

17515

УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ имени ПАТРИСА ЛУМУМБЫ  
Сельскохозяйственный факультет

*На правах рукописи*

ДЖАЯНТ ХОНМОДЕ

# ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОВ СОХРАНЕНИЯ И ОБРАБОТКИ СЕМЕНИ БАРАНОВ

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители—  
Академик ВАСХНИЛ проф. В. К. Милованов (ВИЖ),

проф. И. М. Кузнецов и проф. П. В. Кугенев

Москва—1965

# Отзыв - Осуждение

Работа выполнена в отделе биологии размножения сельскохозяйственных животных ВИЖ'а и в научно-исследовательском институте животноводства степных районов Украинской ССР им. М. Ф. Изидова Аскания-Нова.

Сельскохозяйственный факультет УДН им. П. Лумумбы направляет Вам автореферат диссертации Джаянта Хонмоде на тему «Исследование методов сохранения и обработки семени баранов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Просим ознакомиться с авторефератом и Ваши отзывы прислать в Ученый Совет УДН.

*Ученый секретарь Ученого совета УДН*  
*доцент А. А. ЗАСУХИН*

Защита состоится в Ученом совете сельскохозяйственного факультета . . . . . мая 1965 г.

Адрес Университета: Москва В-302, 5-й Донской проезд, 7.

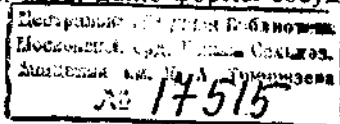
## Цели и задачи работы

Успешное развитие высокопродуктивного животноводства в современных условиях немыслимо без искусственного осеменения. Применение этого метода сыграло особенно важную роль в развитии овцеводства в СССР. Советский Союз был первой страной, где применили искусственное осеменение овец в очень широком масштабе. С помощью этого прогрессивного метода удалось за сравнительно короткий срок превратить отсталое грубошерстное овцеводство в высокопродуктивное тонкорунное и полутонкорунное и вывести многие породы овец.

Нельзя без помощи искусственного осеменения и в Индии за короткий срок провести такие преобразования, как в овцеводстве СССР. Изучить опыт СССР преобразования грубошерстного овцеводства в тонкорунное, методы искусственного осеменения овец для дальнейшего использования этого опыта в условиях Индии — главная цель работы.

Одним из главных условий внедрения искусственного осеменения является возможность хранения и перевозки семени. В последние годы были проведены опыты сохранения семени быков при плюсовых температурах, но таких опытов на семени барана было сделано мало. Нашей целью было изучить такие методы хранения семени барана, которые способствовали бы внедрению искусственного осеменения в жарких странах и в том числе в Индии, где трудно хранить семя при пониженных температурах, используя натуральный или сухой лед.

Открытие принципа обратной кислотной инактивации живчиков Павловым и Кржижковским (1927), Миловановым и Хабибулиным (1933) послужило основой практического применения этого метода хранения семени. Вандемарк и Шарма (1957) насыщали среду  $\text{CO}_2$  газом и сохранили семя быка при комнатной температуре. Но в этом методе оказалось много технологических трудностей. В зависимости от температуры, давления газа, даже формы сосуда, его укупор-



ки и времени, затраченного на всю процедуру, получаются разные результаты (Милованов, Сытина, Кулешова, 1958).

Шаннон (1960) исследовал влияние разных органических кислот на семя быка.

Используя принцип обратной кислотной инактивации живчиков, при плюсовых температурах, мы исследовали влияние различных карбоновых кислот жирного ряда, с целью найти самую благоприятную для нашей цели кислоту, которая способствовала бы сохранению семени барана по принципу кислотной обратной инактивации. Изыскать кислоту, отвечающую этим требованиям, включить ее в среду для хранения семени барана с последующим осеменением овец и учетом развития получаемого потомства, так же является одной из основных задач данной работы.

Используя преимущество угольной кислоты, в 1961 году Миловановым и Сытиной был предложен бикарбонат-фосфатный метод ВИЖа для хранения семени быка при комнатной температуре. Мы решили разработать, следуя этим же принципам, бикарбонат-фосфатную среду для хранения семени барана при комнатной температуре и проверить в производственных условиях.

Есть наблюдения о том, что в семени сельскохозяйственных животных при хранении появляется перекись водорода, которая вредна для живчиков и эмбриона (Эванс, 1941) и об устранении этого вредного влияния при добавлении в среду каталазы — Гунтер (1907), Лярдн и Филипс (1941), Маклод (1943), Тошнч и Уолтон (1946), Тошнч (1947), Вандемарк (1957), Норман и Гольдберг (1959), Фуг (1962).

Мы решили исследовать, какую роль играет добавление каталазы в синтетическую среду для сохранения семени барана в лаборатории, затем провести опыты по осеменению овец таким семенем с учетом оплодотворяемости и развития получаемого потомства.

Хотя существуют разные мнения о том, сколько живчиков нужно для нормального оплодотворения или какую самую экономическую дозу семени надо применять, ясно, что большое разбавление семени, без снижения оплодотворяемости и жизнеспособности приплода, дало бы значительный экономический эффект путем использования наиболее выдающихся производителей.

Однако эякулят барана все еще разбавляют только в 2—3 раза, хотя эякулят быка можно разбавить 20—50—100 раз и больше. Возможность добавления в среду загустителей, как поливиниловый спирт, без ухудшения оплодотворяемости семени и снижения вязкости семени и среды, была доказана исследователями—Милованов и др. (1937), Со-

коловская и др. (1960—1961), Сахно (1961), Нур эль дин (1963).

Мы решили использовать поливинилловый спирт для возможности многократного разбавления семени барана.

Из опытов многих исследователей—Манойлов и др. (1925), Иванов. (1935—1939), Милованов (1938), Шергин (1945), Коротков (1951)—можно сделать вывод, что межполовые различия ярко выражены не только в половых клетках, но имеются они еще в большей степени и между окислительно-восстановительными потенциалами этих клеток.

В попытках перестроить обмен веществ живчиков, изменяя условия среды их хранения Милованов (1933), Шергин (1945) — с кроликами, Коротков (1951) — с овцами, пришли к выводу, что хранение семени этих животных в атмосфере водорода или кислорода изменяет окислительно-восстановительный потенциал в ту или другую сторону и непосредственно влияет на жизнеспособность приплода. Они обнаружили, что аэробное хранение — в атмосфере чистого кислорода — привело к значительному повышению жизнеспособности животных (кроликов и овец), увеличению их веса при рождении, повышению скорости роста.

Из этих данных выяснилось, что существует возможность, путем перестройки обмена веществ живчиков в положительную сторону и увеличения физиологического различия между гаметами, повысить жизнеспособность приплода.

Особенность вышеуказанных опытов заключается в том, что впервые они были сделаны в таких условиях, в которых семя хранилось при температуре 0°C и все время в атмосфере чистого кислорода.

В наших опытах мы поставили задачу: исследовать влияние кратковременной оксигенацией семени, сохраненном при комнатной температуре, и проверить влияет ли это на жизнеспособность приплода.

### Материал и методика исследования

Лабораторные опыты проводились в лаборатории отдела биологии и размножения сельскохозяйственных животных ВИЖа, производственные опыты по осеменению овец проводились на Товарчинском отделении научно-исследовательского института животноводства степных районов Украинской ССР им. М. Ф. Иванова, в Аскания-Нова.

Для того чтобы выявить степень обратимой инактивации живчиков и условия активности и оживления их, использовали сравнение разных оценок активности. Метод оценки семе-

ли в капиллярах по В. К. Милованову дает правильное представление об условиях, при которых живчики выходят из состояния обратимой инактивации.

В очень тонкие стеклянные капилляры засасывали разбавленное семя и исследовали его под двумя микроскопами. Один микроскоп был без нагревательного столика — другой с нагревательным столиком. Температура при втором исследовании была 42°.

Обозначение способа оценки	Условия оценки
a <sub>1</sub>	В средней части стеклянного капилляра (анаэробные условия) без подогрева.
a <sub>2</sub>	То же, у мениска (влияние воздуха).
a <sub>3</sub>	В средней части капилляра при 40° (эффект температурного воздействия).
a <sub>4</sub>	То же, у мениска (влияние тепла и воздуха).
a <sub>5</sub>	После разбавления семени 3-процентным раствором цитрата натрия при 20° (влияние разбавления).
a <sub>6</sub>	После разбавления тем же реактивом при 40° (влияние разбавления и тепла).

Все образцы семени, кроме контроля, хранили при 15—24° в пластмассовых пробирках, которые находились в штативе, изготовленном из пенопласта. Семя проверяли по следующим показателям: активность (по Милованову), резистентность (по Короткову — Милованову), живучесть (по Милованову, Асланяну), рН (хингидроный метод), концентрацию живчиков. Абсолютные и относительные показатели живучести семени определяли по обычным формулам (по Милованову).

Кривые активности семени при разных методах изобразили на графике и вычислили площадь зоны обратимой инактивации на миллиметровой бумаге.

Для исследования использованы следующие химически чистые органические кислоты: муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная, изовалериановая, капроновая, щавелевая, малоновая, янтарная, винная, лимонная и молочная.

Сначала была установлена изотоническая концентрация всех перечисленных кислот для семени, учитывая его точку замерзания.

Перед исследованием каждой кислоты сначала готовился ее изотонический раствор с тем, чтобы определить оптимальную и максимальную (токсичную) концентрацию кислот для семени барана. При этом была использована следующая методика.

В штатив, изготовленный из пенопласта, сначала были установлены двенадцать предварительно пронумерованных пробирок. В каждую пробирку вносили по 1 мл глюкозо-цитратно-желточного разбавителя, изготовленного по инструкции. Затем в первую пробирку добавляли 1 мл изотонического раствора испытываемой кислоты. После тщательного перемешивания 1 мл смеси из первой пробирки вносили во вторую, из нее 1 мл смеси в третью и так далее вплоть до десятой. Из десятой пробирки 1 мл смеси отбирали и выбрасывали. Таким образом были получены следующие концентрации испытываемой кислоты (в м/молях): 0,34; 0,69; 1,38; 2,76; 5,53; 11,06; 22,12; 44,25; 88,50; 117,0.

Разработана также бикарбонат-фосфатная среда для семени барана по методу трех компонентных систем посредством треугольного графика, предложенного В. К. Миловановым.

Были использованы три компонента: цитрат натрия, фосфатбикарбонат, глюкоза или гликокол. Изотонические растворы этих веществ для семени барана приготовили из 6,4% глюкозы, 2,7% гликокола, 3,1% цитрата, 2,6% фосфата калия, 1,6% бикарбоната натрия. Каждый изотонический раствор содержал, кроме вышеуказанных компонентов, желток куриного яйца, белый стрептоцид, пенициллин и стрептомицин.

Для исследования роли каталазы в хранении семени в пробирки добавили по 16, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 мг каталазы на 100 мл среды. Среда без каталазы служила контролем. Живучесть семени проверяли один раз в день, при этом два раза пробирки встряхивали. В конце опыта вычисляли абсолютные показатели живучести семени.

Был применен метод последовательного переноса для разбавления семени. Особенность исследуемых сред, кроме их различия по составу, состояла в том, что некоторые из них содержали поливиниловый спирт. Имелось 4 группы пробирок, по 12 в каждой. В первой пробирке каждой группы находилось по 2 мл свежеполученного семени. В остальные пробирки каждой группы, кроме последних, вносили по 1 мл раствора. В последних пробирках находился разбавитель, который служил контролем. Из 1-й пробирки 1 мл семени перенесли во 2-ю, тщательно перемешали и 1 мл из этой смеси перенесли в 3-ю пробирку и так далее до 11-й пробирки. Из 11-й пробирки удалили 1 мл смеси. Таким образом получили ряд следующих разведений семени: 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 в каждой группе.

Далее исследование проводили в двух вариантах при 17—20° и при 0—4°. В конце исследования вычислили абсолютный показатель живучести семени. Таким образом были

изучены влияния температур и степени разбавления семени.

Была выяснена сравнительная эффективность хранения разбавленного семени в бумажных капсулах, стеклянных ампулах и полистироловых пробирках, при комнатной температуре.

Для проведения исследований по хранению семени в анаэробных и аэробных условиях при комнатной температуре, была испытана аппаратура, в свое время предложенная Коротковым и Миловановым, и которая главным образом состояла из сосудов для кислородного, водородного и воздушного хранения семени; микроэлектролизера для получения чистых  $O_2$  и  $H_2$ ; миллиамперметра и вольтметра для измерения тока и напряжения его и рН-метр.

$H_2$  определяли вычислением по измеряемой разности потенциалов между электродом в семени и каломельным электродом, используя при этом показатель рН семени.

Опыт был проведен на 800 матках асканийской породы, из которых 40 процентов было возраста от 7 до 11 лет. Бараны получали нормальный рацион и были подготовлены к сезону. Исследование их семени перед началом и после окончания сезона было проведено в лаборатории.

Из-за метеорологических условий (1963 года), пастбища были скудные и матки оказались недостаточно подготовлены к случной кампании. Упитанность маток была средняя.

Опыт проводили в такой последовательности.

Семя от подопытных баранов получали при помощи искусственной вагины каждый день в 6 часов утра. Обычно его получали в две садки, следующих одна за другой с интервалом 5—10 минут. Активность семени проверяли глазомерно и под микроскопом (семя с показателем менее 0,8 не использовалось). После этого семя разбавляли в разбавителях, предусмотренных методикой опыта, которые имели комнатную температуру. Кратность разбавления зависела от метода. Использовали 7 разбавителей, которые условно были обозначены:

- 1) среда с капроновой кислотой, или К;
- 2) среда с лимонной кислотой, или Л;
- 3) среда с капроновой кислотой, насыщенная кислородом, или  $KO_2$ ;
- 4) среда с лимонной кислотой, насыщенная кислородом, или  $LO_2$ ;
- 5) среда с каталазой, насыщенная кислородом, или КАТ;
- 6) бикарбонат-фосфатная среда, или БК;
- 7) желток-цитрат-глюкозная среда, контрольная, или КОН.

Во всех случаях семя хранили в термосах при температуре  $17-20^\circ$  с кусочком льда на дне. На лед был положен слой ва-



ты, на которую ставили штатив из пенопласта. В штативе находился термометр для измерения температуры.

Контрольное семя хранили в широкогорлых вакуумных термосах со льдом. Для того чтобы избежать холодового удара, флаконы в полиэтиленовых мешочках, содержащие разбавленное семя, ставили на тонкий слой ваты.

Семя хранили в полистироловых стерильных пробирках, закрытых полиэтиленовыми колпачками.

Опытное семя разбавляли в 10 раз, разливали в пробирки и хранили в течение 24—28 часов при температуре 17—20°. Затем на автомашине его доставляли за 13 км на место осеменения маток. Процессы оксигенации проводили на месте осеменения. Контрольное семя хранили при 0°, +2° столько же часов.

Доза осеменения для контрольного и опытного семени (разбавленного) была одинаковая — 0, 1 мл.

Так как в охоту приходило ежедневно достаточное число овцематок, то осеменение их проводили семенем с одним разбавителем до тех пор, пока не было осеменено 100 подопытных маток. Ежедневно осеменяли маток и контрольным семенем.

Насыщение семени кислородом проводилось на месте осеменения. Перед использованием семя, хранившееся 24—28 часов, насыщали согласно методики в течение 40 минут и сразу же проводили осеменение овец.

Для определения маток в охоте использовали пробников.

Выбор маток производили по принципу аналогов. Маток, перегулявших в первом цикле осеменяли во втором половом цикле семенем, сохраненным в среде с капроновой кислотой. В каждой опытной группе было около 100 маток.

Результаты осеменения учитывали по: перегулу от первого осеменения, ягнению от первого осеменения, развитию ягнят (живой вес их при рождении и при отбивке), соотношению полов ягнят и, наконец, по соотношению живого веса матери и ягненка.

### Результаты лабораторных опытов

Выяснилось, что все органические кислоты, исследованные нами при оптимальной для каждой кислоты концентрации удлиняют переживаемость семени барана при добавлении их в глюкозо-цитрат-желточной среде при температуре хранения 17—20°. Наличие кислот благоприятно влияет на живучесть семени. Получается характерная кривая их действия, показывающая оптимум и максимум для каждой кислоты. При опре-

деленной концентрации кислоты дают наилучшую живучесть семени, но после увеличения концентрации переживаемость семени резко снижается вплоть до мгновенного прекращения движения. Однако изучаемые кислоты действуют на переживаемость семени по-разному.

Таблица 1

Влияние органических кислот на живучесть семени барана

Кислоты	Оптимум — относительный показатель живучести семени	Оптимальная концентрация кислот (в мл/молях)	pH в начале опыта	pH в конце опыта
<b>Одноосновные кислоты</b>				
Капроновая	1,33	0,69	6,69	6,29
Уксусная	1,34	5,53	6,66	5,67
Масляная	1,32	11,06	6,14	5,82
Муравьиная	1,24	1,38	6,31	5,88
Валериановая	1,14	1,38	6,64	5,53
Пропионовая	1,05	11,06	6,26	5,81
<b>Двухосновные кислоты</b>				
Щавелевая	1,35	1,38	6,83	6,14
Янтарная	1,10	0,69	6,71	6,00
Малоновая	1,09	2,76	7,23	5,76
<b>Оксикислоты</b>				
Винная	1,34	2,76	6,52	6,03
Лимонная	1,31	2,76—5,53	6,31	5,86
Молочная	1,11	1,38	6,69	5,60

Как видно из таблицы, в группе одноосновных кислот капроновая дала самый высокий показатель живучести семени, причем в сравнительно малой концентрации ее в буферной среде.

Уксусная, масляная кислоты тоже дали почти аналогичные показатели живучести семени при их добавке, но для этого нужна была их большая концентрация в среде.

Муравьиная, валериановая и пропионовая кислоты тоже повышали живучесть семени, но их оптимум был ниже, чем оптимум других кислот этой же группы.

Капроновая кислота дала самые лучшие результаты по живучести семени, а пропионовая — самые низкие результаты в этой группе и вообще среди изученных кислот.

В группе двухосновных кислот щавелевая кислота показала самый высокий показатель живучести семени, при ее концентрации 1,38 мл/моль. Янтарная и малоновая кислоты дали сравнительно низкие результаты по переживаемости семени барана.

В группе оксикислот винная кислота, как и лимонная, дала наилучший показатель живучести семени, но сравнительно при больших своих концентрациях.

Выяснилось, что все органические кислоты уже при сравнительно слабом подкислении буферной среды производят обратимую инактивацию живчиков. Так как они токсичны при увеличении концентрации, то их надо держать в нужных пределах рН семени, сохраняемого с добавлением названных кислот. И поэтому кислота, показывающая оптимальные результаты переживаемости семени при ее малой концентрации в буферной среде, конечно, лучшая. Такой кислотой является капроновая.

Под влиянием этих кислот живчики находятся в состоянии покоя или они мало активны. При нагревании до 40—42° они вновь начинают двигаться.

Благодаря специальному методу исследования семени в капиллярах, возникла возможность вычислить графически (объективно) зону обратной инактивации живчиков в квадратных площадях, по сравнению с контролем.

Таблица 2

Процесс обратимой инактивации (по величине площадей)

Кислоты	Относительная площадь между $a_1$ и $a_2$		Относительное число степеней инактивации
	кислота	контроль	
<b>Одноосновные кислоты</b>			
Муравьиная	14	8	1,75
Уксусная	33	16	2,06
Пропионовая	39	29	1,34
Масляная	36	18	2,00
Изовалериановая	28	26	1,07
Капроновая	67	32	2,09
<b>Двухосновные кислоты</b>			
Щавелевая	53	32	1,65
Малоновая	43	31	1,38
Янтарная	32	28	1,10
<b>Оксикислоты</b>			
Винная	49	28	1,70
Лимонная	46	31	1,48
Молочная	45	36	1,22

Как видно из таблицы, в буферной среде относительное число степени инактивации живчиков по сравнению с контролем было соответственно: 2,09 для капроновой, 2,06 для уксусной, 2,00 для масляной и 1,7 для винной кислот. Значит, при наличии этих кислот живчики обратимо инактивируются в два и больше раз, чем в контрольной среде, и этим их переживаемость увеличивается.

По константе ионизации капроновая кислота имела преимущество среди всех названных кислот. Она имеет самую низкую константу ионизации. По В. К. Милованову (1934) и Флипсу (1959) низкая константа ионизации способствует проникновению кислоты внутрь живчиков.

Обнаружена еще одна черта влияния органических кислот на переживаемость семени барана. Чем длиннее углеродная цепь в структуре кислоты, тем легче она проникает внутрь клетки. Капроновая кислота и в этом имеет преимущество. Она по структуре содержит самую длинную цепь углеродных атомов.

Кислоты, имеющие четное число углеродных атомов в структуре (2, 4, 6), оказались лучше, чем кислоты, имеющие в составе нечетное число (1, 3, 5) углеродных атомов.

Обнаружилось, что чем больше число карбоновых атомов в составе «нечетных» кислот, тем менее благоприятно действие этих кислот и чем больше число карбоновых атомов в составе «четных» кислот, тем лучше они действуют на переживаемость семени барана. Сопоставление влияния числа карбоксильных групп на способность кислот вызывать обратимую инактивацию живчиков показало, что одноосновные кислоты лучше влияют на переживаемость семени барана, чем двухосновные или оксикислоты.

Опыты по разработке бикарбонат фосфатной среды показали, что наилучшие данные живучести семени барана расположились в той части треугольника, которая показывает увеличение объемного содержания раствора: лимоннокислого натрия до 50%, смеси бикарбоната натрия и фосфата — 40% и раствора глюкозы — 10%.

При пересчете процентных соотношений изотонических растворов по объему в весовые получен следующий рецепт разбавителя на 1000 мл дистиллированной воды в г:

Натрий лимоннокислый трехзамещенный пяти-	
водный	15,5
Бикарбонат натрия	3,2
Фосфат калия	5,2
Глюкоза безводная	6,4
Желток куриного яйца (мл)	100

Стрептоцид белый  
Пенициллин

3,0

Стрептомицин

1 000 000 м. с.

Приведенный рецепт нового разбавителя хорошо сохраняет семя и pH его, в течение хранения изменяется незначительно.

При добавлении каталазы в разные среды переживаемость семени улучшалась. В среде с добавлением капроновой кислоты и каталазы оптимум живучести семени был достигнут при концентрации каталазы 30 мг на 100 мл среды. Добавка больших доз каталазы не оказала вредного действия на живучести семени, но и не дала улучшения его живучести.

В опытах многократного разбавления семени барана, с добавлением поливинилового спирта обнаружилась самая лучшая живучесть семени при разбавлении его в 8—10 раз. При возрастании разбавления живучесть постепенно падала. По сравнению с контролем это падение было более медленным.

Переживаемость разбавленного семени несколько улучшалась при температуре хранения 0°, +2°, по сравнению с 17—20°.

В лабораторных опытах выяснилось, что семя барана можно разбавлять в 5—6 раз больше, чем обычно в средах, содержащих поливиниловый спирт, без ухудшения живучести семени.

Разницы окислительно-восстановительных процессов при различных условиях хранения семени показаны в таблице 3.

Таблица 3.

Изменение окислительно-восстановительного потенциала и окислительно-восстановительного показателя при 48-часовом хранении семени при комнатной температуре

Группа опыта	Потенциалы в милливольтх через промежутки времени						
	в начале опыта	15 минут	30 минут	один час	три часа	сутки	двое суток
Окислительно-восстановительный потенциал (Eh)							
Кислородная	443	498	498	498	498	498	508
Водородная	428	-374	-374	-374	-374	-374	-374
Контрольная							
Контроль 2	428	+427	+301	+301	+300	301	301
Окислительно-восстановительный показатель (rH <sub>2</sub> )							
Кислородная	28	31	31	31	31	31	31
Водородная	26	0	0	0	0	0	0
Контрольная	28	28	28	28	28	24	24

Из таблицы видно, что при хранении в атмосфере водорода и кислорода окислительно-восстановительный показатель и потенциал устанавливался через 15 минут. Дальнейшее насыщение и хранение семени в соответствующих атмосферах почти не изменяло Eh и  $\text{rH}_2$ .

Через 15 минут в атмосфере кислорода  $\text{rH}_2$  увеличивался до 31 и в атмосфере водорода (анаэробноза) снижался до 0.

Концентрация водородных ионов (рН) с увеличением срока хранения увеличивалась во всех группах, причем в водородной быстрее, чем в кислородной, особенно после 2-суточного хранения семени.

Активность семени сохранялась лучше в водородной атмосфере и только через двое суток снижалась на 0,2. При кислородном хранении через сутки активность падала на 0,2 и через двое суток еще на 0,2. В контрольном сосуде активность упала на 0,1 и через двое суток еще на 0,1.

Хранение семени барана при плюсовой температуре и бумажных капсулах, пенициллиновых флаконах и полистироловых пробирках в среде с капроновой кислотой не показало существенных отличий между способами хранения. Но при бикарбонат фосфатной среде семя в бумажных капсулах и в пенициллиновых флаконах сохранялось хуже.

### Результаты производственных опытов

Результаты осеменения овцематок показаны в таблице 4.

Таблица 4

Результаты осеменения овцематок в зависимости от состава разбавителя

Среды разбавителя	Осемено- маток	% ягне- ния от 1-го осе- менения	Соотношение полов в %		Получено ягнят на 100 маток
			баран- чики	ярочки	
Контрольная (глюкозо- цитрат-желточная)	150	42 ± 4,02	51 ± 5,43	49 ± 5,05	123
Бикарбонат-фосфатная (БК)	133	57 ± 4,3	48 ± 3,29	52 ± 4,90	134
С капроновой к-той (К)	142	57 ± 4,15	43 ± 4,78	57 ± 4,64	132
С лимонной к-той (Л)	124	47 ± 4,52	51 ± 5,86	49 ± 5,98	120

Из таблицы следует, что по сравнению с контрольной в других опытных группах процент ягнения был выше. По группе К и БК эта разница составляет 15%. Получена статистическая достоверность при уровне значимости  $P \geq 0,001$ . Для

группы Л разница от контроля составляет 5%. Эта разница статистически недостоверна.

По соотношению пола ягнят в контрольной группе, число баранчиков несколько больше ярочек. Процентное соотношение в этой группе составляет 51:49. Для группы К соотношение составляет 43:57. Для БК — 48:52 и в группе Л — 51:49. Эти различия статистически недостоверны. В группе К получено большее число ярочек, чем баранчиков. Эта разница приближается к достоверности. (Она достоверна, если принять критерием достоверности двойную вероятную ошибку.)

Выход ягнят на 100 маток по группам представляет значительный интерес. В контрольной группе выход ягнят — 123. В группах БК и К по сравнению с контрольной получен больший выход ягнят: в группе БК на 11% и группе К на 9%. Однако в группе Л выход ягнят на 3% меньше, чем в контрольной. Интересно отметить, что средний выход ягнят на 100 овцематок для асканийской породы составляет около 118%. Следовательно, и в опытной и контрольной группах выход ягнят на 100 овцематок получен выше по сравнению со средними данными для породы.

Таблица 5

Средний живой вес ягнят при рождении и в 4-месячном возрасте

Группы опыта	При рождении		В 4-месячном возрасте	
	баранчиков	ярочек	баранчиков	ярочек
Контрольная	4,9 ± 0,13	4,68 ± 0,12	25,3 ± 0,63	24,6 ± 0,52
К	5,1 ± 0,11	4,77 ± 0,09	26,0 ± 0,67	25,1 ± 0,43
БК	5,0 ± 0,12	4,83 ± 0,13	26,8 ± 0,58	25,2 ± 0,36
Л	5,0 ± 0,11	4,66 ± 0,10	24,9 ± 0,47	24,6 ± 1,08

Средний живой вес ягнят всех опытных групп выше по сравнению с живым весом ягнят контрольной группы. Эта разница статистически недостоверна как по баранчикам, так и по ярочкам, как при рождении, так и при отбивке.

Из вышесказанного можно сделать вывод о том, что баранчики и ярочки, группы К и БК сохранили свое преимущество по живому весу, хотя оно статистически недостоверно, как при рождении, так и в возрасте 4-х месяцев. Это говорит о том, что включение капроповой кислоты в среду и хранение семян в бикарбонат-фосфатном разбавителе при комнатных температурах не повлияло отрицательно на жизнеспособность приплода и его дальнейшее развитие. Включение лимонной кислоты в среду дало несколько худшие результаты, по сравнению с другими кислотами.

Таблица 6

Результаты осеменения овцематок семенем, находящимся  
в разных средах насыщенных кислородом

Среды разбавителя	Осеменено маток	% ягнения от первого осеменения	Соотношение полов		Получено ягнят на 100 маток
			баранчики	ярочки	
Контрольная	150	42 ± 4,02	51 ± 5,43	49 ± 5,05	123
С капроновой к-той + кислород (K <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	102	39 ± 4,1	43 ± 6,76	57 ± 6,56	137
С капроновой к-той + каталаза + кислород (КАТ)	127	45 ± 4,42	51 ± 5,86	49 ± 5,54	133
С лимонной к-той + кислород (ЛЮ <sub>2</sub> )	84	39 ± 5,3	45 ± 7,42	55 ± 7,82	130

Как видно из таблицы, в группе K<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и ЛЮ<sub>2</sub> ягнение ниже на 3%, чем в контрольной группе. Эта разница недостоверна. В группе же с каталазой ягнение выше на 3%, чем в контрольной группе. Очевидно, так как в опытных группах семя разбавляли в 10 раз, и такое разбавленное семя подвергалось действию кислорода, получилась малая оплодотворяемость. Работы Ван Демарка, Сольсбери утверждают, что избыток кислорода вреден для живчиков, особенно при малых их концентрациях.

В группе с каталазой получена на 3% больше оплодотворяемость, чем в контрольной и на 6% больше, чем в группе K<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Очевидно, добавление каталазы до какой-то степени устранило вредное действие избытка кислорода. Эта разница, однако, статистически недостоверна.

По соотношению полов, в сравнении с контрольной группой, в группе K<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и ЛЮ<sub>2</sub> получен больший процент ярочек. Процентное соотношение соответственно в этих группах составляет 43 : 57 и 45 : 55. В группе же с каталазой это соотношение такое же, как и у контроля 51 : 49%.

Выход ягнят на 100 маток в контрольной группе составляет 123, в остальных группах, а именно K<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ЛЮ<sub>2</sub> и КАТ, он соответственно равен 137, 133 и 130 или на 14, 10 и 7% выше, чем в контрольной группе. По сравнению со средним выходом ягнят на 100 маток для породы, который составляет 118%, выход ягнят в опытных группах соответственно выше на 19, 15 и 12%. Даже в контрольной группе выход ягнят на 5% больше, чем выход для средних данных по породе.

В предыдущих опытах, когда семя сохранилось в средах с капроновой и лимонной кислотами, выход ягнят на



100 маток в группе К был равен 132, а соотношение полов было 43:57% и в группе Л — выход ягнят на 100 маток был 120 и соотношение полов было 51:49%. Когда это семя, разбавленное этими средами и сохраненное, насыщали кислородом, соотношение полов в группе КО<sub>2</sub> оставалось на том же уровне, но в группе ЛО<sub>2</sub> оно изменялось. Было получено больше ярок и процентное соотношение полов стало 45:55%. Очевидно, оксигенация сыграла роль регулятора соотношения полов.

В результате оксигенации в группах КО<sub>2</sub> и ЛО<sub>2</sub> выход ягнят на 100 маток соответственно увеличился на 5 и 13%.

При сравнении таблиц (3) и (6) видна существенная разница между процентами оплодотворяемости. Но следует учесть, что группы К и КО<sub>2</sub> отличаются друг от друга только тем, что среда КО<sub>2</sub> насыщалась кислородом в течение 40 минут перед осеменением, остальные же компоненты в этих средах были совершенно одинаковые. То же касается и сред Л и ЛО<sub>2</sub>, которые отличались лишь насыщением.

При сравнении этих двух таблиц по результатам оплодотворения получилась интересная разница. В группе К оплодотворяемость составляла 57%, в то время, как в группе КО<sub>2</sub> — 39%; в группе Л — 47%, а в группе ЛО<sub>2</sub> — 39%.

Учитывая, что обе среды имели одинаковый состав, и разница состояла только в том, что одни среды насыщались кислородом, а другие не насыщались, можно сделать вывод, что эта низкая оплодотворяемость возникла вследствие избытка кислорода.

Таблица 7

Влияние кратковременной оксигенации на жизнеспособность приплода

Группы опыта	Средний живой вес ягнят при рождении		Средний живой вес в 4-месячном возрасте	
	баранчиков	ярок	баранчиков	ярок
Контрольная	4,98 ± 0,13	4,68 ±	25,3 ± 0,63	24,6 ± 0,52
КО <sub>2</sub>	5,26 ± 0,12	4,80 ±	27,0 ± 0,68	25,4 ± 0,70
ЛО <sub>2</sub>	5,24 ± 0,16	4,85 ±	26,0 ± 0,73	25,3 ± 0,84
КАТ	5,23 ± 0,12	4,76 ±	26,3 ± 0,46	25,6 ± 1,41

Из таблицы видно, что в опытных группах живые веса ягнят при рождении и при отбивке были выше по сравнению с контрольной группой. Разницы между средними живыми весами баранчиков при рождении по сравнению с аналогами контрольной группы приближаются к достоверности. Остальные различия между живыми весами статистически недостоверны.

Повышение живого веса у баранчиков опытных групп при рождении и отбивке более заметно, чем у ярочек.

Имея в виду значительную зависимость живого веса ягнят от веса их матерей были вычислены относительные веса ягнят при рождении к весу их матерей.

Т а б л и ц а 8

Относительные веса ягнят при рождении (в промиллях) к весу их матерей

Группы опыта	Средний		Однцов		Двоен	
	баранчиков	ярочек	баранчиков	ярочек	баранчиков	ярочек
Контрольная	89	84	97	94	80	78
БК	84	88	100	95	74	73
К	90	87	100	98	80	76
Л	89	80	91	85	76	72
Среды насыщенные кислородом						
КО <sub>2</sub>	98	84	104	100	89	80
КАТ	94	92	101	94	89	81
ЛО <sub>2</sub>	94	84	102	100	85	80

Относительные живые веса ягнят в группе БК и К почти не отличаются от ягнят контрольной группы. В группе же Л наблюдалось уменьшение веса ягнят по сравнению с контролем, хотя эта разница и не достоверна.

Можно сделать вывод, что добавление изученных кислот в среду и хранение семени барана при комнатной температуре не влияет отрицательно на жизнеспособность приплода.

В группах, где семя перед осеменением было кратковременно насыщено кислородом, как относительные, так и абсолютные веса ягнят выше от 5 до 9%, чем ягнят контрольной группы.

### Выводы:

1. Органические карбоновые кислоты жирного ряда вызывают обратимую инактивацию живчиков барана при определенной концентрации. Лучшие результаты получены с гликоколцитратно-желтчной средой с капровой кислотой.

2. Одноосновные кислоты влияют более благоприятно на семя барана, чем двухосновные и оксикислоты, имеющие столько же карбоновых атомов и карбоксильных групп.

3. Кислоты, имеющие четное число карбоновых атомов в своем составе, более благоприятно влияют на семя барана, чем кислоты, имеющие нечетное число карбоновых атомов.

4. При включении капроновой кислоты в гликоколцитратно-желточную среду можно хранить семя барана при плюсовых температурах в течение 2—3 дней и получать нормальную оплодотворяемость и жизнеспособный приплод.

5. Учитывая благоприятное влияние капроновой кислоты при ее определенной концентрации, разработан рецепт разбавителя для хранения семени барана при плюсовых температурах. Этот метод более практичен и менее сложен, чем метод хранения в среде ИВТ.

6. Учитывая благоприятное действие угольной кислоты, разработан более практичный рецепт бикарбонат-фосфатной среды для семени барана. Этот метод дает хорошие результаты по оплодотворяемости после хранения семени. При хранении семени барана в разработанной нами бикарбонат-фосфатной среде можно получить от этого семени нормальное жизнеспособное потомство.

7. В средах с лимонной кислотой переживаемость семени барана хуже, чем в средах с капроновой или угольной кислотами. Хуже оплодотворяемость овец и жизнеспособность полученного приплода.

8. С целью максимального использования лучших баранов-производителей при добавлении в среду поливинилового спирта можно увеличить разбавление семени в 10 раз, т. е. в 4 раза больше, чем рекомендуется в инструкциях.

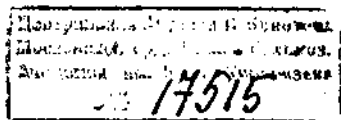
Десятикратное разбавление семени барана не оказывает плохого влияния на процент оплодотворяемости овец и жизнеспособность приплода, его рост и развитие.

9. Насыщение хранимого семени кислородом и изменение окислительно-восстановительных процессов оказывает благоприятное влияние на жизнеспособность ягнят, полученных от осеменения этим семенем, по сравнению с ягнятами, полученными от осеменения ненасыщенным кислородом семенем.

Кратковременная оксигенация семени барана в течение 40 минут, сохраненного при комнатной температуре, благоприятно влияет на жизнеспособность приплода, как и при постоянном хранении семени барана в атмосфере чистого кислорода.

10. Добавление каталазы в среду и сохранение в такой среде семени благоприятно влияет на живучесть семени, сохраняемого при комнатной температуре, оплодотворяемость и жизнеспособность ягнят.

Оптимальном концентрации каталазы — 30 мг на 100 мл среды.



## Практические предложения

1. Применять в практике хранения семени барана при комнатной температуре среду с добавлением капроновой кислоты, либо разработанную нами бикарбонат-фосфатную среду.

2. Следует увеличить степень разбавления семени барана до 1:10 при добавлении в среду 2,5% поливинилового спирта для увеличения вязкости среды.

3. Рекомендовать кратковременную 40-минутную оксигенацию семени барана перед осеменением по предложенному нами методу насыщения или по принципиально подобной конструкции, а также добавление каталазы в среду при хранении семени барана при комнатной температуре.

4. Предполагаем, что все указанные рекомендации с успехом могут быть использованы при искусственном осеменении овец в климатических условиях Индии.

Основное содержание материалов диссертации опубликовано в следующих статьях:

1. Джаянт Хонмоде. Многократное разбавление семени барана. Овцеводство. № 1, 1965.

2. Джаянт Хонмоде. Влияние кратковременной оксигенации на переживаемость и оплодотворяющую способность семени барана при комнатной температуре и жизнеспособность приплода. Вестник сельскохозяйственной науки (в печати).

3. Джаянт Хонмоде. Влияние добавления в среду каталазы и кратковременной оксигенации на переживаемость семени, оплодотворение и жизнеспособность приплода. Доклады ВАСХНИЛ (в печати).

4. Джаянт Хонмоде. Влияние органических карбоновых кислот на переживаемость, оплодотворяющую способность семени барана и жизнеспособность приплода. Труды конференции молодых ученых (в печати).

5. Jayant Honmode. Transport of ram semen. (в печати).

6. Jayant Honmode. Preservation of ram semen on room temperatures. (в печати).

## STUDIES ON THE PRESERVATION OF RAM SEMEN

Jayant Honmole

### Summary

Experience gained by Soviet Union in the development of sheep husbandry through Artificial insemination could well be utilised for the same purpose, with suitable changes under Indian conditions. For the mass use of artificial insemination of sheep in India preservation of ram semen on temperatures above 0°C, would have been practicable and economical.

Research was carried out in the laboratory of Animal breeding of All Union Animal Husbandry Institute, Moscow and the field experiments of mass insemination were carried out in the Scientific Research Institute, Askania Nova, Ukren (USSR).

Effect of carbonic fatty acids ( $C_1 - C_8$ ) and other organic acids on the livability of ram sperm was studied in the light of their capability to reversibly inactivate sperms and receipts of two new diluents were worked out, one containing a particular quantity of caproic acid and in the other, producing carbonic acid by chemical means (without gaseat on by  $CO_2$  gas). Ram semen was stored in these diluents on temperatures ranging from 17°-20°C and ewes were inseminated. Field trials showed that new diluents were significantly better than the one presently used in USSR.

Effect of addition of catalase to the diluents on the viability of ram sperms was studied. Laboratory experiments showed a significant rise in viability on room temperatures. Field trials did not show very much significant results compared to the controle trials.

Studies were undertaken to increase the dilution rate of the ram semen with the addition of polyvinyl sprit. Field experiments showed that ram semen could be diluted 10 times instead of 2-3 times as they do presently in USSR without any adversary effects on the fertility percentage and on the offspring.

Works of soviet scientists showed that increasing the difference between oxygen reduction potentials of sperms and ovum, better offspring could be produced having more weight at birth and other live characters. The livability of the offspring in such cases was shown to increase.

Oxygenation of the preserved ram semen before incemination showed that the oxygen reduction potential after such treatment significantly rises. Use of such oxygenated semen for insemination showed that liviability of the offspring at birth and its further development is bettered in comparison to the offspring obtained by the use of nonoxygenated semen.

29.4.65 г.

Объем 1,25 п. л.

Зак. 550.

---

Типография Университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы  
Москва, 3-й Донской проезд, 7.