

Н. И. Малмаков, д.с.-х.н., **К. П. Хамзин**, к.с.-х.н.,
К. М. Сейитпан, к.с.-х.н., **В. А. Спиваков**, к.с.-х.н.

Казахский НИИ животноводства и кормопроизводства
Филиал «НИИ овцеводства»

РЕЗУЛЬТАТЫ ЯГНЕНИЯ ОВЕЦ ПОСЛЕ ВНУТРИМАТОЧНОГО ОСЕМЕНЕНИЯ ЗАМОРОЖЕННОЙ СПЕРМОЙ

Определено влияние породы барана и времени искусственного (лапароскопического) осеменения на результаты ягнения. Эксперимент доказал, что с дозами осеменения 0,07 и 0,10 мл оттаянной спермы на овцу, содержащими примерно 16×10^6 и 24×10^6 подвижных сперматозоидов, обьягнилось 44,8% (125/279) и 45,5% (10/22) овцематок. В расчете на одну соломинку замороженной спермы объемом 0,25 мл получено в среднем 1,54 и 1,0 ягнят соответственно. В 8 хозяйствах из 301 овцематки с естественной половой охотой, внутриматочно осемененных замороженной спермой в случной сезон, обьягнилось 135 особей (44,9%).

Ключевые слова: внутриматочное осеменение, замороженная сперма, ягнение, овцы.



Төлдету нәтижесіне аталық тұқымының және қолдан ұрықтандыру уақытының нақты әсері болатыны анықталды. Әр қойға құрамында шамамен 16×10^6 және 24×10^6 қозғалмалы шөуеттері бар 0,07 және 0,10 мл ерітілген ұрық дозамиен ұрықтанған аналықтардың 44,8% (125/279) және 45,5% (10/22) төлдейтінін эксперимент дәлелдеді. Көлемі 0,25 мл қатырылған ұрық түтікшесіне есептегенде орташа тиісінше 1,54 және 1,0 қозы алынды. 8 шаруашылықта шағылысу маусымында қатырылған ұрықпен жатыр ішінде ұрықтанған 301 аналықтың 135 (44,9%) төлдеді.

Түйінді сөздер: жатыр ішінде ұрықтандыру, қатырылған ұрық, төлдеу, қойлар.



It was found a significant effect of breed sheep and artificial time (laparoscopic) insemination on results of lambing. The experiment proved that insemination with doses of 0.07 and 0.10 ml of thawed semen on sheep containing approximately 16×10^6 and 24×10^6 motile sperm, lambed 44.8% (125/279) and 45.5% (10/22) ewes. PER frozen semen straw 0.25 ml was obtained on average 1.54 and 1.0, respectively lambs. In 8 of 301 farms ewes with natural estrus, intrauterine insemination with frozen semen in the breeding season, lambed 135 (44.9%). **Key words:** intrauterine insemination, frozen semen, lambing, sheep.

Искусственное осеменение (ИО) является ценным инструментом селекционных программ по генетическому улучшению животных. Оно обеспечивает точную генетическую оценку, позволяет быстро получать большое количество потомков от лучших производителей и в то же время контролировать распространение болезней, передающихся половым путем. Эффективность ИО увеличивается благодаря использованию метода криоконсервации спермы. Хорошо известно, что значительный прогресс в молочном скотоводстве был достигнут благодаря ИО замороженной спермой быков, проверенных по качеству потомства и улучшающих наследственные признаки. Согласно данным Lohuis [1], генетический прирост при вольной случке составляет 0%, при использовании ИО – 0,5%, при использовании ИО в сочетании с проверкой производителей по качеству потомства – 2,0% в год.

В овцеводстве криоконсервация спермы используется в ограниченных масштабах из-за низкой оплодотворяемости овец после цервикального осеменения замороженной спермой. Известные специалисты в области животноводства, такие, как Evans и Maxwell [2], пишут, что в настоящее время эффективное использование замороженной спермы барана возможно только с помощью лапароскопического осеменения (ЛО). Согласно расчетам Maxwell [3] спермой, замороженной за один год от одного барана, лапароскопически можно осеменить 25 тыс. маток и получить 12 тыс. ягнят.

Замороженная сперма после оттаивания имеет слабую жизнеспособность по сравнению со свежеполученной, поэтому ЛО выполняют незадолго до овуляции ооцита. Точное определение времени начала охоты и оптимального времени ЛО овец в полевых условиях Evans, Maxwell считают проблематичным и рекомендуют синхронизировать половую охоту, делая предсказуемым время овуляции, и осеменять через 60-66 ч после удаления пессариев.

Стоимость синхронизации эструса у овец с помощью пессариев и гонадотропинов за рубежом составляет примерно 6 дол. В Казахстане синхронизация эструса в случной сезон для выполнения ЛО является более затратной и трудоемкой, чем выявление овец в охоте с помощью баранов-пробников. Ведь на каждую овцу на пессарий и гонадотропин затрачивается 900 тенге (6 дол.). Кроме того, каждую овцу необходимо найти в отаре и поймать три раза, чтобы: 1) ввести пессарий, 2) через 12 дней удалить пессарий и инъектировать гонадотропин; 3) осеменить через 60-66 ч после удаления пессария.

В обзоре Salamon, Maxwell [4] имеется множество сообщений о результатах ягнения после ЛО замороженной спермой овец с синхронизированной охотой и лишь единичные сообщения о результатах ягнения после ЛО овец с естественной охотой: 80% (4/5; Takenaka et al. [5]) и 42-53% (Azzarini, Villedor [6, 7]). Также, по некоторым данным Nam et al. [8], в Аргентине для ЛО замороженной спермой овец с естественной охотой, выявляли 2 раза в день и осеменяли через 12 ч после выборки. К сожалению, лапароскопическое осеменение замороженной спермой овец с естественной охотой остается пока мало изученным.

Эксперимент по лапароскопическому осеменению был проведен в 8 хозяйствах Алматинской и Жамбылской областей осенью 2012 г. Использовали овец (n=301) в возрасте 1,5-5 лет, в том числе 163 казахских тонкорунных (КТ), 54 казахских мясо-шерстных

(МШК), 78 полутонкорунных мясных типа гемпшир и 6 южноказахских мериносов.

Сперма баранов полипей № 825, суффольк № 102 и суффольк № 937 была предоставлена университетом Висконсин-Мадисон (США), а сперма баранов гемпшир, дорсет, тексель и южноафриканский мясной меринос (ЮАММ) куплена у Animal Breeding Services LTD (Новая Зеландия). Сперма была заморожена в соломинках объемом 0,25мл в концентрации 100×10^6 подвижных сперматозоидов на соломинку. Соломинки оттаивали в водяной бане при 38-39^oC в течение 20с. Трех или двух овец осеменяли содержимым одной соломинки (0,07 или 0,10мл на овцу соответственно) в течение 15 мин. после оттаивания.

С помощью однократной выборки в сутки (утром с 6 до 7ч), и двукратной в сутки (утром с 6 до 7 и вечером с 17 до 18ч) выявлены 265 и 36 овцематок с естественной половой охотой. ЛО выполняли с модификацией с 9 до 20ч согласно Evans, Maxwell [2]. Под лапароскопическим наблюдением хирургическим пинцетом (Aescular®, EA20) рог матки фиксировали возле маточно-трубного соединения, извлекали наружу через разрез длиной 1 см с правой стороны от белой линии и осеменяли шприцем объемом 1 мл с инъекционной иглой 22-го калибра. Рог матки опускали в тазовую полость, затем аналогично извлекали и осеменяли второй рог. Объягнившимися считались овцы с окотом через 137-152 дня после ЛО. Анализ данных выполнен с помощью Microsoft Excel Analysis ToolPak.

Согласно данным табл.1, всего в 8 хозяйствах после ЛО замороженной спермой объягнилось 44,9% (135/301) овец. Результаты ягнения овец различались между хозяйствами: «Батай-Шу» и «Маржан» (61,7 и 21,7% соответственно, $P=0,0009$), «Батай-Шу» и «Манзор» (61,7 и 22,2%, $P=0,0005$), «Батай-Шу» и «Коктем» (61,7 и 32,6%, $P=0,003$), «Алаколь-Агро» и «Маржан» (55,1 и 21,7%, $P=0,007$), «Алаколь-Агро» и «Манзор» (55,1 и 22,2%, $P=0,005$),

«Алаколь-Агро» и «Коктем» (55,1 и 32,6%, $P=0,03$), «Мадина» и «Маржан» (50,0 и 21,7%, $P=0,03$), «Мадина» и «Манзор» (50,0 и 22,2%, $P=0,02$).

Таблица 1

Влияние хозяйства на количество обьягнившихся овец после лапароскопического осеменения замороженной спермой

| Хозяйство | Осемено- но овец, ед. | Обьягнилось овец | | Получено ягнят, ед. | В том числе | |
|----------------|-----------------------------|------------------|---------------------|------------------------|----------------------|--------------|
| | | п | % | | баранчи- ков, ед. | ярок, ед. |
| «Мадина» | 38 | 19 | 50,0 ^c | 22 | 9 | 13 |
| «Бултбек» | 30 | 13 | 43,3 | 17 | 11 | 6 |
| «Коктем» | 46 | 15 | 32,6 ^b | 15 | 6 | 9 |
| «Манзор» | 27 | 6 | 22,2 ^{b,d} | 7 | 6 | 1 |
| «Маржан» | 23 | 5 | 21,7 ^{b,d} | 6 | 1 | 5 |
| «Батай-Шу» | 60 | 37 | 61,7 ^a | 44 | 21 | 23 |
| «Антиген» | 28 | 13 | 46,4 | 16 | 6 | 10 |
| «Алаколь-Агро» | 49 | 27 | 55,1 ^a | 27 | 15 | 12 |
| Итого: | 301 | 135 | 44,9 | 154 | 75 | 79 |

^{a,b,c,d} Разница между значениями с разными буквами в одном столбце статистически достоверна: а и b $P<0,01$, с и d $P<0,05$.

Данные табл.2 показывают, что более высокую оплодотворяющую способность имела сперма баранов ЮАММ и дорсет ($P<0,01$), тексель и полипей ($P<0,05$) по сравнению со спермой двух баранов американский суффольк №102 и №937. Слабая оплодотворяющая способность спермы баранов суффольк стала причиной низких результатов, полученных в хозяйствах «Манзор», «Маржан» и «Коктем» (табл. 1).

Таблица 2

Влияние баранов на количество объегнившихся овец после лапароскопического осеменения замороженной спермой

| Порода и номер барана | Осеменено овец, ед. | Объегнилось овец | | Получено ягнят, ед. | Многоплодность |
|-----------------------|---------------------|------------------|-------------------|---------------------|----------------|
| | | п | % | | |
| Гемпшир | 21 | 8 | 38,1 | 8 | 1,00 |
| Суффольк 102 | 34 | 8 | 23,5 ^b | 9 | 1,13 |
| Суффольк 937 | 41 | 10 | 24,4 ^b | 11 | 1,10 |
| Дорсет | 98 | 52 | 53,1 ^a | 64 | 1,23 |
| Тексель | 44 | 22 | 50,0 ^a | 26 | 1,18 |
| ЮАММ | 51 | 28 | 54,9 ^a | 29 | 1,04 |
| Полипей | 12 | 7 | 58,3 ^a | 7 | 1,00 |

^{a,b}Разница между значениями с разными буквами в одном столбце статистически достоверна ($P < 0,05$).

Согласно данным табл.3, двукратная выборка овец в охоте в сутки с осеменением в среднем через 14ч после выборки не имела преимуществ по сравнению с однократной утренней выборкой и осеменением в течение дня, когда объегнилось 41,7% (15/36) и 45,3% (120/265) овец соответственно ($P = 0,68$).

Таблица 3

Влияние частоты выборки овец в охоте на количество объегнившихся овец после лапароскопического осеменения замороженной спермой

| Частота выборки овец в охоте | Осеменено овец, ед. | Объегнилось овец | | Получено ягнят, ед. | Многоплодность |
|--------------------------------|---------------------|------------------|------|---------------------|----------------|
| | | п | % | | |
| 1 раз в сутки утром | 265 | 120 | 45,3 | 135 | 1,13 |
| 2 раза в сутки утром и вечером | 36 | 15 | 41,7 | 19 | 1,27 |

Согласно данным табл. 4, примерно равная доля овец объегнилась с дозами осеменения 0,07 и 0,10мл спермы на овцу (44,8 и 45,5% соответственно). Однако с меньшей дозой, в расчете на одну соломинку спермы объемом 0,25 мл, получено больше ягнят, чем с большей дозой: $1,54 \pm 0,11$ и $1,00 \pm 0,28$ соответственно при недостоверной разнице ($P=0,097$).

Таблица 4

Влияние дозы осеменения на количество объегнившихся овец и на количество ягнят, рожденных в расчете на ягнение и на соломинку спермы объемом 0,25 мл

| Доза спермы, мл | Осемено-но овец, ед. | Объегнилось овец | | Получе-но ягнят, ед. | Количество ягнят на: | |
|-----------------|----------------------|------------------|------|----------------------|----------------------|-------------------|
| | | п | % | | ягнение | соломинку 0,25 мл |
| 0,1 | 22 | 10 | 45,5 | 11 | $1,10 \pm 0,11$ | $1,00 \pm 0,28$ |
| 0,07 | 279 | 125 | 44,8 | 143 | $1,14 \pm 0,03$ | $1,54 \pm 0,11$ |
| Всего: | 301 | 135 | 44,9 | 154 | $1,14 \pm 0,03$ | $1,48 \pm 0,10$ |

Овцематки в возрасте 1,5-5лет имели примерно одинаковую оплодотворяемость и многоплодность после ЛО замороженной спермой, составившую в среднем 44,9% и 1,14ягнят/ягнение, хотя оплодотворяемость овцематок в возрасте 3,5года имела тенденцию быть выше, чем у ярок в возрасте 1,5года: 50,6% (40/79) и 27,3% (6/22) соответственно ($P=0,052$).

Данные табл. 5 показывают, что достоверно больше овец объегнилось после осеменения с 9 до 10ч, чем после осеменения с 12 до 13ч: 61,5% (16/26) и 34,7% (17/49) соответственно ($P<0,05$).

Согласно данным эксперимента, после лапароскопического осеменения овец с естественной половой охотой в среднем, объегнилось 44,9% (135/301), что соответствует результатам, полученным с синхронизированными исследователями на овцах

Таблица 5

**Влияние времени осеменения на число
объегнившихся овец после лапароскопического
осеменения замороженной спермой**

| Время осеменения | Осемено-но овец, ед. | Объегнилось овец | | Получено ягнят | Много-плод-ность |
|------------------|----------------------|------------------|-------------------|----------------|------------------|
| | | n | % | | |
| 09:00-10:00 | 26 | 16 | 61,5 ^a | 21 | 1,31 |
| 10:01-11:00 | 41 | 16 | 39,0 | 17 | 1,06 |
| 11:01-12:00 | 51 | 21 | 41,2 | 25 | 1,19 |
| 12:01-13:00 | 49 | 17 | 34,7 ^b | 18 | 1,06 |
| 13:01-14:00 | 17 | 10 | 58,8 | 11 | 1,10 |
| 14:01-15:00 | 25 | 12 | 48,0 | 14 | 1,17 |
| 15:01-16:00 | 38 | 19 | 50,0 | 21 | 1,11 |
| 16:01-17:00 | 18 | 9 | 50,0 | 10 | 1,11 |
| 17:01-18:00 | 17 | 7 | 41,2 | 8 | 1,14 |
| 18:01-19:00 | 12 | 6 | 50,0 | 7 | 1,17 |
| 19:01-20:00 | 7 | 2 | 28,6 | 2 | 1,00 |

^{a,b}Разница между значениями с разными буквами в одном столбце статистически достоверна ($P < 0,05$).

(Мороз с соавт. [9] – 51,8% (975/1881); Naqvi et al. [10] – 44,4% (28/63); Anel et al. [11] – 47,5% (33140/69768); Fukui et al. [12] – 56,0% (56/100)) и естественным эструсом (Azzarini, Valledor [6, 7] – 42-53%).

Обнаружены различия в оплодотворяющей способности спермы от разных баранов после внутриматочного осеменения, что согласуется с выводами Eppleston, Maxwell [13], Perkins et al. [14] и Anel et al. [15]. После ЛО спермой двух баранов американский суффолк объегнилось меньше овцематок, чем после ЛО спермой баранов ЮАММ и дорсет ($P < 0,01$), тексель и полипей ($P < 0,05$).

Рекомендуемая минимальная доза ЛО составила 20×10^6 подвижных сперматозоидов [2]. Для сравнения Salamon et al. и Maxwell [16, 17] получили 57,8% (26/45) ягнений и 38,8% (33/85) ягнений с половиной этой дозы, а de Graaf et al. [18] получили 48,6% ягнений с дозой ЛО – 15×10^6 .

В исследовании, проведенном в 2010-2011 гг. [19], наблюдались примерно равные результаты ягнения после ЛО доз 0,07 и 0,10 мл оттаянной спермы на овцу, содержащими 16×10^6 и 24×10^6 подвижных клеток. Тогда объягнилось 55,8 и 47,7% овец ($P=0,11$), и достоверно больше ягнят, произведенных в расчете на соломинку спермы объемом 0,25 мл с меньшей дозой ($2,10 \pm 0,14$ и $1,34 \pm 0,10$ соответственно, $P < 0,001$).

Анализ данных ягнения подтверждает наблюдения предыдущего эксперимента:

- с дозами 0,07 и 0,10 мл оттаянной спермы на овцу объягнилось равное количество животных, составившее 44,8 и 45,5% соответственно;
- с меньшей дозой в расчете на одну соломинку спермы объемом 0,25 мл произведено больше ягнят, чем с большей дозой: $1,54 \pm 0,11$ и $1,00 \pm 0,28$.

Разница между этими значениями незначительна вследствие небольшого числа животных в группе с дозой 0,10 мл ($n=22$).

Обнаружена достаточно низкая оплодотворяемость у овец, осемененных с 12 до 13ч дня. Тогда как в предыдущем эксперименте низкая оплодотворяемость была при осеменении с 13 до 14ч дня [19]. Таким образом, есть основание предполагать, что у некоторой части овец, половая охота которых началась накануне утром, в более поздний период происходит овуляция. Согласно данным Maxwell [17] и Walker et al. [20] осеменение во время овуляции или очень близко к овуляции дает низкую оплодотворяемость, особенно с нашим методом ЛО, в котором извлечение наружу рогов матки может нарушить маршрут овулировавшей яйцеклетки из фолликула в яйцевод.

Выводы

Анализ экспериментальных данных подтверждает, что в случайной сезон овец с естественной половой охотой можно успешно осеменять замороженной спермой с помощью лапароскопа. Уменьшение дозы осеменения с 0,10 до 0,07 мл, что соответствует осеменению содержимым одной соломинки двух и трех овец, может увеличить количество осемененных овец и количество ягнят, полученных в расчете на одну соломинку спермы объемом 0,25 мл.

Литература

1 *Lohuis M. M.* Potential benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programs // *Theriogenology* 1995, 43: 51-60.

2 *Evans G., Maxwell W. M. C.* Salamon's artificial insemination of sheep and goats // Sydney Butterworths; 1987.

3 *Maxwell W. M. C.* Current problems and future potential of artificial insemination programmes. In: D. R. Lindsay and D. T. Pearce (Editors), *Reproduction in Sheep*. Australian Academy of Science and Australian Wool Corporation, Canberra 1984: 291-298.

4 *Salamon S., Maxwell W. M. C.* Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement // *Anim Reprod Sci* 1995; 38: 1-36.

5 *Takenaka S., Fukui Y., Ono H.* Intrauterine insemination with frozen semen in the ewe using a laparoscope // *Jpn. J Anim Reprod*, 1985; 31: 25-27.

6 *Azzarini M., Valledor F.* Inseminacion intrauterina con semen congelado en ovejas // *Bol Tec Ovinos Lanac* 1987; 16: 7-14.

7 *Azzarini M., Valledor F.* Inseminacion intrauterina o cervical con semen congelado o fresco en ovejas en celo natural // *Prod Ovina* 1988; 1: 1-8.

8 Ham A., Ramos G., Brogliatti G. M. Laparoscopic intrauterine insemination of Merino sheep in Patagonia // *Theriogenology* 2000; 53: 199.

9 Мороз В. А., Бурдуковская Т. К., Рабочев В. К., Айбазов М. М., Мамытов Г. А., Пурвис И., Максвелл Ч., Осборн Д., Вильсон Г., Моор П. Результаты первого этапа австрало-российского эксперимента // *Овцеводство*. – 1993. – №3. – С. 10-14.

10 Naqvi S. M. K., Joshi A., Das G. K., Mittal J. P. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience // *Small Rumin Res* 2001, 39: 199-208.

11 Anel L., de Paz P., Alvarez M., Chamorro C. A., Boixo J. C., Manso A., Gonzalez M., Kaabi M., Anel E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen // *Theriogenology* 2003; 60: 1293-1308.

12 Fukui Y., Kohno H., Okabe K., Katsuki S., Yoshizawa M., Togari T., Watanabe H. Factors affecting the fertility of ewes after intrauterine insemination with frozen-thawed semen during the non-breeding season // *J Reprod Dev* 2010, 56: 460-466.

13 Eppleston J., Maxwell W. M. C. Sources of variation in the reproductive performance of ewes inseminated with frozen-thawed ram semen by laparoscopy // *Theriogenology* 1995; 43: 777-788.

14 Perkins N. R., Hill J. R., Pedrana R. G. Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine horns without regard to ovulation site in synchronized merino ewes // *Theriogenology* 1996; 46: 541-545.

15 Anel L., Kaabi M., Abroug B., Alvarez M., Anel E., Boixo J. C., de la Fuente LF, de Paz P. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in Churra ewes: a field assay // *Theriogenology* 2005; 63: 1235-1247.

16 Salamon S., Maxwell W. M. C and Evans G. Fertility of ram semen frozen-stored for 16 years // *Proc Aust Soc Reprod Biol* 1985; 17: 62.

17 Maxwell W. M. C. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. 1. Effect of time of onset

of oestrus, ovulation and insemination on fertility // *Anim Reprod Sci* 1986, 10: 301-308.

18 *de Graaf S. P., Evans G., Maxwell W. M. C., Cran D. G., O'Brien J. K.* Birth of offspring of pre-determined sex after artificial insemination of frozen-thawed, sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa // *Theriogenology* 2007; 67: 391-398.

19 *Малмаков Н. И., Сейітпан К., Хамзин К. П., Сливақов В. А.* Қойларды мұздатылған ұрықпен лапароскопиялық ұрықтандырудың нәтижелеріне кейбір факторлардың әсері // *Жаршы.* – 2013. – №6.

20 *Walker S. K., Smith D. H., Frensham A., Ashman R. J., Seamark R. F.* The use of synthetic gonadotrophin releasing hormone treatment in the collection of sheep embryos // *Theriogenology* 1989, 31: 741-752.