

CZYNNIKI WYWIERAJĄCE WPLYW NA PŁODNOŚĆ NASIENIA
OGIERÓW KONSERWOWANEGO W CIEKŁYM AZOCIE

Marian Tischner, Józef Badura, Władysław Bielański

Instytut Stosowanej Fizjologii Zwierząt
Akademii Rolniczej w Krakowie

Pierwsze pozytywne próby inseminacji klaczy nasieniem mrożonym przeprowadzone w Japonii w 1964 r. [5], a następnie w innych krajach, stworzyły nowe możliwości praktycznego wykorzystania tej metody dla celów hodowlanych. Podjęto natychmiast próby wymiany nasienia ogierów na większe odległości, a także próby większego wykorzystania wartościowych ogierów przez gromadzenie od nich nasienia i unasienniania klaczy niezależnie od czasu i miejsca postoju ogierów lub klaczy [8].

Dzięki międzynarodowej wymianie nasienia mrożonego uzyskano potomstwo po wybitnych ogierach w NRD i ZSRR. Także w Polsce dzięki wymianie nasienia na większą odległość uzyskano wybitnego konia; klacz półkrwi angloarabskiej "Arabella", ur. w 1971 r., która w sezonie wyścigów 1974-1976, wygrała wszystkie gonitwy (6 wyścigów), łącznie z Derby koni półkrwi.

Równocześnie w licznych próbach inseminacji klaczy nasieniem mrożonym zarówno w Polsce, jak i w innych krajach uzyskiwano bardzo często nierówne wyniki, brak lub niski odsetek zarzębień [9]. Ważnym zadaniem stało się zatem ustalenie przyczyn obniżenia płodności klaczy unasiennianych nasieniem mrożonym i dalsze usprawnienie metody konserwacji nasienia.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na nasieniu 36 ogierów, kilku ras, w wieku 4-14 lat. Spośród nich 31 stanowiło własność państwowych stad ogierów i były używane do krycia klaczy na punktach kopulacyjnych, natomiast 5 pozostałych ogierów stanowiło własność Akademii Rolniczej i były używane do doświadczeń nad konserwacją nasienia. Wszystkie ogiery, tak pod względem ogólnego stanu zdrowia, jak i płodności nie budziły żadnych zastrzeżeń.

Zamrażanie nasienia

Nasienie zamrażano według zmodyfikowanej [3] metody Naumienko^v i Romanko^{va} [6]. Nasienie od ogierów pobierano przy użyciu sztucznej pochwy typu „otwartego” [2]. Do mrożenia pobierano tylko frakcję bogatą w plemniki, na którą składały się pierwsze 3-4 wyrzuty ejakulatu.

Zamrażanie nasienia przeprowadzano w parach ciekłego azotu w aluminiowych tubach, które umieszczano na metalowej siatce, położonej na płytce styropianowej 1 cm nad powierzchnią ciek-

łego azotu, na okres 8-9 minut, po czym nasienie zanurzano w ciekłym azocie. Pływak styropianowy dostosowano tak do obciążenia tubami, aby zapewniał stałą odległość nasienia od powierzchni ciekłego azotu. Nasienie przechowywano w ciekłym azocie od kilku godzin do kilku miesięcy. Rozmrażanie nasienia przeprowadzano przez zanurzenie tuby z nasieniem w łaźni wodnej o temperaturze 313 K przez okres 50s, lekko poruszając tubą w wodzie.

Przeżywanie nasienia

Po rozmrożeniu nasienia badano jego czas przeżywania w temperaturze 274 K i wyliczano wskaźnik przeżywania nasienia według Parchupina i Skatkina [7]. W tym celu po rozmrożeniu nasienie przechowywano w lodówce o temp. 274 K i kontrolowano ruchliwość plemników co 24 lub 48 godzin, aż do dnia całkowitego zaniku ruchliwości plemników.

Unasiennianie klaczy

Do unasienniania klaczy używano nasienie zawierające po rozmrożeniu co najmniej 30-40% plemników ruchliwych i około $300 \cdot 10^6$ plemników żywych w jednej dawce. Zabiegi unasienniania przeprowadzono na klaczach znajdujących się pod stałą kontrolą rui i stanu jajników. Unasiennianie klaczy rozpoczęto przy stwierdzeniu pęcherzyka Graafa w stadium F_{3-4} i powtarzano co 24 godziny, aż do stwierdzenia badaniem rektalnym owulacji. Po rozmrożeniu nasienia wprowadzano je natych-

miast do macicy klaczy przy użyciu strzykawki połączonej z pipetą plastikową o długości około 50 cm.

Kontrola zapłodnień

Zdolność zapładniająca nasienia pięciu ogierów badano na podstawie liczby uzyskanych zarodków z macicy w 7-9 dniu po owulacji. Do tego celu użyto 20 klaczy, różnych ras, w wieku od 3-9 lat. Na klaczach tych w sezonie rozrodowym 1978 i 1979 przeprowadzano systematyczne zabiegi unasienniania nasieniem mrożonym oraz kontrolnie nasieniem świeżym. Zarodki uzyskiwano z rogu macicy metodą niechirurgiczną według Allena i Rowsona [1] w modyfikacji Tischnera i Bielańskiego [10].

Kontrola wyźrebień klaczy unasiennianych nasieniem mrożonym

Kontrolę zażrebień, przebiegu ciąży i wyźrebień przeprowadzano na 34 klaczach, w wieku 3-20 lat, różnych ras, z których 15 stanowiło własność Akademii Rolniczej, a pozostałe 19 klaczy było własnością prywatnych właścicieli, którzy doprowadzili klacze do punktu unasienniania.

WYNIKI

Rokowanie o przydatności nasienia ogierów do konserwacji w ciekłym azocie

Zamrożono około 230 ejakulatów pozyskanych zarówno przed sezonem rozrodowym (grudzień), jak i po sezonie (lipiec) od 36

ogierów. Po rozmrożeniu nasienia okazało się, że nie od wszystkich ogierów nasienie znosi jednakowo proces zamrażania i rozmrażania. Ze względu na jakość nasienia po rozmrożeniu podzielono ogiery na 3 grupy.

Grupa A - o zadowalającej zamrażalności nasienia. W tej grupie ogierów ruchliwość plemników po rozmrożeniu wynosiła powyżej 40%, czas przeżywania nasienia w temperaturze 274 K powyżej 12-13 dni oraz współczynnik przeżywania powyżej 40. Do tej grupy należało tylko 20% badanych ogierów.

Grupa B - o średniej zamrażalności nasienia. Ruchliwość plemników po rozmrożeniu wahała się od 20 do 40%, czas przeżywania w temp. 274 K - 9-12 dni, a współczynnik przeżywania nasienia 20-40. W tej grupie znalazło się około 60% ogierów.

Grupa C - o niedostatecznej zamrażalności nasienia. U tych ogierów ruchliwość nasienia po rozmrożeniu nie przekraczała 20%, czas przeżywania plemników w temp. 274 K - 5 dni oraz współczynnik przeżywania 20. W tej grupie było około 20% ogierów.

Nie zaobserwowano żadnej zależności pomiędzy ruchliwością plemników przed zamrożeniem a po zamrożeniu. Nasienie około 80% ogierów wykazywało podobne właściwości zarówno przed, jak i po sezonie. Cecha wrażliwości nasienia na proces konserwacji w ciekłym azocie okazała się właściwością indywidualną ogierów nie związaną z sezonem.

Wyniki unasiennień

Nasieniem mrożonym od pięciu ogierów unasienniono klacze w 45 cyklach, uzyskując 15 zarodków (33%). W kontrolnych unasienn-

nianiach i płukaniach macicy, przeprowadzonych nasieniem nie mrożonym tych samych ogierów, na tych samych klaczach, w 46 cyklach uzyskano 28 zarodków, tj. 61%. Wyniki te wskazują, że konserwacja nasienia w ciekłym azocie wywarła niekorzystny wpływ na zdolność zapładniająca nasienia, przez co uzyskano mniejszą liczbę zarodków po inseminacji klaczy nasieniem mrożonym. Jednak na podstawie bliższej analizy okazało się, że zdecydowanie mniejszą liczbę zarodków uzyskano po nasieniu mrożonym od 2 ogierów, natomiast liczba uzyskanych zarodków od pozostałych 3 ogierów była prawie taka sama jak po nasieniu nie mrożonym.

Uzyskane zarodki, zarówno po nasieniu świeżym, jak i mrożonym, znajdowały się w fazie blastocysty i pod względem morfologicznym nie wykazały żadnych odchyłeń od normy. Wielkość ich była uzależniona od wieku, np. 6-7-dniowe zarodki były wielkości od 112 do 324 μ , 7-8-dniowe od 260 do 820 μ . Większą zmienność w wielkości zarodków obserwowano w przypadku użycia do inseminacji nasienia mrożonego.

Wyźrebienia

Od 3 ogierów zgromadzono w okresie jednego miesiąca (grudzień) 215 porcji nasienia. Nasienie to używano następnie do inseminacji w okresie sezonu. Ogółem w roku 1978-1979 unasienniono nasieniem mrożonym 34 klacze w 37 cyklach. Zaźrebiło się 20 klaczy (58%). Po normalnym okresie ciąży 18 klaczy urodziło źrebięta, których rozwój przebiegał normalnie, natomiast 2 kla-

cze urodziły bliźnięta w 7 i 11 miesiącu ciąży, które padły wkrótce po urodzeniu.

Uzyskane wyniki unasiennień i wyźrebiania klaczy wskazują na możliwość praktycznego zastosowania mrożonego nasienia w szerokiej praktyce hodowlanej. Użycie nasienia mrożonego winno być jednak poprzedzone szczegółową kontrolą jego wrażliwości na proces zamrażania i rozmrażania.

DYSKUSJA

Ocena nasienia mrożonego jest trudna i często zawodna. Test przeżywania nasienia ogierów w temperaturze 311 K okazał się zupełnie niemiarodajny; również dobra ruchliwość plemników po rozmrożeniu nie gwarantuje dobrej płodności nasienia. Ocena nasienia na podstawie próby przeżywania w temperaturze 274 K okazała się bardziej przydatna i pozwoliła lepiej zróżnicować właściwości nasienia. Jeszcze bardziej obiektywną oceną okazał się test biologiczny, polegający na kontrolnym unasiennianiu klaczy i ocenie morfologicznej uzyskanych zarodków. Nie zaobserwowano, aby ten rodzaj zabiegu wywierał korzystny wpływ na dalszy przebieg reprodukcji klaczy [10].

Obecnie pierwszy raz uzyskano wyniki wyźrebian (58%) klaczy unasiennianych nasieniem mrożonym takie, jakie uzyskuje się przy naturalnym kryciu klaczy. Na ten rezultat złożyło się kilka czynników. Przede wszystkim wybór i selekcja ogierów pod względem wrażliwości ich nasienia na proces konserwacji w ciekłym azocie, kontrola rozwoju pęcherzyków Graafa inseminowa-

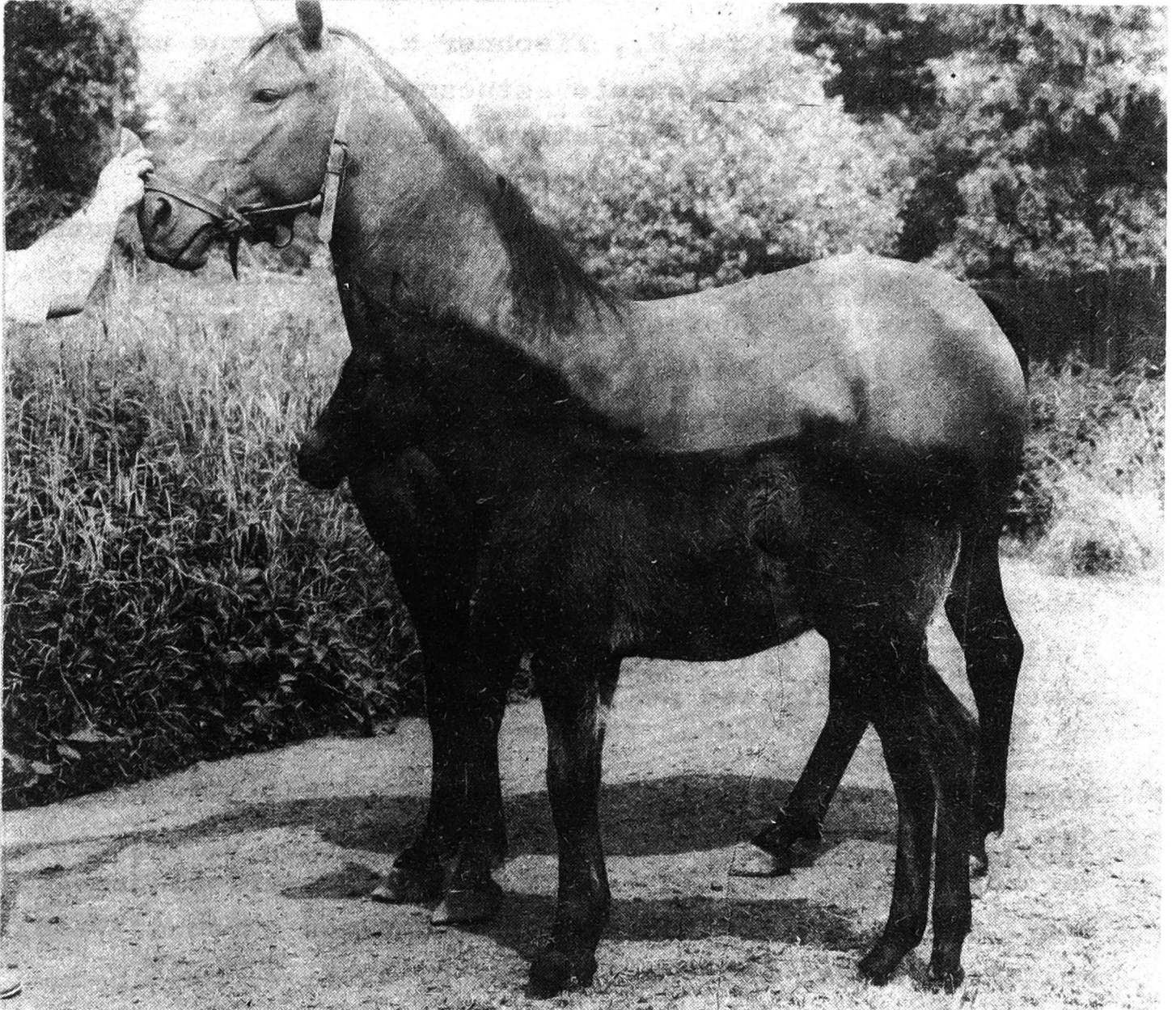
nych klaczy oraz przestrzeganie zasady, aby okres pomiędzy inseminacją a owulacją był jak najkrótszy. Wykorzystując znany fakt, że u większości klaczy do owulacji dochodzi w godzinach nocnych, przeprowadzano zabieg unasienniania w godzinach popołudniowych, co w znacznym stopniu skróciło okres pomiędzy inseminacją a owulacją.

Sztuczne unasiennianie klaczy nasieniem mrożonym stwarza duże perspektywy do doskonalenia hodowli koni. Z reguły jeden ejakulat ogiera wystarcza do skutecznego unasienniania kilka lub kilkanaście klaczy. Jednak prawdziwa rezerwa nasienia powstaje w okresie pomiędzy sezonami (7-8 miesięcy), kiedy to ogiery nie są użytkowane rozplodowo. Nasze obserwacje potwierdzają wcześniejsze spostrzeżenia, że w tym okresie ogiery mogą oddawać pełnowartościowe i całkowicie przydatne (rysunek) nasienie do długotrwałej konserwacji w ciekłym azocie.

W okresie sezonu ogiery zostały przekazane na punkty kopulacyjne, gdzie były następnie z powodzeniem używane do krycia naturalnego klaczy.

Przeprowadzone porównanie efektu konserwacji nasienia w ciekłym azocie mrożonego w formie kulek, w ampułkach plastikowych i tubach [4] wykazało najwyższą przydatność tub aluminiowych. Nasienie mrożone w tubach przeżywało najdłużej po rozmrożeniu w porównaniu do pozostałych opakowań. Tuby aluminiowe okazały się również praktyczne ze względu na przygotowanie dawki inseminacyjnej, bez potrzeby dodatkowych czynności po rozmrożeniu, z łatwością można je sterylizować i trwale znakować co ma istotne znaczenie dla zabezpieczenia przed ewentualnymi pomyłkami. Opisany sposób zamrażania nasienia, a także

rozmrężania, w znacznym stopniu uprościł technikę unasienniania, dzięki czemu zabieg może być wykonywany praktycznie w każdych warunkach terenowych.



Klacz prywatnego hodowcy ze źrebięciem urodzonym w 1979 r., po zamrożonym nasieniu ogiera „Halicz” rasy śląskiej. Nasienie zamrożono poza sezonem rozrodczym w 1977 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Allen W.R., Rowson L.E.A.: Surgical and non-surgical egg transfer in horses. *J.Reprod.Fert.Suppl.* 23, 525-530, 1975.
2. Bielański W., Kosiniak K., Tischner M.: Sztuczne unasiennianie koni. V. Zastosowanie sztucznej pochwy typu „otwartego” (Kraków - 72) dla uzyskiwania rozdzielonego nasienia od ogierów. *Medycyna Wet.* 31, 537-540, 1975.
3. Bielański W., Tischner M.: Technika sztucznego unasienniania koni nasieniem płynnym i zamrożonym. Instrukcja wdrożeniowa Instytutu Zootechniki, Kraków, 1-32, 1979.
4. Komornicki P.: Porównanie efektu konserwacji w ciekłym azocie nasienia ogierów mrożonego w kulkach, tubach aluminiowych i ampulkach plastikowych. Praca magisterska, AR Kraków 1977.
5. Nagase H., Soejima A., Niwa T., Oshida H., Sagara Y., Ishizaki N., Hoski S.: Studies on the freezing storage of stallion semen. I. Fertility results of stallion frozen semen in concentrated pellet form. *Jap. J. Anim. Prod.* 12, 48-51, 1966.
6. Naumienko V A., Romanko Va N.: Rozbavitiel semiena. *Koniovodstvo i konnyj sport.* 5, 33, 1970.
7. Parchupin G.W., Skatkin P.N.: Zawisimost zażrieblajemosti kobył ot pieriezivajemosti spermatozoidow zerebca. *Vstn. seljskolw. Nauki Životn.* 2, 154-159, 1940.
8. Tischner M.: Międzynarodowe sympozjum z zakresu biologii rozmnażania koni. *Koń Pol.* 3, 40-41, 1978.
9. Tischner M.: Results of artificial insemination of horses in Poland in the post-war period. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23, 111-114, 1975.
10. Tischner M., Bielański A.: Wpływ wypłukiwania zarodków metodą niechirurgiczną na poziom progesteronu i cykl rujowy klaczy. *Medycyna Wet.* 8, 494-498, 1979.

M. Tischner, J. Badura, W. Bielański

FACTORS INFLUENCING THE FERTILIZING ABILITY OF STALLION
SEMEN PRESERVED IN LIQUID NITROGEN

S u m m a r y

The Causes of differences in fertility between fresh and frozen stallion semen were investigated; moreover further improvements of freezing of stallion semen were introduced. The examination of 36 stallions showed that freezability of their semen was an individual character of the stallion. The semen of 20% of stallions outlived well and 60% of them satisfactory the freezing and thawing process; 20% of stallions, in spite of good quality, produced semen unsuitable for insemination after thawing. The individual sensibility of stallion semen to freezing process was confirmed by the estimation of embryos recovered from the uterus of inseminated mares 7-9 days following ovulation. Considerably less embryos were recovered from mares inseminated with the semen of 2 stallions, than from mares mated naturally. The fertility of the remaining 3 stallions was roughly similar, both with frozen and fresh semen.

From some stallions the semen was collected in the period between 2 reproductive seasons and preserved in liquid nitrogen. Thirty four mares inseminated with it in 37 cycles,

gave birth to 20 (58%) foals. The obtained results and the simplification of freezing and thawing process make possible a broader use in practice of the frozen stallion semen, provided that stallions are selected for freezability of their semen.

М.Тишнер, Ю.Бадура, **В.Беляньски**

Факторы оказывающие влияние на плодовитость семени жеребцов консервированного в жидком азоте

Резюме

Исследовали причину разниц в плодовитости между семенем свежим и консервированным в жидком азоте и введением дальнейших улучшений в технике замораживания семени жеребцов. Исследуя семя от 36 жеребцов установлено, что чувствительность семени к технике консервирования в жидком азоте является свойством индивидуальным жеребцов. Семя от 20% жеребцов хорошо выносило процесс замораживания и оттаивания, от 60% жеребцов - удовлетворительно, тогда как остальные 20% жеребцов, помимо их природной плодовитости, не было пригодным для осеменения. Индивидуальная чувствительность семени жеребцов к технике замораживания и оттаивания была подтверждена также в оценке выполосканных эмбрионов из матки кобылы на 7-ой-9-ый день после овуляции. От замороженного семени двух жеребцов было получено гораздо меньше эмбрионов, чем от их свежего семени. Плодовитость остальных трех контролируемых жеребцов была примерно одинаковой как от замороженного так и от свежего семени.

От нескольких жеребцов собирали семя в период между сезонами, а затем, после держания в течение нескольких месяцев в жидком азоте, осеменяли этим семенем 34 кобылы в 57 циклах. Выжеребилось 20 кобыл (58%). Полученные результаты выжеребки, а также улучшение методов замораживания и оттаивания семени позволяют более широко использовать замороженное семя в животноводческой практике, с условием проведения ранней селекции жеребцов на замораживаемость семени.