

LECH JAŚKOWSKI

NOWSZE BADANIA NAD KONSERWACJĄ NASIENIA BUHAJÓW

Hodowlane efekty unasienniania w hodowli bydła w świetle doniesień piśmiennictwa światowego są raczej skromne. Autorzy, którzy się tym zagadnieniem zajmowali (James 1952, Hansen i Larsen 1954, Robertson i Rendall 1954, Tucker i Farthing 1958, Gudoryon i wsp. 1958), stwierdzają dość zgodnie, że wydajność potomstwa krów unasiennianych albo wcale nie wzrosła, albo wzrosła stosunkowo nieznacznie. Analizując przyczyny tego stanu (Jaśkowski 1958) wyraziłem pogląd, że jednym z powodów tego zjawiska była niemożność kierowania u bydła objętego unasiennianiem kojarzeniami indywidualnymi. Organizacja kojarzeń indywidualnych, a tym samym dobór hodowlany, wymykały się spod kontroli zootechników na skutek zbyt krótkiego okresu użyteczności nasienia przy dotychczasowych metodach jego konserwacji oraz konieczności oszczędnej eksploatacji buhajów inseminacyjnych. Zasady eksploatacji buhajów wymagały, aby buhaj nie był zmuszony do oddawania nasienia częściej niż raz na pięć dni, jeżeli więc hodowca pragnął unasienniania krowy nasieniem wybranego buhaja, musiał się godzić na znacznie niższe szanse zacielenia krowy na skutek użycia nasienia przetrzymywanego dłużej niż 48 godzin. Mając do wyboru doraźne straty gospodarcze spowodowane opóźnieniem zacielenia krowy i prawdopodobieństwo późniejszych słabych efektów hodowlanych, hodowcy zazwyczaj wybierali straty hodowlane.

Natomiast gospodarcze efekty (przez podniesienie ogólnego odsetka zapłodnionych krów) i przede wszystkim sanitarne korzyści unasienniania były zgodnie z przewidywaniami duże.

Z tego krótkiego wstępu wynika, że jedną z dróg do lepszego hodowlanego wyzyskania unasienniania jest przedłużenie użyteczności nasienia po pobraniu. W niniejszym referacie pragnąłbym dać przegląd najważniejszych prac poświęconych zagadnieniu przedłużenia czasu konserwacji nasienia *in vitro*.

I. KONSERWACJA NASIENIA W OBNIŻONEJ TEMPERATURZE

Już Spallanzani w 1776 r. zauważył, że plemniki psa w obniżonej temperaturze tracą ruchliwość, ale za to żyją dłużej *in vitro*. Również badacze rosyjscy, zajmujący się w latach trzydziestych zagadnieniem

konserwacji nasienia, zdawali sobie sprawę z tego, że jedną z dróg do przedłużenia żywotności plemników *in vitro* jest ograniczenie ich metabolizmu, w celu zaoszczędzenia endogennych i egzogennych substancji odżywczych (Miłowanow 1940). Jednakże niedokładnie poznane zjawisko udaru chłodowego oraz trudności znalezienia łatwo dostępnych ciał chroniących nasienie przed udarem sprawiły, że do roku 1939 nie znano metody konserwacji, pozwalającej użytkować w praktyce inseminacyjnej nasienie przez okres dłuższy niż 12 godzin po pobraniu.

a. Rozrzedzalniki nasienia

Po odkryciu przez Philipsa i Lardy'ego (1940), że dodatek żółtka jaja kurzego do buforu fosforowanego chroni plemniki przed udarem chłodowym, pozwalając z jednej strony przyspieszyć proces oziębiania nasienia, z drugiej zaś przedłużyć użyteczność nasienia do 48 godzin, pierwszy etap przedłużenia konserwacji nasienia *in vitro* został dokonany. W roku 1941 Salisbury i wsp. oddali do użytku praktyków inseminacyjnych drugi rozrzedzalnik żółtkowy, oparty o bufor cytrynianowy. Oba te rozrzedzalniki stanowiły w latach 1940 do 1950 najbardziej rozpowszechnioną podstawę do konserwacji nasienia.

W roku 1949 Michajłow stwierdził, że przegotowane mleko stanowi dobry rozrzedzalnik nasienia, i mleko dzięki niskiej cenie i nieskomplikowanej obróbce przed użyciem zyskało wkrótce popularność równie dużą, jak wymienione powyżej rozrzedzalniki żółtkowe.

Wymienione rozrzedzalniki, stanowiąc z jednej strony środowisko odżywcze dla plemników, z drugiej zaś ochronne, odgrywają do tej pory dominujące znaczenie w praktyce inseminacyjnej, należy się im więc bliższe omówienie.

Rozrzedzalnik fosforanowo-żółtkowy

Używany jest jeszcze do tej pory w niektórych krajach (Holandia, Dania) jakkolwiek szereg badań wykazało, że w połączeniu z antybiotykami oraz przy stosowaniu wyższych rozrzedzeń uzyskuje się gorsze wyniki, niż przy stosowaniu nasienia rozrzedzonego w CŻ (rozrzedzalnik cytrynianowo-żółtkowy) lub w mleku (Cambell i Edwards 1955, Dreier i Webb 1953, Kok 1957, Van Dieten 1957).

Rozrzedzalnik cytrynianowo-żółtkowy (CŻ)

W postaci oryginalnej był oparty o hipertoniczny bufor cytrynianowy; po modyfikacji (Salisbury 1948, Jaśkowski 1948) buforu stosowany jest do tej pory bardzo szeroko. W wyniku badań Tosica i Walton'a (1946),

wykazujących, że niektóre aminokwasy żółtka pod wpływem enzymów nasienia wytwarzają szkodliwy dla plemników perhydrol oraz po stwierdzeniu przez Miłowanowa, że zmniejszenie proporcji żółtka w rozrzedzalniku pozwala znacznie złagodzić ów niekorzystny wpływ, istnieją tendencje do zredukowania zawartości żółtka do 15—25% (Miłowanow 1950, Stewart 1950, Almquist 1951, Holt 1952, Olds i wsp. 1951).

Z innych modyfikacji rozrzedzalników żółtkowych należy wymienić rozrzedzalnik cytrynianowo-glikozowo-żółtkowy zalecany przez Miłowanowa. W doświadczeniach *in vitro* dał on lepsze wyniki niż CŻ, w próbie terenowej właściwości te nie uwypukliły się w wyraźny sposób (Jaśkowski 1956). Również inne modyfikacje, mimo korzystnych wyników prób *in vitro*, dawały w próbach terenowych wyniki najwyżej równorzędne lub gorsze niż CŻ. Tak było np. z rozrzedzalnikiem glukozowo-węglanowo-żółtkowym Kampschmidta (1951), którego małą przydatność praktyczną stwierdzili Melrose i Stewart (1956). Również zalecany przez Bishopa i Salisbury'ego (1955) rozrzedzalnik solno-żółtkowy nie dał oczekiwanych wyników w próbie terenowej (Salisbury 1957). Inna modyfikacja — rozrzedzalnik glicynowo-żółtkowy (Roy i Bishop 1954) dał w próbach inseminacji wyniki zaledwie dorównujące CŻ (Melrose i Stewart 1956, Graham i Erikson 1956).

Rozrzedzalniki mleczne

Odkrycie przez Michajłowa faktu, że podgrzanie mleka znosi toksyczny jego wpływ na plemniki dało praktyce nowy rozrzedzalnik nasienia. Czynniki toksyczny udało się zidentyfikować Philips'owi i wsp. (1954). Jest nim laktonina związana z albuminową frakcją białek mleka. Zobjętnienie laktoniny następuje przez związki zawierające wolną grupę sulfhydrylową (uwalniane z mleka przez podgrzanie powyżej 92°). Związki te można dodać do mleka, uzyskując podobny efekt jak przez gotowanie (należy do nich np. chlorowodorek cysteiny — Johnson 1955), kwas thioglikolowy (Boyd 1954).

Do rozrzedzania nasienia używa się mleka przygotowanego w najrozmaitszy sposób: a więc mleka odtłuszczonego (Jacquet 1951), pełnego, mleka w proszku (Thacquer i Almquist 1951), mleka homogenizowanego (Williams i wsp. 1954) itp.

Na ogół większość doniesień terenowych stwierdza, że unasiennianie nasieniem rozrzedzonym w mleku daje co najmniej równorzędne, z reguły zaś lepsze wyniki, niż unasiennianie kontrolne (rozrzedzalnik CŻ). Najlepiej ilustruje to zestawienie sporządzone przez Salisbury'ego, uwzględniające wyniki doświadczeń szeregu badaczy (tabela 1).

Tabela 1

Porównanie wyników unasienniania przy pomocy nasienia rozrzedzonego w mleku lub w rozrzedzalniku CŻ (Salisbury, 1957)

Rozrzedzalnik	Ilość unasiennień	% Non returnów	Kontrola	Ilość unasiennień	% Non returnów
Mleko homogenizowane bez antybiotyków	543	70,9	CŻ bez antybiotyków	527	65,1
Mleko homogenizowane + antybiotyki	4544	70,6	CŻ + antybiotyki	4869	68,4
Mleko homogenizowane + antybiotyki	31288	69,1	CŻ + antybiotyki	30863	67,1
Mleko chude + antybiotyki	4367	67,3	CŻ + antybiotyki	4229	68,2

Dodawanie żółtka do mleka poprawia konserwujące właściwości mleka; podnoszą to zgodnie wszyscy badacze, którzy się tym zagadnieniem zajmowali (Jaquet 1951, Jaśkowski 1956, Szczęsna Żebracka 1957, Kluza i wsp. 1958, Hendriksje 1957, Sikes i wsp. 1958).

Ostatnio Adler i Rasbech (1956) zbadali konserwujące własności gotowanej śmietanki (zawierającej 9% tłuszczu), stwierdzając, że nie ustępują one mleku chudemu a przewyższają CŻ.

Rozrzedzalniki żółtkowe i mleczne z dodatkiem glicerolu

Po zastosowaniu przez Polge'a i wsp. (1949) dodatku glicerolu do nasienia w celu wzmożenia jego odporności na proces zamrażania, Holt (1953) stwierdził, że dodatek glicerolu do nasienia przechowywanego w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ podnosi jego zapładniałość. Nasienie glicerolizowane odznaczało się tym, że nie obniżało zapładniałości w drugim dniu użycia po pobraniu.

Badania nad metabolizmem nasienia glicerolizowanego wykazały, że glicerol nie jest rozszczepiany w warunkach beztlenowych, natomiast ulega rozszczepieniu przez plemniki przy dostępie tlenu (Mann i wsp. 1956, White 1956).

W przebiegu konserwacji powyżej 0°C , szczególnie w czasie transportu, warunki, w których przebywają plemniki, nie są ściśle beztlenowe, należy więc przypuszczać, że korzystny wpływ glicerolu na zdolność zapładniającą nasienia wynika z dostarczenia substratu egzogenego do metabolizmu w warunkach tlenowych. Ostatnie doświadczenia Sikes'a

i Merilan'a (1958), którzy porównywali rozrzedzalnik mleczno-żółtkowy, cytrynianowo-żółtkowy i mleczny, wszystkie z dodatkiem 8% glicerolu, wykazały, że nasienie przetrzymywane w temperaturze 0 do +3°C przeżywało w pierwszym przez 70 dni, w drugim przez 42 dni, w trzecim zaś około 26 dni. Bez dodatku glicerolu nasienie przeżywa w temp. +4°C około 17 dni. Powyżej 40% plemników o żywym ruchu postępowym znajdowało się w pierwszym rozrzedzalniku po upływie 25 dni, w drugim po 22, w trzecim zaś po 8 dniach. To znaczne przedłużenie czasu przeżywania nasienia w rozrzedzalnikach z glicerolem wskazuje, że również tą drogą można będzie uzyskać przedłużenie użyteczności nasienia. Według informacji prywatnych z Anglii, dotychczasowe spostrzeżenia wykazują, iż do 4 dnia użycia nie następuje spadek odsetek zacielen przy użyciu nasienia z dodatkiem glicerolu.

Dodatek substancji hamujących rozmnażanie drobnoustrojów

Już w roku 1946 Salisbury zalecał dodawanie sulfanilamidu w ilości 300 mg na 100 ml nasienia. W roku 1949 Almquist i równocześnie Mixner podali do wiadomości dane o korzystnym wpływie penicyliny samej, lub w kombinacji z sulfanilamidem, na zapłodnialność nasienia buhajów o obniżonej płodności. W roku 1950 Foote i Bratton wypróbowali z pomyslnym wynikiem kombinację następujących antybiotyków: sulfanilamidu, penicyliny, streptomycyny i polimyksyny. Również chloromycetyna (Weiss, 1953) wywiera działanie bakteriostatyczne w dawkach nie uszkadzających plemników. Natomiast takie antybiotyki jak aureomycyna, terramycyna, tetramycyna, erytromycyna i framecetyna są zabójcze dla plemników bądź w stężeniu nieszkodliwym dla drobnoustrojów, bądź w szkodliwym (Parez, Guillo 1958).

W większości krajów stosuje się w praktyce inseminacyjnej dodatek streptomycyny samej lub w kombinacji z penicyliną i sulfanilamidem. Zalecane dawki wynosiły do niedawna 1 mg streptomycyny i 1000 jednostek penicyliny na 1 ml rozrzedzalnika. Ostatnio jednak pojawiają się prace wskazujące, że wymieniona dawka antybiotyków nie jest obojętna dla żywotności plemników, w związku z czym radzi się obniżyć dodatek penicyliny do 500 jedn., a streptomycyny od 250 do 500 gamma na ml rozrzedzalnika (Eibl i wsp. 1955, Sakala 1957, Diliello i Poelma 1957, Parez i Guillo 1958).

Należy również wziąć pod uwagę fakt, iż korzystny lub niekorzystny wpływ „uznanych” antybiotyków może mieć związek z ich składem lub stopniem oczyszczenia. Wskazuje na to między innymi praca Sakali (1957), który, porównując wpływ tych samych antybiotyków ale wypro-

Tabela 2

Skład niektórych rozrzedzalników nasienia używanych w praktyce inseminacyjnej

	Nazwa	Autor	Skład buforu	Stosunek buforu do żółtka
1	Fosforanowo-żółtkowy	1939 Phillips i Hardy	$\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12 \text{H}_2\text{O} - 2,0 \text{ g} + \text{KH}_2\text{PO}_3 - 0,2 \text{ g}$ + aquae redest. ad 100,0	1 : 1
2	Cytrynianowo-żółtkowy	oryg. Salisbury, 1941	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5,5 \text{H}_2\text{O} - 4,76 \text{ g} + \text{aquae dest.}$ 100,0	1 : 1
2a	" "	mod. 1948	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2,2 \text{H}_2\text{O} - 2,9 \text{ g} +$ " " 100,0	1 : 1
2b	" "	Jaśkowski 1948	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5,5 \text{H}_2\text{O} - 3,54 \text{ g} +$ " " 100,0	1 : 1
3	Cytrynianowo-żółtkowy	Almquist 1951	jak wyżej	3 : 1
		Olds 1951		4 : 1
		Stewart 1950		4 : 1
		Holt 1950		3 : 1
4	Cytrynianowo-glikozo-żółtkowy	Miłowa- now 1950	Cytrynian sodu 1,4, glukoza 3,0, woda dest. 100	4 : 1
5	Cytrynianowo-żółtkowo-glicerolowy	Holt 1953	3,6% roztwór cytrynianu sodu + 8% glicer.	3 : 1
6	Solno-żółtkowy	Bishop 1955	NaCl 0,9 + roztwór	1 : 1
7	Dwuwęglanowo-żółtkowy	Kamp- schmidt 1951	Glikozy 5,0, dwuwęglan sodu 1,3, aquae 100,0	5 : 1
8	Glicynowo-żółtkowy	Roy-Bishop 1954	4,0% glicyna	1 : 1
9	Mleko chude	Melrose 1956	3,0% "	1 : 1
10	Mleko w proszku	Michajłow 1949	10—12% roztwór	9 : 1
11	Mleczno-żółtkowy	Thacker 1951	mleko chude gotowane	9 : 1
12	Mleczno-cytrynianowo-żółtkowy	Jacquet 1951	mleko chude $\frac{2}{8}$ buf. cytryn. $\frac{3}{8}$	5 : 3
13	Mleczno-żółtkowo-glicerolowy	Adler 1954	mleko chude 91,0 glicerol 9,0	9 : 1
14	Śmietanka	Sikes 1958	śmietanka gotowana o zawart. 9% tłuszczu	
		Adler 1956		

dukowanych przez różne wytwórnie, stwierdził, że produkt jednej wytwórni działał korzystnie, innej znacznie mniej korzystnie na czas przeżywania nasienia *in vitro* oraz jego zapładnialność. Również Roslanowski (1958) stwierdził, że penicylina produkcji polskiej wywiera niekorzystny wpływ na przeżywanie nasienia *in vitro*.

Na ogół u buhajów o nie obniżonej płodności, przy aseptycznym pobieraniu nasienia, dodatek antybiotyków wydaje się zbędny, gdyż, jak stwierdzają wszyscy wymienieni autorzy, nie wywiera on korzystnego wpływu na zapładnialność ich nasienia, a nawet ją lekko obniża.

* * *

Postęp dotyczący techniki konserwacji nasienia w temperaturze około 0°C (0 do 5°) polega głównie na udoskonaleniu rozrzedzalników do nasienia. Pozwoliły one podnieść ogólną zapładnialność z 60,5% w roku 1948 (Schultze i wsp.) do 69,1% tzw. nonreturnów (Salisbury 1957). Brak szczegółowych danych dotyczących zapładnialności nasienia glicerolizowanego przez więcej niż dwa dni nie pozwala na stawianie horoskopów na przyszłość.

Na podstawie dotychczasowych danych, metoda konserwacji w temp. około 0°C w idealnych warunkach technicznych (przechowywanie nasienia w chłodni) naraża na spadek zapładnialności nasienia na każdy dodatkowy dzień konserwacji o około 5 jednostek procentowych (Schultze). W naszych warunkach, w których źródłem obniżonej temperatury jest termos z lodem, ten korzystny spadek zapładnialności udaje się utrzymać do drugiego dnia konserwacji. W trzecim spadek zapładnialności wynosi 10, a nawet więcej jednostek procentowych (Jaśkowski 1958).

b. Zamrażanie nasienia

Metoda zamrażania nasienia stworzyła niewątpliwie nowe możliwości dla wyzyskania unasienniania dla celów hodowlanych. Jej głównym walorem jest utrzymanie niezmięnionej zdolności zapładniającej nasienia przez szereg miesięcy, a nawet lat. Umożliwia to indywidualny dobór partnerów hodowlanych nie tylko w skali krajowej, ale nawet międzynarodowej. I rzeczywiście w chwili obecnej międzynarodowa wymiana nasienia, po udanych doświadczeniach Van Rensburga i Rowson'a (1954), należy w krajach zachodnich do jednej z metod pozwalającej wyzyskiwać w całym świecie nasienie czołowych buhajów.

Proces zamrażania nie jest obojętny dla nasienia. Według spostrzeżeń wczesnych badaczy (Polge i in.) około 30 do 50% plemników żywych ginie od momentu pobrania do momentu zamrożenia do -79°C . O'Dell (1958), który szczegółowo prześledził proces powstawania strat w prze-

biegu procesów związanych z zamrażaniem, stwierdził, iż 5—10% plemników ginie w okresie od pobrania do zakończenia procesów przygotowawczych do mrożenia, w początkowej fazie zamrażania do momentu zamrożenia nasienia ginie około 6%, największa ilość plemników ginie w czasie obniżenia temperatury od -10 do -50° (ponad 15% plemników żywych), wreszcie około 3—5% plemników ginie w końcowej fazie zamrażania. Proces obumierania plemników nie kończy się w chwili zamrożenia nasienia. Według naszych spostrzeżeń, w ciągu 2 dni po zamrożeniu ginie dalszych 3—5% plemników żywych, a w ciągu 30 dni po zamrożeniu około 10% żywych plemników. Po upływie tego czasu proces zamierania plemników postępuje już bardzo nieznacznie.

Liczne modyfikacje oryginalnej metody Polge'a w zasadzie nie wiele przyczyniły się do zmniejszenia tych strat, jakkolwiek każde prawie doświadczenie wykazywało wyższość jednej metody w porównaniu z innymi porównywanymi. Ponieważ jednak trudno porównać równocześnie kilkanaście zalecanych metod, nie wiadomo, która jest rzeczywiście lepsza.

Toteż dane dotyczące optymalnej metodyki postępowania z nasieniem przed zamrożeniem i w czasie zamrażania różnią się między sobą czasami dość znacznie. Jeżeli chodzi o dodatek glicerolu, to niezależnie od indywidualnych właściwości buhaja zaleca się dodatek 6—10% glicerolu do rozrzedzalnika cytrynianowo-żółtkowego, lub 10—13% do rozrzedzalników mlecznych. Znacznie większe różnice poglądów zachodzą w sprawie czasu, przez który nasienie powinno być poddane działaniu glicerolu przed zamrożeniem. Najkrótszy, zalecony czas optymalny wynosi 30 minut, najdłuższy 18 godzin. Również co do sposobu dodawania glicerolu do nasienia istnieją sprzeczne poglądy oparte na wynikach doświadczeń. Tempo oziębiania przed zamrożeniem nasienia powinno wynosić $1/3^{\circ}/\text{min.}$, według innych $4-5^{\circ}/\text{min.}$; po zamrożeniu czyli osiągnięciu około -10°C od 1° do $12^{\circ}/\text{min}$ (Polge i Lovelock 1952; Parez i wsp. 1953; Craggle i wsp. 1955; Saroff i Mixner 1955; Miller i Van Demark 1954; Leidl i Rüsse 1956, De Groot 1952; Eibl i Zoder 1955; Biały i wsp. 1957; O'Dell i wsp. 1958; Olbrycht 1952; Zakrzewska 1958).

Nasienie pewnych buhajów zamraża się lepiej, innych zaś gorzej (Rowson i Polge 1953). Wiadomo również, że drugi ejakulat na ogół zamraża się lepiej niż pierwszy i że przyczyna tego leży nie w cechach osocza lecz plemników (Willet i Ohms 1958). Wiadomo również, że zapłodnialność mrożonego nasienia niektórych buhajów jest bardzo niska, mimo dobrej ruchliwości po rozmnożeniu (Rowson i Polge 1953; Jaśkowski 1958).

Fakt istnienia różnic indywidualnych we wrażliwości na glicerol oraz różnej zapłodnialności po rozmnożeniu wskazuje na to, że należałoby

proces zamrażania dostosować do indywidualnych właściwości poszczególnych buhajów.

Dotychczas bardzo dużo uwagi zwracano na proces zamrażania i przygotowania nasienia do zamrożenia, mniej natomiast czynnościom wstępnym, jak ochrona przed lekkimi udarami chłodowymi, tempo obniżenia metabolizmu plemników itp. Być może, że już w czynnościach wstępnych leży przyczyna wysokiej obumieralności plemników w czasie zamrażania.

Stosunkowo duże straty w ilości żywych plemników w czasie zamrażania nie pozwalają na zbyt silne rozrzedzanie nasienia przeznaczonego do zamrożenia. W pracach doświadczalnych stosowano dotychczas rozrzedzanie słabe lub średniego stopnia. Na ogół nie schodzono poniżej 30 milionów plemników na 1 ml (przy nasieniu przechowywanym w temp. 4°C obniżano zawartość w 1 ml do 8—12 milionów plemników na ml). Mimo to zapładnialność nasienia mrożonego była z reguły niższa niż nasienia nie mrożonego użytkowanego w dniu pobrania. Według Brattona i wsp. (1957) zapładnialność nasienia mrożonego równa się zapładnialności nasienia nie mrożonego użytkowanego między 24 a 36 godziną po pobraniu.

Dotychczasowe doświadczenia oparte na dostatecznie licznych materiale zdają się wskazywać, że z całą pewnością nie ma różnicy między zapładnialnością nasienia mrożonego użytego w trzy miesiące po zamrożeniu (Bratton) w porównaniu z nasieniem świeżo mrożonym. Wprawdzie istnieją doniesienia, wykazujące spadek zapładnialności i to stosunkowo duży (DeGroot i Handriksje 1954), należy jednak sądzić, że mogło to być wynikiem błędów konserwacji. Istnieją również doniesienia wykazujące, że nasienie mrożone zachowuje zdolność zapładniającą, równą wyjściowej przez 6 miesięcy, 1 rok, 2 i 3 lata (Rowson i Polge 1954, Mixner i Wiggins 1957a i b). W krajowych doświadczeniach uzyskaliśmy dobry odsetek zacieleń nasieniem przetrzymywanym przez 11 miesięcy. Doświadczenia nad użytkowaniem nasienia przechowywanego przez długi okres czasu są oparte na stosunkowo małym materiale i nie mówią ile w tym okresie ejakulatów odrzucono z dalszej konserwacji.

Między cechami nasienia przed i po rozmnożeniu a jego zdolnością zapładniającą istnieje bardzo słaba współzależność. Jednakże fakt, iż w ciągu pierwszych trzech miesięcy konserwacji nasienie nie traci wyjściowej zdolności zapładniającej, pozwala na biologiczne sprawdzenie płodności poszczególnych ejakulatów. Polegałaby ona na przeprowadzeniu 20—40 unasienień wkrótce po zamrożeniu i sprawdzeniu wyników tych unasienień w dwa miesiące później. W razie pomyślnego wyniku próby reszta nasienia w liczbie 150 do 250 porcji mogłaby bezpiecznie być użyta do dalszych unasienień.

Możność utrzymania przez szereg miesięcy niezmienionej zdolności zapładniającej nasienia można by wykorzystać do prac badawczych nad wpływem pór roku na płodność bydła. Mianowicie, przez użycie nasienia zakonserwowanego w „najpłodniejszych miesiącach” można by zbadać, jaki udział np. w przednówkowym obniżeniu płodności ma samica, jaki zaś samiec.

c. Lyofilizacja nasienia

Opanowanie techniki zamrażania nasienia przygotowało pole do prób nad dalszym usprawnieniem metod konserwacji nasienia, mianowicie do przechowywania go w stanie odwodnionym. Wyniki pierwszych doświadczeń nie były zachęcające. Schermanowi (1954, 1957) nie udało się ożywić lyofilizowanego nasienia ludzkiego i buhaja. Również Biały i wsp. (1957) stwierdzili, że przy próbach wysuszania plemniki buhaja giną z reguły po osiągnięciu przez nasienie 60—70% wysuszenia. Nieco lepsze wyniki osiągnął Leidl (1956a), któremu udało się ożywić bezpośrednio po zakończeniu wysuszenia nasienia buhaja na kilkanaście sekund (przy czym odsetek ruchliwych plemników był w nim nieduży).

Znacznie lepsze wyniki uzyskali Albright i wsp. (1958). Udało się im ożywić 5 ejakulatów na 8 zlyofilizowanych, przy czym w ożywionych ejakulatach około 10% plemników wykazywało wydatny ruch postępowy.

Najbardziej jednak rewelacyjne wyniki uzyskał Juszczenko (1957) w Związku Radzieckim. Zlyofilizował on nasienie 4 buhajów i 15 królików. Po okresie przechowywania, wynoszącym 18—20 miesięcy i rekonstrukcji rozrzedzalnika stwierdzał żywą ruchliwość około 15—20% plemników.

Plemnikami królika przechowywanymi w stanie zlyofilizowanym przez 30 do 40 dni unasienił 23 królice. 12 królic okociło się w normalnym terminie wydając na świat zdrowe i prawidłowo rozwinięte młode.

Doświadczenia te wykazują, że istnieje możliwość nie tylko ożywienia nasienia po wysuszeniu, ale również uzyskania normalnych zapłodnień, chodzi tylko o opracowanie metody, która by pozwalała uzyskać zapładnialność taką samą lub tylko nieznacznie niższą niż nasienia świeżego.

d. Konserwowanie nasienia w temperaturze zmiennej (pokojowej)

Przedłużenie życia plemników w temperaturach, w których procesy metaboliczne przebiegają dość żywo, można uzyskać albo przez dodawanie do nasienia ciał lub ich układów hamujących odwracalnie te

procesy, albo, jak to wykazały doświadczenia Walton'a i White'a (1956), przez usuwanie ze środowiska plemników produktów przemiany materii. Van Demark i wsp. (1958), zanurzwszy nie rozrzedzone nasienie buhaja, zamknięte w woreczku kolodowym, w odpowiednim stale zmienianym środowisku odżywczym potrafił przedłużyć jego życie siedmiokrotnie.

Należy przypuszczać, że, stosując równocześnie substancje obniżające metabolizm nasienia i dializę przepływową, można by wydatnie zbliżyć się do warunków konserwacji istniejących w przewodzie najądrza, w którym, jak to wykazały dawne już badania Kiryłowa i Morozowa (1936), plemniki potrafią żyć i zachowywać zdolność zapładniającą przez okres 4—8 tygodni.

Próby konserwacji nasienia w temperaturze powyżej 5°C (przeciętnie 15—30°C) podjęto stosunkowo niedawno. W roku 1956 Van Demark i Scharma podali pierwsze wyniki unasienniania nasieniem przechowywanym w temperaturze pokojowej w rozrzedzalniku nazwanym przez nich Illini Variable Temperature diluent, w którym rolę inhibitora metabolizmu odgrywał dwutlenek węgla i częściowo sulfanilamid, rolę zaś aktywatora dwuwęglan sodu. Willet i Ohms (1958) uzyskali dobrą przeżywalność nasienia w temperaturze pokojowej w rozrzedzalniku, w którym rolę inhibitora metabolizmu spełniał kwas mlekowy, aktywatora zaś — wodorotlenek sodu, który dodawano do nasienia po oznaczonym okresie konserwacji. Normanowi i wsp. (1958) udało się ożywić ruchliwość nasienia do 83% po 6 dniach trzymania w temperaturze pokojowej w rozrzedzalniku złożonym z równych ilości mleka kokosowego gotowanego i buforu złożonego z 4,32% roztworu cytrynianu sodu i 0,1% roztworu węglanu wapnia + antybiotyki. Ożywienie następowało po wymienieniu rozrzedzalnika lub po dodaniu węglanu wapnia.

Najlepiej opracowany w tej chwili i najłatwiejszy do zastosowania w praktyce inseminacyjnej jest rozrzedzalnik Illini. Rozrzedzalnik ten w swej pierwotnej postaci nie wykazywał jeszcze optymalnego składu. Wskazują na to zarówno nasze (Jaśkowski 1958) spostrzeżenia, jak i doniesienia Van Demark'a oraz Salisbury'ego i Van Demark'a z bieżącego roku. Tak np. z naszych badań wynika, że zmniejszenie antybiotyków polepsza warunki konserwacji nasienia. Van Demark stwierdził, że zwiększenie zawartości glikozy, żółtka i dwuwęglanu sodu oraz dodatek katalazy znacznie przedłuża okres przeżywania nasienia w rozrzedzalniku Illini.

Wyniki unasienniania nasieniem Illini były różne. W pierwszym doświadczeniu na małą skalę (Van Demark i Sharma 1957) wyniki były bardzo dobre, ale w doświadczeniu terenowym na większą skalę znacznie gorsze. Dunn (1958), przeprowadzając unasiennianie około 1000 krów w okresie letnim (upały), uzyskał zaledwie 38% zacieleń nasieniem Illini

w porównaniu z ponad 60% nasieniem kontrolnym, przy używaniu nasienia przez 6 dni. Wyraźny spadek płodności w doświadczeniu Dunn'a następował już w drugim dniu konserwacji. Równocześnie jednak McFee i wsp. (1958), używając nasienia Illini przez 4 dni po pobraniu, uzyskał wyniki bardzo dobre. W naszych doświadczeniach obejmujących ponad 2000 unasienień nasieniem Illini uzyskaliśmy również wyniki zupełnie dobre (ponad 60% zacielen przy użytkowaniu nasienia przez 4—5 dni). Również Stewart (1958) stwierdził, że nie ma różnicy między płodnością nasienia Illini przechowywanego przez 8 dni i przez 1 dzień (Stewart jednak przechowywał nasienie Illini w temp. pokojowej). Natomiast Bonadonna (1958), na podstawie zresztą bardzo nielicznych unasienień, stwierdził, że nasienie Illini mimo dobrej jakości *in vitro* nie posiada zdolności zapładniającej.

Wydaje się, że pierwsze wnioski Van Demark'a, mówiące o wysokim uniezależnieniu plemników trzymanyh w jego rozrzedzalniku od temperatury otoczenia, były przedwczesne. Zarówno spostrzeżenia *in vitro*, jak i doświadczenia terenowe wskazują na to, że w niższej temperaturze przeżywanie i zdolność zapładniająca nasienia utrzymują się dłużej, w wyższej krócej.

Ze względu na wielkie praktyczne znaczenie metod konserwacji nasienia w temperaturze pokojowej warto im poświęcić więcej uwagi w zakładach doświadczalnych.

Uwagi końcowe

Z krótkiego i stosunkowo pobieżnego przeglądu metod konserwacji nasienia wynika, że najlepsze dotychczas wyniki, jeżeli chodzi o procent zacielanych krów, uzyskiwano przy pomocy nasienia przechowywanego w temperaturze około 0° i użytkowanego w ciągu 48 godzin po pobraniu. Inne metody pozwalają wprawdzie na przedłużenie czasu przechowywania, jednak zapładnialność nasienia w ten sposób przechowywanego jest albo niższa, albo sprawdzona na zbyt małym materiale, aby można było mówić o jej wyraźnej wyższości nad metodami starymi.

Z punktu widzenia hodowlanego krótkie przechowywanie nasienia jest niepożądane, uniemożliwia bowiem, lub znacznie ogranicza pracę selekcyjną. Z tej przyczyny zamrażanie nasienia, mimo że daje nieco gorsze wyniki i jest droższe niż metody stare, znalazło dość powszechne zastosowanie w krajach zachodnich. Stąd zainteresowanie metodą Van Demark'a pozwalającą przedłużyć według opinii autora użyteczność nasienia do 7 dni.

Dla naszych warunków niewątpliwie metoda konserwacji w temperaturze pokojowej mogłaby być jedynym rozwiązaniem na najbliższą

przyszłość. Nie możemy bowiem liczyć na przedłużenie użyteczności nasienia przechowywanego w temp. około 0° przy pomocy dodatku glicerolu, ponieważ jedynym sprzętem konserwującym, dostępnym dla punktów, jest termos z lodem pozwalający utrzymać pożądaną temperaturę do 48 godzin.

Metoda konserwacji w stanie zamrożonym mogłaby być u nas stosowana w stacjach posiadających w pobliżu wytwórnię suchego lodu. Według Ehlera (1957) koszty unasienniania nasieniem mrożonym przy niezbyt wysokiej cenie suchego lodu układają się na tym samym poziomie co unasiennianie dotychczasowymi metodami, pod warunkiem, że większość lub wszystkie punkty zaopatrywane przez stację będą pracowały przy pomocy mrożonego nasienia.

Z metod przyszłości najbardziej praktyczną w użytkowaniu byłaby metoda lyofilizacji nasienia, ze względu na nieskomplikowane użytkowanie i przechowywanie nasienia w terenie oraz walory hodowlane tej metody.