 1, 2, 3).

Tabela 1

Ewolucja cech jakościowych nasienia w wyniku wstrzymywania od skoku
(wg Signioreta)

Czas wstrzymywania od skoku w minutach	Liczba pobranych ejakulatów	Objętość ejakulatu	Ruchliwość w skali 4-stopniowej	Ogólna ilość plemników w ejakulacie (10 ⁹)	Ogólna ilość żywych plemników w ejakulacie (10 ⁹)
0	105	3,020	2,077	2,902	2,129
2	79	3,797	2,318	4,063	3,312
5	200	4,107	2,634	3,760	3,083
10	67	4,246	2,733	3,820	3,248
20	54	4,378	2,818	3,807	3,187

Tabela 2

Wpływ wstrzymywania od skoku (W) w połączeniu ze ślepym skokiem (S)

Czas wstrzymywania od skoku w minutach	Liczba pobranych ejakulatów	Objętość ejakulatu	Ruchliwość w skali 4-stopniowej	Ogólna ilość plemników w ejakulacie (10 ⁹)	Ogólna ilość żywych plemników w ejakulacie (10 ⁹)
(W) 2 min	110	3,493	2,367	4,006	3,230
(W) 2 min + 1S	69	4,741	3,096	5,764	4,906
(W) 5 min	236	3,829	2,647	3,638	2,991
(W) 5 min + 1S	135	4,987	2,926	6,186	5,248
(W) 5 min + 2S	41	6,510	2,993	8,048	6,920
(W) 10 min	79	3,881	2,723	3,577	3,048
(W) 10 min + 1S	67	4,725	2,975	5,695	5,038

Tabela 3

Wpływ 5-minutowego oprowadzania samca oraz 5 min. wstrzymania od skoku

Czas wstrzymywania od skoku w minutach	Liczba pobranych ejakulatów	Objętość ejakulatu	Ruchliwość w skali 4-stopniowej	Ogólna ilość plemników w ejakulacie (10 ⁹)	Ogólna ilość żywych plemników w ejakulacie (10 ⁹)
(W) 5 min	247	4,042	2,681	3,805	3,116
(W) 5 min	100	4,599	3,210	4,632	4,059

Oprowadzanie za prowokatorem stanowi — jak wynika z doniesienia — bodziec nieco słabszy. Co do czasu wstrzymania od skoku najlepsze pobudzenie uzyskał autor przy opóźnieniu o 2—5 minut, dalsze wstrzymywanie od skoku dawało tylko nieznaczną poprawę jakości nasienia.

BADANIA NAD BAKTERIOLOGIĄ NASIENIA I WPŁYWEM DROBNOUSTROJÓW NA JEGO ZDOLNOŚĆ ZAPŁADNIAJĄCĄ

W ostatnich latach ożywiło się zainteresowanie tymi drobnoustrojami, które występują w nasieniu i w jamie napletkowej, oraz znaczeniem ich dla zdolności zapładniającej nasienia. Oba zjazdy dały temu wyraz w postaci aż 8 doniesień dotyczących tego zagadnienia. Były one poświęcone zarówno wpływowi wymienionych drobnoustrojów na żywotność nasienia *in vitro*, jak również ich chorobotwórczemu działaniu w przypadku unasiwienia samicy.

Marinov (Haga) wykazał, że *Chromobacterium ametistum*, *Bac. subtilis*, *E. Coli*, *Bac. proteus* skracają przeżywanie nasienia *in vitro*. Nato-

miast dodatek *Sarcina lutea* do nasienia spowodował wyraźne przedłużenie życia plemników w porównaniu z kontrolą. K a z d a (Karlove Vary) na podstawie stwierdzenia, że w próbach nasienia występują najczęściej drobnoustroje z rodzaju *Corynebacterium* (39% prób), *Pseudomonas aeruginosa* (24%), *Corynebacterium pyogenes* (12%), *Proteus* (12%), *E. Coli* (5%), *E. Freundi* (4%), określił „toksyzną dla plemników dawkę drobnoustrojów“. Wynosiła ona dla poszczególnych gatunków przy wylęganiu w 37°C od 200—500 milionów drobnoustrojów na 1 ml³. Szkodliwość wymienionych gatunków ustalił K a z d a w następującej kolejności: *E. freundi*, *E. Coli*, *Proteus*, *C. pyogenes*, *Ps. aeruginosa*.

Niezidentyfikowane szczepy rodz. *Corynebacterium* wykazywały bądź słabą aktywność plemnikobójczą, bądź też powodowały przedłużenie przeżywania plemników *in vitro*. M ü l l e r o v a (Karlove Vary) wykazała szkodliwy wpływ *Corynebact. virid.* na plemniki *in vitro*, nie udało się jej jednak wykazać chorobotwórczego działania tego drobnoustroju dla krów unasienionych zakażonym nasieniem.

H u b r i g (Haga) przedstawił wyniki swych badań nad identyfikacją szczepów *Ps. aeruginosa* znajdujących w nasieniu i w narządach rozrodczych bydła. Wykazał on, iż większość wyosobnionych szczepów należy do niezidentyfikowanej serologicznie grupy, którą określił mianem „grupy H“. Grupę tę uważa się za saprofityczną. Również B l o m (Haga) identyfikując wyosobnione przez siebie z nasienia buhajów paciorkowce stwierdził, że większość należy do saprofitycznej grupy *Lancefield. G.*

Zdaje się wynikać z doniesień przedstawionych na obu zjazdach, że drobnoustroje znajdujące w nasieniu, jeżeli nawet należą do rodzajów spotykanych w procesach ropnych, nie są w stanie wywołać zmian zapalnych w narządach rozrodczych samicy, jeżeli zostaną wprowadzone do tego narządu przy unasienianiu w czasie rui. Odnosi się to zarówno do *Corynebacterium pyogenes* (R o m m e l, Haga), jak i paciorkowców (H u b r i g i W o h a n k a, Haga).

Wychodząc z założenia, że obecność drobnoustrojów w nasieniu może się przyczynić do skrócenia czasu jego przeżywania i obniżenia zdolności zapładniającej, zwłaszcza że osłona antybiotykowa nie stanowi pewnego zabezpieczenia przed namnażaniem drobnoustrojów, C e m b r o w i c z i O s b o r n e (Haga) przeprowadzili próby uwolnienia nasienia od drobnoustrojów drogą pośrednią, mianowicie za pomocą odkażających płukań jamy napletkowej, z której jak wiadomo pochodzi większość drobnoustrojów znajdujących w nasieniu. W szeregu prób wspomniani autorzy ustalili, że najlepsze „odkażenie“ jamy napletkowej, a pośrednio — nasienia, można uzyskać w drodze kilkakrotnie powtarzanego, w odstępach 24-godzinnych, wlewania do jamy napletkowej oleistej zawiesiny streptomycyny i penicyliny (50 ml oleju parafinowego, 2 g streptomycyny

i 1 mln jedn. penicyliny). Po zakończeniu takiej kuracji jama napletkowa jest praktycznie przez kilka dni wolna od drobnoustrojów, po czym stopniowo zaczyna rozmnażać się w niej wyjściowa flora bakteryjna, osiągając stan przedkuracyjny po upływie około 3 tygodni. Metoda ta, jakkolwiek kłopotliwa, może znaleźć zastosowanie w praktyce tam, gdzie stosuje się przechowywanie nasienia w temperaturze pokojowej, przy której następuje niejednokrotnie przełamanie osłony antybiotykowej przez drobnoustroje nasienia (E i b l i wsp. 1959).

BADANIA NAD KAPACYTACJĄ¹ PLEMNIKÓW

W 1957 r. A u s t i n i B i s h o p wykazali, że zjawisko kapacytacji łączy się z pewnymi morfologicznymi zmianami w obrębie plemnika. Zmiany te polegają na rozluźnieniu struktury akrosomu i osłabieniu jego połączenia z główką. Obnażenie główki z akrosomu uważają autorzy za warunek zapłodnienia, wtedy bowiem następuje odsłonięcie perforatorium, prawdopodobnie wydzielającego ciało rozpuszczające osłonkę szklistą komórki jajowej. A u s t i n (Haga) przedstawił na Kongresie wyniki dalszych swych badań nad rolą akrosomu w rozpraszaniu komórek wieńca promienistego. Z badań tych wynika, że w okresie kapacytacji następuje modyfikacja akrosomu, wskutek czego plemnik staje się zdolny do wykorzystania wytwarzanej przez siebie hialuronidazy.

BADANIA NAD KONSERWACJĄ NASIENIA

Badania nad przechowywaniem nasienia stanowią trzon praktycznych dociekań z zakresu sztucznego unasienniania. W tej dziedzinie daje się zanotować w ostatnich kilkunastu latach ogromny postęp, a co rok przybywają dalsze przyczynki zawarte w setkach doniesień. Wielka liczba badań nad konserwacją nasienia wynika nie tylko ze znaczenia tego problemu dla praktyki, ale przede wszystkim stąd, że zastosowanie nowej metody konserwacji wymaga w praktyce wielokrotnego sprawdzenia, modyfikacji i ulepszeń. Nic też dziwnego, że doniesienia dotyczące przechowywania nasienia stanowiły prawie połowę wszystkich referatów z zakresu biologii nasienia.

Sytuację w zakresie badań nad przechowywaniem nasienia scharakteryzował najlepiej M i ł o w a n o w (Karlove Vary) w swym interesującym

¹ Zjawisko określane nazwą kapacytacji polega na nabywaniu pełnej zdolności zapładniającej przez plemniki w drogach rodnych samicy.

referacie poświęconym postępowi w zakresie sztucznego unasieniania. Pierwszy okres badań nad przechowywaniem nasienia poświęcony był poszukiwaniom rozcieńczalnika, który by był zdolny do podtrzymania życia plemników *in vitro*. Drugi — znalezieniu ciał chroniących plemniki przed niekorzystnymi wpływami środowiska (żółtko jaja kurzego, lipidy, antybiotyki). Znalezienie ciał osłaniających pozwoliło na zastosowanie niskich temperatur do konserwacji nasienia¹. Trzeci okres badań zapoczątkowany przez S o k o ł o w s k ą polega na dodawaniu do nasienia ciał uzupełniających — „implementorów“, które działają nie na plemniki, lecz na tkanki unasienianej macicy, ułatwiając bądź wędrówkę plemników w drogach rodnych samicy, bądź samo zapłodnienie. Do ciał tych należy mucynaza, rozrzedzająca zbyt gęsty śluz rujowy niektórych krów i oksytocyna przyspieszająca przesuwanie się nasienia w macicy. Ma ona oddawać szczególnie cenne usługi w unasienianiu świń. Według Miłowanowa i Sergejewa (1961) dodatek 2,5—5 jedn. oksytocyny do dawki inseminacyjnej podnosi znacznie odsetek zapłodnień po jednorazowym unasienieniu loch.

Wpływ mucynazy na zdolność zapładniającą nasienia badał w ČSRS Podany (Karlove Vary). Po przeprowadzeniu 1214 unasienień nasieniem z dodatkiem mucynazy i 1186 unasienień kontrolnych uzyskał po mucynazie 55,4% zapłodnień, a po unasienieniu kontrolnym 54,4% zapłodnień.

BADANIA NAD PRZECHOWYWANIEM NASIENIA W TEMPERATURZE POKOJOWEJ

Przed paru laty Van Demark i Sharma donieśli o możliwości przechowywania nasienia w temperaturze pokojowej przy zastosowaniu specjalnego rozcieńczalnika, w którym rolę inhibitora przemiany materii stanowił dwutlenek węgla.

W latach 1957—61 możliwości konserwacji nasienia w temperaturze pokojowej były przedmiotem licznych badań. Zaproponowano szereg modyfikacji rozcieńczalnika, sprawdzono też zdolność zapładniającą nasienia nim rozrzedzonego i użytkowanego do 7 dni po pobraniu. Doniesienia praktyków o wartości tej metody, oparte o kontrolowane doświadczenia terenowe, były sprzeczne, tak że w praktyce nie znalazła ona szerszego zastosowania. Jednakże sama zasada, tj. możliwość utrzymania wysokiej zdolności zapładniającej nasienia bez konieczności ochładzania go — okazała się tak interesująca, że badania nad nią trwają. Wyrazem tego było

¹ Miłowanow uważa, że z punktu widzenia hodowlanego najbardziej racjonalna jest konserwacja nasienia w stanie zamrożonym w temperaturze ciekłego azotu.

kilka doniesień poświęconych temu zagadnieniu, przedstawionych w Hadze.

V e n k o v i P e e v (Haga) z Bułgarii przedstawili wyniki zastosowania własnej modyfikacji rozcieńczalnika Miłowanowa do konserwacji nasienia w temperaturze pokojowej. Rozcieńczalnik Miłowanowa składa się z 2,4% cytrynianu sodu pięciowodnego, 1,26% dwuwęglanu sodowego, 0,57% glikozy, 0,3% streptocydu, 0,07% fosforanu potasowego, penicyliny i streptomycyny oraz z 10% żółtka jaja kurzego. Składnikami czynnymi w rozcieńczalniku są dwuwęglan sodowy i fosforan potasowy, których wzajemne oddziaływanie powoduje wytwarzanie dwutlenku węgla. W próbie unasienniania, w której porównano zdolność zapładniającą nasienia przechowywanego w rozcieńczalniku Miłowanowa, z nasieniem przechowywanym w rozcieńczalniku cytrynianowo-żółtkowym (CŻ) w temperaturze 5°C, uzyskali oni 69,7% zapłodnień po 1 unasiennieniu, a w 51,7% po unasiennieniu kontrolnym.

B o n a g a (Haga) przeprowadził podobne doświadczenie z oryginalnym rozcieńczalnikiem Van Demarka, uzyskując również wyższy odsetek zapłodnień za pomocą nasienia przechowywanego w temperaturze pokojowej aniżeli za pomocą nasienia przechowywanego w CŻ w temperaturze 5°C.

N o r m a n (Haga), który w 1957 r. zaproponował rozcieńczalnik złożony z roztworu cytrynianu i mleka kokosowego, zastosował go do przechowywania nasienia w temperaturze pokojowej i porównał z wartością konserwującą mleka. Poniższe zestawienie podaje wyniki tego porównania. (Tabela nr 4).

Tabela 4

Wyniki unasienniania nasienia przechowywanego w temperaturze pokojowej w mleku kokosowym i przechowywanego w temp. 5°C w rozcieńczalniku mleczno-glicerowym

Nasienie przechowywane w mleku			Nasienie przechowywane w rozc. mleczno-glicerolowym	
Czas konserwowania (dni)	Liczba krów unasiennionych	Odsetek krów nie powtarzających	Liczba krów unasiennionych	Odsetek krów nie powtarzających
0	19	52,6	19	84,2
1	173	75,7	299	73,6
2	206	69,4	355	77,7
3	274	64,2	23	82,6
4	238	56,7	14	78,6
5	193	49,2	5	100,0
6	100	50,0	2	50,0
7	8	75,0	1	100,0
Średnio	—	61,6	—	76,5

Różnica 14,9% na niekorzyść rozcieńczalnika kokosowego jest tylko pozorna. Z zestawienia widać, że wartości tu porównywane mogą być uważane za równoległe tylko w ciągu pierwszych trzech dni konserwowania, a wtedy różnica między zdolnością zapładniającą nasienia przechowywanego w porównywanych rozcieńczalnikach wyniesie 4,7% i jest statystycznie nieistotna.

Melrose (Haga) zastosował zmodyfikowany rozcieńczalnik Van Demarka do konserwowania nasienia w temperaturze obniżonej, uzyskując przy wykorzystywaniu nasienia nim rozrzedzonego przez 6 dni po pobraniu wyniki o 17% lepsze niż nasieniem przechowywanym w rozcieńczalniku mleczno-glicerolowym.

NOWE ROZCIEŃCZALNIKI

Soki owocowe. Poza mlekiem kokosowym zaproponowanym przez Normana przedstawiono w Hadze dwie prace nad rozcieńczalnikiem pomidorowym; rozcieńczalnik ten został opracowany w 1959 r. przez Chieffi'ego. Autor metody przedstawił modyfikację swego rozcieńczalnika żółtkowo-pomidorowego, znacznie lepszą do rozcieńczalnika oryginalnego. Składa się ona z 10 części serwatki, 20 części żółtka jaja kurzego, 100 części soku pomidorowego i 10% glicerolu. Bonadonna, Fornaroli i Pozzi w porównaniu dwu modyfikacji rozcieńczalnika pomidorowego z innymi rozcieńczalnikami uzyskali najlepsze przeżywanie nasienia w rozcieńczalniku złożonym z soku pomidorowego, wody mineralnej i żółtka jaja kurzego.

Rozcieńczalniki o złożonym składzie. Na ogół stacje unasienniania niechętnie stosują rozcieńczalniki o złożonym składzie i skomplikowanym sposobie przygotowywania. W miarę jednak przeobrażania się stacji z małych zakładów usługowych w duże laboratoria „produkcji“ nasienia podstawową troską stacji staje się „wyprodukowanie“ nasienia o należytej zdolności zapładniającej, utrzymującej się przez możliwie jak najdłuższy okres na poziomie zbliżonym do wyjściowego. Ponieważ skład chemiczny rozcieńczalników zawierających dodatki osłaniające (żółtko, mleko) jest właściwie nieznan, badania współczesne idą w kierunku sporządzenia rozcieńczalników syntetycznych, w których brak ciał osłaniających usiłuje się zastąpić zestawem związków mineralnych. Do rzędu takich rozcieńczalników należą płyn Bomsteina (1959), rozcieńczalnik Foote'a CUE (1960) i przedstawiony przez Normana na zjeździe w Hadze rozcieńczalnik „N-J“ o następującym składzie:

Cytrynian sodu dwuwodny	2,16 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,003 g

Na ₂ SO ₄	0,034 g
KNO ₃	0,014 g
KCl	0,011 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,045 g
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0,483 g
Glikoza	0,500 g
Sulfanilamid	0,300 g
Penicylina	0,031 g
Streptomycyna	0,068 g
Mykostatyna	4 jedn.
Katalaza	150 jedn.

PRZECHOWYWANIE NASIENIA KNURÓW

Przechowywaniu nasienia knurów poświęcone były dwie prace. F e r e - d y a n i współpr. (Karlove Vary) po wypróbowaniu szeregu rozcieńczalników stosowanych w praktyce unasieniania świń uzyskał najlepsze wyniki, pozwalające na utrzymanie plemników w temperaturze obniżonej ruchliwości do 50% — przez przeszło 5 dni za pomocą rozcieńczalnika glicynowo-glikozowego o następującym składzie: glikoza bezwodna — 4,5%, glicyna — 0,6%, żółtko jaja kurzego — 6—7%.

D u M e s n i l, d u B o i s s o n i współpr. (Haga) uzyskali dobre wyniki stosując do rozcieńczania nasienia knura płyn buforowy rozcieńczalnika Van Demarka nasycany dwutlenkiem węgla przy temperaturze 30° C. Nasienie rozcieńczone w stosunku 1 : 1 zatapiało w ampułkach i ochładzano do temperatury przechowywania +15° C. Przed użyciem nasienie rozcieńczano ponownie w stosunku 1 : 1 buforem IVT (bez CO₂) ogrzany do 30°. Wyniki unasieniania były bardzo zachęcające, na 6059 unasieniach uzyskano ogółem 52,17% zapłodnień po 1 unasienieniu, przy czym spadek zapłodnialności między dniem 0 i 4 wynosił 6%.

PRZECHOWYWANIE NASIENIA W STANIE ZAMROŻONYM

Zamrażanie nasienia jako metoda przechowywania stanowi dla praktyków niewątpliwie metodę przyszłości. W Stanach Zjednoczonych unasienia się obecnie 1/3 pogłowia bydła unasienianego nasieniem mrożonym, szereg zaś innych krajów, m. in. Związek Radziecki, przestawia się na tę metodę. Badania współczesne nad zamrażaniem nasienia zmierzają do znalezienia metody, która by pozwoliła zapobiec pewnemu obniżeniu zdolności zapłodniającej nasienia obserwowanej zwykle w nasieniu mrożonym w porównaniu ze świeżym, oraz metody pozwalającej utrzymać

wysoką zdolność zapładniającą nasienia mrożonego przez długi okres czasu. Wydaje się, że drugi problem został już rozwiązany przez zastosowanie temperatury ciekłego azotu do przechowywania nasienia.

Zagadnienie samo w sobie stanowi zastosowanie mrożenia nasienia innych gatunków zwierząt domowych. Metoda ta dotychczas nie wyszła poza granicę eksperymentu. W tym zakresie przedstawiano w Karlovych Varach dwa doniesienia: *Osteszki* oraz *Kaleva i Venkova*. Jakkolwiek zreferowane przez nich doświadczenia przeprowadzono na skromnym materiale (*Osteszko* — 56 owiec, *Kalev i Venov* — 80 owiec i 46 kóz), wyniki unasienniania nasieniem mrożonym należy ocenić jako zadowalające (owce — 48—55% zapłodnień po 1 unasiennieniu, kozy — 33% zapłodnień).

Inne prace dotyczące zamrażania dotyczyły badań nad nasieniem bydła *Curtis, Forteath i Polge (Haga)*, *Emmens i Martin (Haga)*, *Stewart (Haga)*, *Dassanyake (Haga)*, *Adler (Haga)*. Poświęcone były one doświadczeniom nad wpływem zmiany składu rozcieńczalnika oraz techniki zamrażania na jakość i zdolność zapładniającą nasienia. Trudno w tej chwili ocenić wartość wyników tych doświadczeń, jeśli się uwzględni, że pierwotna technika zaproponowana przez *Polge'a* nie uległa istotnym zmianom, a ilość modyfikacji zaproponowanych w międzyczasie przez różnych autorów można liczyć na dziesiątki, przy czym każdy z autorów uzyskiwał za pomocą swojej metody „najlepsze wyniki“. Niemożność porównania równoczesnego wszystkich modyfikacji nie pozwala na wyrobienie sobie obiektywnej opinii o ich wartości. Sytuację w zakresie badań nad zamrażaniem nasienia określił bodaj najlepiej *Stewart* w podsumowaniu swego doniesienia: „... istnieje niewątpliwie optymalna technika (którą w drodze żmudnych badań empirycznych można by odkryć — przypisek własny), jednakże dla uzyskania zdolności zapładniającej nasienia mrożonego, równej nasieniu świeżemu, potrzebna jest radykalna zmiana techniki mrożenia...“

Ze względu na ograniczenie czasu nie omówiłem kilku interesujących prac, których wykaz podaję w spisie doniesień. Są to: praca *Paredisa i Vandeplassche'a* nad współzależnością między cechami nasienia knura a plennością unasiennianych nim loch, *Blockhuisa (Haga)* nad ruchem plemników, *Van Duijna (Haga)* nad uczuleniem na światło plemników przez pewne barwniki, *Lodge'a i Salisbury'ego (Haga)* nad wskaźnikami oddechowymi nasienia buhaja, *Bratanova (Haga)* nad biologią nasienia ryb, *Stowera i Cembrowicza (Haga)* nad wpływem glicerolu na płodność nasienia buhaja, *Kozumplika (Karlove Vary)* nad przydatnością niektórych przyrządów z plastyku do unasienniania.

W podsumowaniu niniejszego przeglądu pragnąłbym zwrócić uwagę na kilka momentów, których niniejszy przegląd nie podkreśla, a które niewątpliwie będą w przyszłości rzutowały na zagadnienia związane z praktyką unasienniania zwierząt. Ogromny postęp w dziedzinie biochemii nasienia pozwoli w przyszłości ściślej oceniać płodność samców i prawdopodobnie przewidywać zdolność zapładniającą poszczególnych ejakulatów. W stacjach unasienniania stworzone zostaną warunki do uzyskiwania nasienia prawie całkowicie wolnego od drobnoustrojów. W zakresie konserwowania nasienia metoda zamrażania nie będzie jedyną metodą długotrwałego jego utrzymywania. Należy przypuszczać, że zostaną opracowane metody pozwalające użytkować nasienie przechowywane w temperaturze pokojowej przez 10—14 dni, a nasienie przechowywane w temperaturze zerowej — dwa razy dłużej.

SPIS DONIESIEN

Z ZAKRESU BIOLOGII I KONSERWACJI NASIENIA

przedstawionych na IV Kongresie Rozmnażania Zwierząt w Hadze (1961) i na Konferencji przedstawicieli państw Rady Wzajemnej Pomocy Gospodarczej w Karlowych Varach, uzupełniony niektórymi pozycjami z zakresu referowanego przedmiotu.

1. Adler H. C. — Freezing of bovine semen in straws with coldgas generator and storage in liquid air, Haga.
2. Austin C. — Significance of sperm capacitation, Haga.
3. Bane A. — Acrosomal abnormality associated with sterility in boar, Haga.
4. Blockhuis E. — Optical investigations on the movement of bull spermatozoa, Haga.
5. Blom E., Romer O. — On the occurrence of hemolytic streptococci in bull semen, Haga.
6. Bonadonna T., Fornaroli D., Pozzi G. — The utilisation of some vegetable juices for the dilution of semen, Haga.
7. Bonaga G., Tornatore A. — Observations sur l'emploi de matériel seminal de taureau conservé avec CO₂, Haga.
8. Bratanow K., Dikow V. — Sur certaines particularités de sperme chez les poissons, Haga.
9. Cembrowicz H., Osborne A. — The effect of preputial cavity treatment on the number and types of bacteria in semen samples and sheath washings, Haga.
10. Chieffi A. — Experiments with new bovine semen diluters, Haga.
11. Chury J. — Die gonadotrope Wirkung von Spermaextrakten, Karlove Vary.
12. Curtis P., Fortth A., Polge C. — Survival of bull sperm frozen in milk diluents containing varying concentrations of glycerol and fructose, Haga.
13. Dawson R. M. C., Mann T., White L. 1957 — Glycerylphosphorylcholine and phosphorylcholine in semen and their relation to choline. *Biochem. J.* 65 627.

14. Dassanayake L., Kolland E., Hoole B., Martin I. — The use of deep frozen Aberdee angus semen from Australia for the artificial insemination of native cattle in North Borneo, Haga.
15. Duijn C. van — Effects of light and photosensitization by some vital stains and fluorochromes on living bull spermatozoa, Haga.
16. Emmens C., Martin I. — The effects of equilibration period and sugar content of the diluent on the survival and fertility of bull spermatozoa deep frozen to -79°C , Haga.
17. Feredyan T., Feredyan I., Slaveš J. — Beiträge zum Studium der Verdünnung und Konservierung von Ebersamen, Karlove Vary.
18. Fulka F., Pavlok A. — Menge und Qualität der Ejakulate unterschiedlich gefütterter Bullen bei Anwendung von Erschöpfungsprüfungen, Karlove Vary.
19. Hancock J. — Evidence of an inherited seminal character associated with infertility of friesian bulls. *Vet. Rec.*: 61 (22).
20. Herman H. — Broad scale use of frozen semen, Haga.
21. Hubrig T., Wohanka K. — Untersuchungen über die Rolle von *C. pyogenes* bei Fruchtbarkeitsstörungen des Rindes, Haga.
22. Hubrig T., Wohanka K. — Untersuchungen über die Bedeutung der Streptokokken als Erreger von Paarungs und Besamungsinfektionen des Rindes, Haga.
23. Hubrig T. — Über eine neue im Genitaltrakt von Bullen vorkommende serologische Gruppe H bei *Pseudomonas aeruginosa*, Haga.
24. Josifow K. — Untersuchung der Sukzinoxidase-aktivität in Spermien von Widder, Bullen, Eber und Hengst, Karlove Vary.
25. Kalev G., Venkow T. — Sur la méthode de congélation profonde de sperme du taureau de belier et de bouc, Haga.
26. Karg H., Gassner F. — Versuche zur Charakterisierung der Ascorbinsäurekonzentrationen in Eber- und Bullensperma, Haga.
27. Kazda J. — Die Häufigkeit des Auftretens von Mikroorganismen in der Samenflüssigkeit und den Geschlechtsorganen von Bullen und der Einfluss der am öftesten auftretenden Bakterien auf die Samenfäden, Karlove Vary.
28. Kazda J., Lerchova E. — Methode zur Bestimmung der Bakterienmenge in der Samenflüssigkeit von Bullen, Karlove Vary.
29. Kozumplik — Der Einfluss gewisser zur Herstellung von Besamungsgeräten verwendeter Stoffe auf die Vitalität der Spermien des Ebers, Karlove Vary.
30. Leuchtenberger C. (1955) — The desoxyribonucleic acid (DNA) content in spermatozoa of repeated seminal fluid from fertile and infertile men. *J. Lab. Clin. Med.* 45, 851.
31. Liess J., Krause II. D. (1958) — Zur Vorkommen des sogenannten „Akrosom-Defektes“ im Ebersperma, *D. T. W.*, 65 : 677.
32. Lodge J., Salisbury G. — Respiratory quotients of Bovine spermatozoa, Haga.
33. Mann T. — Spermatozoa of mammals from the biochemical point of view, Haga.
34. Du Mesnil du Boisson Jondet R. — Utilization du CO_2 dans l'insemination porcine, Haga.
35. Marinov I. — The effect of certain micro-organisms on the viability of spermatozoa, Haga.

36. Melrose R. — Fertility of bull semen stored in milk-yolk, CUE, milk-glycerol and IVT diluents, Haga.
37. Milovanov V. — Der heutige Stand und die Entwicklung der Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Künstlichen Besamung landwirtschaftlicher Nutztiere, Haga.
38. Milovanov V., Sergejev N. — Simultannoje wwiedienije oksitocina — nowyj mietod powyszenija effiektiwnosti isskustwiennogo osiemienienija swiniej. *Životnovodstvo*: 23 (11) : 70.
39. Norman E. — Prolonged survival of metabolically and functionally active mammalian sperm at room temperature, Haga.
40. Osteszkó F. — Tiefkühlung des Samens von Zuchttieren und eine neue Art der Organization KB, Karlove Vary.
41. Paredis F., Vandeplassche M. — Effect of initial motility, number and age of spermatozoa on farrowing rate, Haga.
42. Podany J. — Versuche mit Beigabe von Muzinase zum Bullensamen, Karlove Vary.
43. Rommel W. — Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Pathogenität von *Corynebacterium pyogenes* im Genitale des Rindes während des Brunstzyklus, Haga.
44. Salisbury G., Flerchinger F. — In vitro ageing of spermatozoa and evidence for embrionic or early fetal mortality in cattle, Haga.
45. Signoret J. — Étude de l'influence de divers éléments du comportement sexual du taureaux sur les caractéristiques du sperme, Haga.
46. Stewart D. — Observations on the fertility of frozen sesem, Haga.
47. Szumowski P. — Les proteines du plasma seminal et les troubles de la fertilité des toureaux, Haga.
48. Szumowski P. (1956) — Quelques résultats de l'examin électrophoretique des proteins du plasma seminal de taureau III Int. Congr. An. Reprod. Sci. 102.
49. Szumowski P., Stöber (1955) — Sur les proteins du sperme du cheval., *C. R. Acad. Agric. Fr.* 40 : 156.
50. Sluis L., van der — Systematic examination of the genital organs of bulls and registration of the results, Haga.
51. Teunissen G. (1946) — Een afwijking van het acrosom (kopkap) bij de spermatozoiden van een stier, *Tydsdr. Diergeneesk* 71; 292.
52. Valenta M., Petrovsky E., Novakova E. — Biochemische Bewertung des Spermas von Bullen auf verschiedener Ernährungsstufe, Karlove Vary.
53. Venkov T., Péer G. — Application d'un milieu de phosplate et de carbonate pour la conservation du sperme de taureaux à la temperature de l'intérieur, Haga.
54. Veznik Z. — Zur Frage vielkerniger Elemente in der spermiologischen Diagnostik, Karlove Vary.
55. Welch R., Hanly E. W., Guest W. — The deoxyribonucleic acid (DNA) deviation in the semen spermatozoa of bulls of unknown fertility under two years of age and its relationship to motility, count, and morphology, Haga.
56. White I., Wallace J., Wales R., Scott T. — The occurence and metabolism of glyceryl phosphorylcholine in semen and genital tract, Haga.
57. Wolfarth, E. (1961) — Beitrag zum Acrosomdefekt im Ebersperma. *Zuchtyg*: 5: 268.

Л. Яськовски

ОБЗОР НАУЧНЫХ РАБОТ ИЗ ОБЛАСТИ БИОЛОГИИ
И КОНСЕРВАЦИИ СЕМЕНИ

представленных на IV Международном конгрессе по разведению животных в Гааге, а также на Конференции по физиологии и патологии разведения сельскохозяйственных животных в Карловых Варах в 1961 г.

Резюме

В докладе рассматриваются 40 сообщений, касающихся биологии и консервации семени, предложенных на упомянутых в заглавии съездах. Автор доклада подчеркивает три основные направления исследований, представленных в сообщениях, а именно: 1) исследования по биологии семени и связанные с этим исследования по оценке плодовитости самцов, 2) исследования по значению микроорганизмов в семени, 3) исследования по хранению семени.

L. Jaśkowski

A REVIEW OF SCIENTIFIC WORKS ON BIOLOGY AND PRESERVATION
OF SEMEN

Delivered to the 4th International Congress of Animal Reproduction in Haag, and to the International Conference on Physiology and Pathology of Animal Reproduction at Karlove Vary in 1961

Summary

The presented paper discusses forty contributions on biology and preservation of semen, delivered to the mentioned congresses. The author of the paper has distinguished three main trends of investigations contained in the papers, viz. 1. Investigations into biochemistry of semen, and connected with it studies on estimation of male fecundity. 2. Studies on importance of microorganisms in semen. 3. Studies on preservation of semen.