

THE TECHNOLOGY ELABORATION FOR REPRODUCTIVE CAPACITY IMPROVEMENT OF THE MINKS

Gonchar O.; Cherkassy experimental station of fur farming

This article highlights the experimental research results on the mink estrus cycle identification during heat. The new technology was elaborated for the mating period & estrus detection. The vaginal mucus was tested by the electron- microscopic analysis. Epithelial cell number proved to be the top in the mucus samples. The peeling process activation occurs during the intermediate pro-estrus stage & met-estrus onset. The determinant factor enables to define the optimal time for mink mating.

Key words: mink, heat, electron-microscopic analysis, vaginal mucus

УДК 636.2.082.463.5

ШЛЯХИ ПІДВИЩЕННЯ ЗАПЛІДНЮВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ СІМ'Я БУГАЇВ-ПЛІДНИКІВ

Рецензенти: доктор біол.наук, професор Бугров О.Д.; ст.наук.співр. Тищенко І.В.

О.Ф. Гончар

Черкаський інститут агропромислового виробництва

Викладені результати досліджень впливу кількісних і якісних показників сперми на здатність до кріообробки та впливу технології обробки на показники заморожено-розмороженої сперми. Вивчено запліднювальну здатність сперми бугаїв-плідників при різних методах технологічної обробки. Сім'я кріоконсервоване за технологією „Мінітюб" має кращі показники в порівнянні з відкритою гранулою. Встановлений статистично достовірний вплив технології обробки сперми (показник сили впливу на рівні 51 %, $p=0,018$) на результати її запліднювальної здатності.

Ключові слова: бугаї-плідники, технологічна лінія, сперма, порода.

Відомо, що кожен день неплідності корови - це втрата 3 кг молока і 300 гр. м'яса. У середньому у 40 % корів сервіс період становить більше 4-6 місяців, а загальна сума збитків від одного перегулу, починаючи з 60 дня, становить 300-320 грн. на 1 голову за місяць, а кожен місяць утримання незаплідненої телиці, після 18-місячного віку підвищує вартість її вирощування до переведення в групу корів на 5-6 % і знижує продуктивність до 8-річного використання на 11-12 [1-5].

Проблема відтворення поголів'я великої рогатої худоби на даний момент займає чільне місце серед головних завдань скотарства. Тому якість спермопродукції, яка використовується при осіменінні самиць, повинна забезпечити максимальний запліднювальний результат. Це можна забезпечити у процесі технологічної обробки сперми, головною метою якого є збереження основних характеристик сперматозоїдів нативного сім'я. В Україні на сьогодні існує декілька технологій кріоконсервації спермопродукції, але недостатньо вивчені кількісні показники атипових форм сперматозоїдів у спермодозі при різних технологіях глибокого заморожування.

У державному стандарті обумовлена кількість патологічно змінених форм сперматозоїдів в одній дозі, але недостатньо вивчений вплив таких форм, у межах допустимих державним стандартом, на відтворювальну здатність корів.

Детальне вивчення цієї проблеми дасть змогу розробити рекомендації щодо зменшення впливу патологічно змінених форм сперматозоїдів на запліднювальну здатність корів.

Матеріали та методи досліджень. Сім'я, одержане від двох груп бугаїв-плідників, було технологічно оброблене та глибоко заморожене відповідно за двома технологіями: „Мінітюб" та необлицьовані гранули. Дослідження сперматозоїдів проводилося відразу після еякуляції та процесу кріоконсервації. Визначено ряд якісних та кількісних показників сперми, та досліджено вплив якості сперми на здатність до кріообробки та вплив технології на показники заморожено-розмороженої сперми.

Вплив показників спермопродуктивності на подальші процеси кріоконсервації вивчали на поголів'ї бугаїв-плідників ВАТ НЕЮ „Прогрес" протягом року.

Наступний етап роботи включав відбір трьох серій кріоконсервованого сім'я різних за кількістю патологічно змінених форм сперматозоїдів (від 1 до 18 %) та осіменіння ним трьох груп корів. З метою виключення впливу кваліфікації техніка штучного осіменіння роботу проводили в умовах одного господарства.

Дослідні тварини знаходили в умовах однакового утримання й годівлі.

Обчислення даних проводили за методами математичної статистики на ПЕОМ з використанням розроблених Черкаським інститутом агропромислового виробництва програм за алгоритмами Н.А. Плохинського [6].

Результати досліджень. Всього було досліджено 401 еякулят, з них не придатними до наступної технологічної обробки були 20 – (5 %), внаслідок низької концентрації статевих клітин в одиниці об'єму та низької рухливості сперматозоїдів нативної сперми (табл.1). Основна маса вибракуваної сперми припадає на літній період, що співпадає з результатами ряду дослідників [2-4]. У

подальшому серед еякулятів, які направлені на технологічну обробку, 21 еякулят (5,5 %) було вибракувано внаслідок зниження рухливості сперматозоїдів після процесу заморожування більшою частиною це були еякуляти з досить високою концентрацією статевих клітин в одиниці об'єму - 1,2 млрд/мл і вище.

1. Вплив рівня концентрації статевих клітин в еякулятах на їх вибракування

Рівень концентрації	Вибракуваних еякулятів	
	кількість	%
Низька (0,7-0,8 млрд/мл)	5	23,8
Середня (0,81-1,19 млрд/мл)	2	9,5
Висока (1,2 і вище)	14	66,7

Із наведеного матеріалу видно, що з підвищенням концентрації сперматозоїдів показники кріоконсервованої сперми погіршуються. Так концентрація сперматозоїдів у вибракуваних еякулятах була статистично вищою в порівнянні з тими, які використовували для осіменіння корів ($p=0,0005$). Тому на станціях по отриманню спермопродукції від бугаїв-плідників у Нідерландах практикують триразове взяття сперми методом дублетної садки, у зв'язку з чим середній рівень концентрації гамет у нативній спермі становить близько 0,85-1,0 млрд/мл. На нашу думку підвищення відсотка відходу еякулятів з високою концентрацією пов'язане з досить значним перепадом осмотичного тиску при розбавленні такої сперми в 5 разів і вище, тоді як у спермі з середньою та низькою концентрацією не відбувається таких різких коливань осмотичного тиску за рахунок прилиття незначної кількості розріджувача, з яким може справитися буферна система плазми сперми.

Інші кількісні характеристики спермопродуктивності не мали значного впливу на процеси подальшого технологічного оброблення.

Однією з якісних характеристик, які мають безпосередній вплив на запліднювальну здатність сперми, є морфологічний статус сперматозоїдів. При використанні бугаїв для природного парування кількість анормальних сперматозоїдів в еякуляті відіграє, як правило, другорядну роль. Але при використанні сперми для штучного осіменіння підвищення кількості анормальних спермійів спричинює зниження запліднюваності. Не дивлячись на невеликий відсоток патологічних спермійів, існує кореляція між цим показником та запліднювальною здатністю сперми [10].

Морфологічні дослідження сперми показали, що у нативних еякулятах голштинських плідників кількість змінених форм нижча ніж у сименталів (табл.2).

2. Морфологічні показники нативної сперми ($M \pm m$)

Порода	Кількість еякулятів	Відсоток патологічних форм	% клітин із порушенням конденсації хроматину
Симентальська	127	9,89 $\pm$ 0,41	8,56 $\pm$ 0,42
Голштинська	660	9,24 $\pm$ 0,16	7,89 $\pm$ 0,29

Дещо вищий відсоток патологічних форм сперматозоїдів у симентальських плідників пов'язаний зі збільшенням кількості тварин, у яких виявлені порушення спермійів у ділянці шийки на 5 % та головки і форм із цитоплазматичною краплею на 1 %.

Проведений дисперсійний аналіз сили впливу морфологічних характеристик на показники подальшого технологічного оброблення виявився незначним (менше 1 %) і статистично недостовірним. Тому допустима в межах норми кількість патологічно-змінених форм не впливає на якість сперми після процесів заморожування-розморожування. У процесі кріоконсервації частина клітин зазнає руйнування внаслідок дії низьких температур, але ці пошкодження більше позначаються на рухливості сперматозоїдів, тоді як із морфологічних характеристик збільшується кількість клітин, у яких спостерігається відрив хвостика в ділянці шийки та скручування хвостика.

У наших дослідженнях спостерігалось незначне та недостовірне зниження кількості патологічних форм сперматозоїдів у заморожено-розмороженій фракції (на 0,3 %; $n = 401$). Можливою причиною цього є значне розрідження нативної сперми (у середньому в 3-5 разів). Коефіцієнт кореляції між кількістю морфологічно змінених форм спермійів у нативній та кріоконсервованій спермі становив $r = +0,4$ ($p < 0,001$).

Хроматиновий статус сперматозоїдів пов'язаний зі станом конденсації хроматину, що є критерієм визначення нормальної функції сперматозоїдів при тестуванні батьківського геному. Конденсація хроматину відіграє особливу роль при формуванні головки сперматозоїдів [7, 9]. Цей процес проходить у головці придатка сім'яника і не змінюється при подальшому проходженні у статевих шляхах [8]. Оскільки основною речовиною в головці сперматозоїда є хроматин, то його кількість і стан визначають форму головки, що узгоджується з думкою ряду авторів [7, 9-10], які відзначали, що зміни розміру та форми спермія значною мірою пов'язані з перекомпактизацією в ньому хроматину, тоді як зміни загального вмісту ДНК не мають зв'язку з морфологічними характеристиками сперматозоїдів [7-8].

Залежність морфологічних характеристик від інших кількісних показників сперми вивчали методом кореляційного аналізу. Так, встановлений від'ємний

зв'язок концентрації сперматозоїдів у одиниці об'єму з кількістю патологічних форм $r = -0,24$ ($p < 0,001$) та клітин із „незрілим” хроматином $r = -0,14$ ($p < 0,05$) відповідно. Вплив об'єму на морфологічні показники сперматозоїдів був незначний: $r = -0,09$ ($p < 0,05$) на кількість патологічних форм та $r = -0,06$ ($p < 0,1$) - для клітин із "незрілим" хроматином.

Головним показником якості кріоконсервованої сперми залишається рухливість сперматозоїдів після процесу розморожування. У роботах ряду авторів [6, 8-9] зроблений висновок, що кількість рухливих сперматозоїдів на одне осіменіння має найвищу кореляцію зі запліднювальною здатністю ($r = 0,56$). Але активність розмороженого сім'я значною мірою залежить від технології обробки та температурного режиму під час кріоконсервації.

Кріогенне оброблення сперми проводили за двома технологічними методами - у вигляді відкритих гранул, із використанням лактозо-гліцериново-жовткового розчинника, та в пастах „Мінітюб” зі застосуванням розчинника „Триладил”. Всього було досліджено 401 еякулят, із них заморожених у формі паст було лише 13 відсотків. Незначна кількість еякулятів, заморожених у цій формі, пов'язана з тим, що її застосовували для сперми від бугаїв-плідників, перевірених за якістю потомства і середній вік яких становив 7-9 років, тоді як у формі відкритої гранули - для сперми в основному від молодих тварин - 3-5 років та незначна кількість - від дорослих плідників (табл. 3).

3. Вплив технології обробки сперми на її характеристики після розморожування

Технологія обробки	Кількість еякулятів	% вибракуваних еякулятів до заморожування	% вибракуваних еякулятів після заморожування	Рухливість після розморожування
Відкрита гранула	350	1,7	5,4	4,3
Паста	51	-	3,8	4,8

Матеріали досліджень вказують на кращі показники кріоконсервованого сім'я за технологією „Мінітюб”, у порівнянні з відкритою гранулою. Вибракуваних еякулятів при розбавленні сперми розріджувачем „Триладил” не було. На нашу думку це пов'язане з наявністю в складі цього розріджувача N-трис (гідроксиметил), який виконує функції буферної речовини, що запобігає різким коливанням осмолярності розчину та гідрофобному удару клітин. Крім того фруктоза, яка присутня в „Триладилі”, краще забезпечує потребу клітин в енергетичних сполуках, ніж дисахариди - зокрема лактоза, яку застосовували при приготуванні розчинника для фасування в гранулах. Цим можна пояснити і кращу рухливість сперматозоїдів у відталій спермі після заморожування в пастах, ніж у формі відкритої гранули.

Застосування різних технологічних методик певною мірою впливало і на відсоток браку еякулятів після процедури заморожування. Так при заморожуванні у формі паст відхід спостерігався на рівні 3,8 %, що на 1,6 відсотка нижче ніж при застосуванні іншої методики. На нашу думку, зниження кількості вибракуваних еякулятів пов'язане з чіткою регуляцією температурного режиму заморожування, що досягається використанням програмної заморожувальної машини фірми „Мінітюб”. Більше того, збільшення площі заморожуваної поверхні при застосуванні паст сприяло одночасному зниженню температури в усьому об'ємі

рідини від +4 °С до -105 °С, тоді як у гранулі ці процеси проходять поступово. Це запобігало процесам кристалізації води з утворенням кристалів, які травмують плазматичні мембрани клітин, спричинюючи їх загибель.

Наступним етапом роботи було вивчення впливу технології обробки на морфологічні характеристики статевих клітин під час процедури кріоконсервації. Використовуючи різні технологічні схеми кріогенної обробки сперми встановлено (табл.4) зниження кількості аномальних форм клітин у спермі, замороженій у формі паст. Це відбувається за рахунок зниження кількості клітин з цитоплазматичною краплиною.

4. Залежність морфологічної характеристики кріоконсервованої сперми від технологічної обробки ($M \pm m$)

Технологічна обробка	Кількість еякулятів	Відсоток патологічних форм		Коефіцієнт кореляції (r)
		у нативній спермі	у кріоконсервованій спермі	
Відкрита гранула	350	9,74 $\pm$ 0,21	9,76 $\pm$ 0,22	0,44 $\pm$ 0,04
Паєта	51	8,12 $\pm$ 0,65	5,55 $\pm$ 0,51	0,24 $\pm$ 0,13

Дослідження запліднювальної здатності сперми вказують на те, що у бугаїв-плідників німецької селекції спостерігається досить значне варіювання запліднювальної здатності, на відміну від плідників канадської селекції (табл. 5).

5. Запліднювальна здатність сперми бугаїв-плідників

у відсотках

Кличка	Походження	Запліднювальна здатність ($M \pm m$)	Коефіцієнт варіації
Роман	Німеччина	66,6 $\pm$ 7,4	19,2
Тумпі	Німеччина	69,3 $\pm$ 5,8	14,5
Бовак	Німеччина	66,0 $\pm$ 6,0	12,5
Сенсацій	Канада	68,0 $\pm$ 5,6	8,31
Леопольд	Канада	74,0 $\pm$ 2,0	3,82

Результати досліджень свідчать про вищий рівень селекції канадської худоби за показниками запліднювальної здатності у порівнянні з німецькою. Однак, значної і вірогідної різниці між бугаями за запліднювальною здатністю їх сперми не встановлено.

Наступним етапом роботи було вивчення впливу різної технологічного оброблення сперми на її запліднювальну здатність (табл. 6).

6. Запліднювальна здатність сперматозоїдів залежно від технологічного оброблення

Технологічна обробка	$M \pm m$	C_v
Відкрита гранула	65,12 $\pm$ 2,59	11,27
Паєта	76,03 $\pm$ 1,63	4,29

Дещо вищий коефіцієнт варіації запліднювальної здатності в масиві тварин, яких осіменили спермою, яку заморожували у вигляді відкритої гранули ми

пояснюємо невідповідністю умов при проведенні заморожування клітин, тоді як при фасуванні у вигляді паєт процес заморожування контролюється програмним заморожувачем.

Провівши однофакторний дисперсійний аналіз з метою вивчення впливу технологічного оброблення на результати запліднювальної здатності сперми в умовах господарств отримали показник сили впливу на рівні 51 % (при $p=0,018$). Це вказує на наявність статистично достовірного впливу технології обробки сперми на результати її запліднювальної здатності.

Висновки:

1.3 підвищенням концентрації сперматозоїдів в еякуляті якісні показники кріоконсервованої сперми погіршуються.

2. Допустима в межах норми кількість патологічно-змінених форм сперматозоїдів не впливає на якість сперми після процесів заморожування-розморожування.

3. Встановлено зворотній зв'язок між концентрацією сперматозоїдів у одиниці об'єму і кількістю патологічних форм ($r = -0,24$; $P<0,001$) та з кількістю клітин з "незрілим" хроматином ($r = -0,14$; $P<0,05$).

4. Сім'я, кріоконсервоване за технологією „Мінітюб", має кращі показники в порівнянні з відкритою гранулою. Так, при заморожуванні спермодоз у формі паєт відхід вибракуваних еякулятів спостерігався на 1,6 відсотка нижчий ніж при кріоконсервації у відкритих гранулах. При глибокому заморожуванні сім'я у формі паєт спостерігається зниження кількості патологічно-змінених форм статевих клітин. Доведена наявність статистично-достовірного впливу технології обробки сперми на результати її запліднювальної здатності.

Бібліографічний список

1. Антонюк В.С. Биотехнические способы повышения эффективности оплодотворения сельскохозяйственных животных /Антонюк В.С. – Минск: Урожай, 1988. – 198 с.
2. Исаченко Е.Ф. Изменение биологических параметров спермы человека в зависимости от сезона года /Исаченко Е.Ф., Крамар М.И. // Материалы IV Всесоюзного съезда урологов 10-12 октября 1990 года. – Москва, 1991. – 273 с.
3. Кононов В.П. Половая активность быков по сезонам года /Кононов В.П., Дьякевич О.Н. // Зоотехния, 1997. - №5. – С. 20-22.
4. Савкин В.А. Изменения интерьерных показателей и качества семени у быков по сезонам года /Савкин В.А., Решетов А.И. //Животноводство. – 1984. - №12. - С. 44-45.
5. Шергин Н.П. Биохимия сперматозоидов сельскохозяйственных животных /Шергин Н.П. - Москва: Колос, 1967. – 239 с.
6. Плохинский Н.А. Руководство по биометрии для зоотехников /Плохинский Н.А. - Москва: Колос, 1969.- 256 с.
7. Gledhill B.L. Changes in dioxyribonucleoprotein during spermatogenesis in the bull: increased $[H_3]$ actinomycin d binding to nuclear chromatin of morphologically abnormal spermatozoa /Gledhill B.L. et all. //Reprod. And Fert. – 1971. – 26, №1. – P. 25-38.
8. Redi C.A. The organization of the inactive chromatin of mouse sperm /Redi C.A., et all // Cell Biol. Int. Repts. – 1986. – 10, №3. – P. 193.
9. Sheubeck M. Zur Chromatincondensation bei der spermiogeneze /Sheubeck M., Sinowatts E., Wrobel R.H. // Anat. Anz. – 1984. – 156. – S. 311-312.



10. Sperm morphology and fertility in A.L. bulls / [Soderquist L., Janson L., Larson K., Einarson S.]. // Vet. Med. A. – 1991. – 38, №7. – P. 534-543.

ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ОПЛОДОТВОРЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СЕМЕНИ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Гончар О.Ф., Черкасский институт агропромышленного производства

Изложены результаты исследований влияния количественных и качественных показателей спермы на способность к криообработке и влияния технологии обработки на показатели заморожено-размороженной спермы. Изучена оплодотворяющая способность спермы быков-производителей при разных методах технологической обработки. Сперма, криоконсервированная по технологии „Минитюб“, имеет лучшие показатели в сравнении с открытой гранулой. Установлено статистически достоверное влияние технологии обработки спермы (показатель силы влияния на уровне 51 %, $p=0,018$) на результаты ее оплодотворяющей способности.

Ключевые слова: быки-производители, порода, технологическая линия, сперма, криобанк.

FERTILIZING CAPACITY BOOST OF THE SERVICING BULL SEMEN

Gonchar O., Cherkassy institute of agricultural production

This article highlights the experimental research results on qualitative & quantitative characteristics of the bull semen. The freezing and thawing method was applied. The technique impact on semen characteristics was investigated. Semen ability to freezing processing was studied. Fertilizing capacity of the servicing bull semen was researched by the various insemination procedures. Frozen semen characteristics were improved by the 'Mini-tube' technology application. Comparative analysis was executed by the open pellet use. Significance test was fulfilled by the insemination procedure. Confidence coefficient equals $p=0,018$. The insemination procedure impact on fertilizing capacity of the servicing bull semen was identified. Confidence level amounts 51%.

Key words: servicing bulls, breed, technological line, sperm, test data on freezing preservation.