

KRIOKONSERWOWANE NASIENIE W OCHRONIE *EX SITU* ZASOBÓW GENETYCZNYCH KONI

Julia Warchoł, Piotr Gogol

Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, Krajowy Bank Materiałów Biologicznych, 32-083 Balice k. Krakowa

E-mail: julia.warchol@iz.edu.pl; piotr.gogol@iz.edu.pl



Julia Warchoł: <https://orcid.org/0009-0007-7550-4587>

Piotr Gogol: <https://orcid.org/0000-0002-8713-6474>

Abstrakt

Ochrona ex situ, obok ochrony in situ, stanowi istotny element ochrony zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich. Gromadzony w bankach kriokonserwowany materiał biologiczny tworzy rezerwową pulę genów, zabezpieczającą bioróżnorodność populacji w sytuacjach zagrożenia, takich jak wymieranie ras czy epidemie chorób. W Polsce ochroną objęto siedem populacji koni: huculską, śląską, małopolską, wielkopolską, konie zimnokrwiste w typie sokólskim i sztumskim oraz konika polskiego. Pomimo że w rozrodzie koni objętych programem ochrony zasobów genetycznych obowiązuje krycie naturalne, to w uzasadnionych przypadkach zaleca się pozyskiwanie i przechowywanie zamrożonego nasienia wytypowanych ogierów w celu zachowania ciągłości linii hodowlanych. Aby tworzona kolekcja nasienia ogierów mogła być w przyszłości skutecznie użyta jako element działań w zakresie ochrony rasy, konieczna jest troska nie tylko o ilość, ale również o jakość kriokonserwowanego materiału. W artykule przedstawiono aktualne kierunki badawcze nad udoskonalaniem metod zabezpieczania nasienia ogierów przed skutkami zmian temperatury podczas jego zamrażania i rozmrażania oraz technik inseminacji, które mogą być szczególnie przydatne w rozrodzie zagrożonych ras koni.

Słowa kluczowe: konie, rasy zachowawcze, kriokonserwacja nasienia ogierów, bioróżnorodność, ochrona ex situ

Wstęp

W celu ochrony *ex situ* zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w roku 2014 w Instytucie Zootechniki PIB utworzono Krajowy Bank Materiałów Biologicznych (KBMB). Kluczową rolą KBMB jest pozyskiwanie i przechowywanie kriokonserwowanego materiału biologicznego od ras objętych Programem Ochrony Zasobów Genetycznych oraz zwierząt o wybitnych cechach produkcyjnych i hodowlanych. Gromadzony w KBMB materiał stanowi rezerwową pulę genów na wypadek pojawienia się czynników zagrażających bioróżnorodności populacji, takich jak wymieranie ras czy epidemie chorób zwierzęcych. Obecnie w Polsce programem ochrony zasobów genetycznych objętych jest 7 populacji koni. Są to konie huculskie, śląskie, małopolskie, wielkopolskie, zimnokrwiste w typie sokólskim i sztumskim oraz konik polski. W populacjach koni objętych programem ochrony zasobów genetycznych obowiązkowo sto-

sowany jest rozród naturalny. Inseminacja nasieniem świeżym lub schłodzonym oraz inseminacja nasieniem rozmrożonym dozwolona jest wyłącznie w szczególnych sytuacjach. Jednak w celu zabezpieczenia ciągłości linii męskich i żeńskich, w uzasadnionych przypadkach, zaleca się gromadzenie i przechowywanie materiału biologicznego w postaci zamrożonego nasienia pochodzącego od wytypowanych ogierów. Aby tworzona w KBMB kolekcja nasienia ogierów mogła być w przyszłości skutecznie wykorzystana jako element działań w zakresie ochrony *in situ*, konieczna jest troska nie tylko o ilość, ale również o jakość kriokonserwowanego materiału.

Choć inseminacja kriokonserwowanym nasieniem jest rutynowo stosowana w hodowli koni, a jej zalety są powszechnie znane, na jej powodzenie wpływają takie czynniki, jak jakość nasienia, liczba plemników w dawce inseminacyjnej, wybrana metoda inseminacji i przygotowanie klaczy (Miller, 2008). Często występująca u ogierów niska kriotolerancja nasienia, powodująca znaczny spadek jego jakości po rozmrożeniu, ogranicza jednak praktyczne zastosowanie mrożonego nasienia, szczególnie w przypadku zagrożonych ras koni, których nie selekcjonuje się na podstawie podatności nasienia na kriokonserwację (Smits i in., 2012).

Ocena i metody konserwacji nasienia

Ejakulat dojrzałego ogiera gorąco krwistego (po 6. roku życia) średnio osiąga objętość 50–60 ml i można podzielić go na 3 frakcje. Są to frakcja przed ejakulacyjna, frakcja plemnikowa – właściwa i frakcja poplemnikowa, której funkcją jest wypchnięcie z kanału moczowo-płciowego poprzedzających frakcji. Na ilość produkowanego dobowo nasienia główny wpływ mają wiek, rasa, budowa i rozmiar jąder, kondycja zwierzęcia, a także sezon pobrania nasienia. U ogierów w pełni dojrzałych, w szczycie stanówkowej formy (6–20 lat) w czasie sezonu rozrodowego (maj–sierpień) liczba plemników w ejakulacie sięga około 6,4 mld, a poza sezonem około 3,2 mld. Szczyt sezonowej produkcji plemników ogierzy osiągają w maju i czerwcu. Ogierzy włączone do programu sztucznego unasieniania oddają zwykle nasienie co drugi dzień (Kosiniak-Kamysz, 2007; Tischner, 2010). Według badań Podico i in. (2023) pierwszy i drugi ejakulat z sezonu, pobrane w odstępie godziny różniły się liczbą plemników, ale nie jakością. Również jakość nasienia po rozmrożeniu nie różniła się między pierwszym a drugim ejakulatem. Choć nie unasieniano klaczy, wyniki sugerują, że istnieje minimalna różnica między pierwszym a drugim ejakulatem pochodzącym od nieaktywnych ogierów hodowlanych i że oba nadają się tak samo do dalszego przetwarzania w celu schłodzenia lub zamrożenia.

Klasyczne badanie kondycji hodowlanej ogiera (*Breeding Soundness Examination – BSE*) wprowadzone w 1975 roku, zgodnie z propozycją Towarzystwa Teriogenologicznego, zaleca, aby warunkiem uznania osobnika za potencjalnie zadowolającego ogiera czołowego było pozyskanie co najmniej miliarda plemników o ruchu postępowym, morfologicznie prawidłowych (*progressively motile, morphologically normal sperm – PMMNS*) w drugim z dwóch ejakulatów pobranych w odstępie 1 godziny. Od momentu wprowadzenia tych kryteriów *PMMNS* jest głównym elementem oceny potencjalnej przydatności ejakulatów do inseminacji (Whitesell i in., 2020).

Ocenę nasienia ogierów do *BSE* początkowo przeprowadzano za pomocą wizualnej, subiektywnej oceny mikroskopowej. Wybarwione preparaty oceniano za pomocą zwykłego mikroskopu świetlnego, natomiast rozmazy niewybarwione za pomocą mikroskopu z kontrastem fazowym. Koncentrację plemników szacowano najczęściej za pomocą spektrofotometru. Wraz z rozwojem technologii i powstaniem systemów komputerowych, możliwości dokładnego i obiektywnego określania jakości nasienia znacząco wzrosły (Jasko i in., 1988; Varner, 2008).

Obecnie do analizy ruchu plemników powszechnie używa się systemu *CASA* (*computer-assisted sperm analysis*), do oceny morfologii plemników mikroskopię z kontrastem różnicowo-interferencyjnym (*differential interference contrast – DIC*). Do dokładnej oceny koncentracji używana jest technologia oparta na fluorescencji i zautomatyzowanym liczniku komórek

(Whitesell i in., 2020). Do celów określenia stopnia fragmentacji DNA, integralności błony komórkowej, aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych plemników, jak i seksowania nasienia, używany jest cytometr przepływowy (Bochenek, 2003). Metody te pomagają ujednolicić wyniki oceny nasienia i wykluczyć subiektywność ocen diagnosty, a zastosowanie wyżej wymienionej metody w kwalifikacji nasienia do mrożenia umożliwia wydajną pracę oraz pozwala na uzyskanie powtarzalnych wyników, co w przypadku oceny manualnej jest niemożliwe (Egyptien i in., 2023).

Do inseminacji klaczy może być wykorzystywane nasienie świeże, schłodzone lub mrożone. Prowadzone są także badania nad witrifikacją plemników ogierów (Hidalgo, 2025). Nasienie świeże co prawda cechuje się najwyższą skutecznością zapłodnień, jednak w praktyce jest rzadko stosowane ze względu na krótki czas przydatności i związany z tym brak możliwości transportu na dalsze odległości. Zdecydowanie częściej do inseminacji wykorzystywane jest nasienie schłodzone, ze względu na możliwość wydłużenia czasu jego przechowywania nawet do 72 godzin. Jest to jednak metoda logistycznie najbardziej wymagająca. Jedynie kriokonserwacja daje możliwość długotrwałego, praktycznie nieograniczonego, przechowywania nasienia i wykorzystania go w inseminacji nawet w przypadku osobników już nieżyjących. Stanowi to nieocenioną wartość w przypadku prac nad zachowaniem bioróżnorodności poprzez ochronę ras zachowawczych metodami *ex situ*. Kriokonserwacja nasienia pozwala również na uniknięcie przenoszenia chorób pomiędzy osobnikami.

Ponieważ wyniki przeżywalności plemników nasienia ogierów po rozmrożeniu zależą od wielu czynników i nie są przewidywalne, niezbędna jest dalsza praca nad optymalizacją protokołów mrożenia i modyfikacją składu rozcieńczalników oraz mediów do mrożenia gwarantujących lepsze efekty. Jest to trudne z uwagi na fakt, że ogiery nie są dobierane do hodowli pod względem jakości nasienia, a pod względem pochodzenia i wyników użytkowości własnej czy potomstwa. W przypadku nasienia ogierów, głównym problemem jest niska ruchliwość plemników po rozmrożeniu, pomimo dobrej jakości świeżego nasienia przed poddaniem go procesowi kriokonserwacji (Ponthier i in., 2012; Ponthier i in., 2013).

Od lat popularnym kierunkiem badań naukowców jest opracowanie testów prognozujących jakość nasienia ogierów po rozmrożeniu (Ponthier i in., 2013; Ponthier i in., 2014; Martin-Cano i in., 2020; Gaitskell-Phillips i in., 2021a; Gaitskell-Phillips i in., 2021b; Dordas-Perpinya i in., 2022). Ponthier i in. (2013) oraz Pukazhenthi i in. (2014) uważają, że należy wciąż testować różne rozcieńczalniki i metody zamrażania, aby poprawić jakość rozmrażanego nasienia osobników, których nasienie wykazuje słabą tolerancję na kriokonserwację. Według Egyptien i in. (2023) w przypadku, gdy do inseminacji stosowana jest zalecana dawka plemników o ruchu postępowym, a wskaźniki zapłodnienia nie są zadowalające, zaleca się diagnostykę nasienia za pomocą zaawansowanych technologii, takich jak cytometria przepływowa, czy analiza proteomiczna.

Metody kriokonserwacji

Nasienie ogiera pobiera się przy użyciu sztucznej pochwy (otwartej lub zamkniętej), z pomocą fantomu lub klaczy prowokatorki. Istnieje także możliwość pobrania nasienia metodą indukcji farmakologicznej lub manualnego masażu prącia (Tischner, 2010). Według Egyptien i in. (2023) metoda pobierania ma wpływ na objętość i koncentrację plemników, ale całkowita liczba plemników zależy od produkcji jąder i częstotliwości pobierania. Natomiast pH nasienia, aktywność peroksydacyjna i niektóre enzymy mają wpływ na jakość nasienia i jego kriokonserwację. Komórki inne niż plemniki, zawieszone w osoczu nasienia, również mogą mieć wpływ na zamrażanie nasienia.

Świeżo pobrane nasienie od ogierów jest zazwyczaj filtrowane, wstępnie oceniane, rozcieńczane i w zależności od potrzeb podlega dalszym czynnościom. Przed zamrożeniem nasienia rutynowo stosuje się wirowanie, choć plemniki ogiera wykazują na tę procedurę wysoką wrażliwość (Tischner, 2010). Wirowanie nasienia z reguły wykonuje się po dodaniu rozcieńczalnika, który ma za zadanie chronić plemniki i przedłużać ich żywotność. Wirowanie z rozcieńczalnikiem umożliwia także wirowanie nasienia przy wyższej sile g, aby zmaksymalizować odsetek plemników odzyskanych po wirowaniu bez negatywnego wpływu na ich żywotność (Bradecamp, 2021). Za ochronę plemników podczas wirowania odpowiedzialny jest jodiksanol dodawany do nowoczesnych rozcieńczalników. Zalecenia dotyczące wirowania nasienia ogierów bez dodatku jodiksanolu to 400 g przez 20 min, z dodatkiem jodiksanolu 1000g przez 20 min (Kelley, 2023).

Obecnie na rynku dostępnych jest szereg komercyjnych rozcieńczalników do mrożenia nasienia ogiera. Większość z nich używana jest także do przygotowywania nasienia schłodzonego i gwarantuje zachowanie jakości ejakulatu przez 24 godziny. Po tym okresie żywotność plemników zmniejsza się (Batellier i in., 1997). Rozcieńczalniki w swoim składzie zawierają zazwyczaj cukry, elektrolity, bufony, żółtko jaja, mleko i produkty mleczne (Ramires i in., 2015). Zawarta w rozcieńczalnikach glukoza zwiększa ruchliwość plemników, a środki buforujące zapewniają przedłużenie ich ruchliwości podczas przechowywania (Dean i in., 2012). Żółtko jaja, mleko i jego składniki mają za zadanie chronić plemniki przed szokiem termicznym (Manjunath, 2012). Jednym z najczęściej stosowanych rozcieńczalników jest rozcieńczalnik na bazie odtłuszczonego mleka (Ramires i in., 2015). Mleko jako produkt biologiczny o bogatym, złożonym i niejednorodnym składzie zawiera elementy zarówno korzystne, jak i szkodliwe dla przeżywalności plemników. Składowe mleka, takie jak α -laktoglobulina, negatywnie wpływają na ruchliwość plemników, natomiast β -laktoglobulina i kazeiniany oddziałują pozytywnie (Pagl i in., 2006). W związku ze zróżnicowanym wpływem składników mleka stworzono rozcieńczalniki syntetyczne, o zrównoważonym i w pełni zdefiniowanym, stałym składzie. Składają się one z substancji wyraźnie korzystnych dla plemników i zmniejszają ewentualne nieśpójności różnych partii, w porównaniu do stosowania odtłuszczonego mleka (LeFrappier i in., 2010; Plante i in., 2015). Obecnie najczęściej stosowanym komercyjnie chemicznym rozcieńczalnikiem jest INRA 96. Jest to rozcieńczalnik, którego bazą są modyfikowane sole Hanksa uzupełnione kazeinianami (Batellier i in., 1997; Hartwig i in., 2014; Ramires i in., 2015). W ostatnich latach na rynek wprowadzono także nowe rozcieńczalniki, na przykład popularny BotuSemen Gold, w którego skład wchodzi kazeinian sodu w połączeniu z cyklodekstryną (Novello i in., 2020). Aktywnymi składnikami tego rozcieńczalnika mającymi za zadanie działać jako protektor dla plemników są micyle kazeinowe (Bergeron i Manjunath, 2006). Wiązanie białek osocza nasienia i zmniejszenie utraty lipidów z błony plemnika tworzy mechanizm ochraniający plemniki podczas przechowywania nasienia w rozcieńczalniku (Manjunath, 2012). Cholesterol zawarty w rozcieńczalniku BotuSemen Gold prowadzi do obniżenia temperatury, w której zachodzi przemiana fazowa lipidów, utrzymując stan płynny w niższych temperaturach i w konsekwencji zmniejszając uszkodzenia struktury błony plazmatycznej (Amann i Pickett, 1987).

Rečková i in. (2022) przetestowali jakość nasienia po zastosowaniu rozcieńczalnika na bazie mleka oraz dostępnych w handlu rozcieńczalników o chemicznie zdefiniowanym składzie Equi Pro, Equi Plus, INRA 96 i BotuSemen Gold. Najlepsze wyniki uzyskał rozcieńczalnik na bazie odtłuszczonego mleka, INRA 96 i BotuSemen Gold, przy czym rozcieńczalnik na bazie odtłuszczonego mleka działał lepiej niż niektóre nowe rozcieńczalniki.

Po procesie rozcieńczania i wirowania, aby poddać nasienie kriokonserwacji należy użyć mediów zawierających krioprotektanty, umożliwiające przeżycie plemników w ciekłym azocie. Najczęściej jako środki kriochronne wykorzystywane są odtłuszczone mleko, żółtko jaja i glicerol (2–5%) (Martin i in., 1979; Heitland i in., 1996; Sieme i in., 2016). W 2005 roku

Alvarenga i in. dokonali przełomowych badań, które stały się podstawą do opracowania komercyjnego medium do kriokonserwowania nasienia ogierów – Botucurio. Badania te wykazały, że zastąpienie glicerolu amidami, które są mniej toksyczne dla plemników niż glicerol, poprawiło ruchliwość i integralność błon plemników ogierów po rozmrożeniu. Botucurio zawiera stosunkowo niskie stężenie glicerolu (1%), a ponadto 4% metyloformamidu i 10% żółtka jaja. Jest on zalecany jako odpowiedni rozcieńczalnik do stosowania w przypadku obniżonej podatności nasienia na zamrażanie.

Ponieważ proces mrożenia nasienia jest kosztowny z uwagi na wymagany specjalistyczny sprzęt i wykwalifikowaną kadrę oraz konieczny transport ogiera do ośrodków, w których możliwa jest kriokonserwacja nasienia, na rynku pojawiły się wyspecjalizowane zespoły wraz z liniami przystosowanymi do mrożenia w mobilnych laboratoriach. Wykonują one usługę mrożenia nasienia w miejscu przebywania ogiera. Niestety, alternatywa ta także generuje wysokie koszty, które ponoszą właściciele klaczy płacąc za dawkę nasienia, co często stanowi barierę w powszechnym użyciu nasienia mrożonego ze względu na ograniczenia finansowe. Ferrer i in. (2020) proponują rozwiązanie, które mogłoby obniżyć koszty kriokonserwacji. Mrożenie nasienia transportowanego w warunkach schłodzonych pozwalałoby na pobieranie ejakulatów od ogierów i wysyłanie nasienia do scentralizowanych zakładów w celu dalszego przetwarzania. Zbadali oni zatem trzy dostępne w handlu rozcieńczalniki dla nasienia schłodzonego przed etapem mrożenia. Wyniki wykazały, że po przybyciu do laboratorium nasienia schłodzonego przed transportem, wirowanie i dodanie rozcieńczalnika do mrożenia można wykonać w temperaturze pokojowej lub chłodniczej. Ponadto wykazano, że do kriokonserwacji tak przygotowanego nasienia zalecane są rozcieńczalniki Botucurio i EZ Mixin Cryomax LE.

Nasienie ogierów może być zamrażane w sposób konwencjonalny lub w pełni zautomatyzowany. Sposób konwencjonalny polega na mrożeniu w waniencie w parach ciekłego azotu. Charakteryzuje się niską możliwością kontrolowania spadków temperatury, co może prowadzić do uszkodzenia plemników poprzez zbyt szybkie zamrożenie. W przypadku metody zautomatyzowanej, do mrożenia nasienia używa się freezerów, które umożliwiają zaprogramowane obniżanie temperatury w określonym czasie. Na przykład IMV Technology, L'Aigle, Francja, producent frezera Mini-Digitcool ZH 400, zaleca schładzanie z szybkością 15°C na minutę między temperaturą +5°C a -10°C, a następnie z szybkością 10°C na minutę między -10°C a -100°C. Protokół mrożenia stosowany przez Aurich i in. (2020) zaleca natomiast, aby nasienie najpierw schładzać do 5°C z szybkością 0,3°C/min, następnie w ciągu 3 minut do -25°C (10°C/min), a na końcu do -140°C z szybkością chłodzenia 25°C/min. Następnie słomki po wyjęciu z komory zamrażalniczej należy umieszczać bezpośrednio w ciekłym azocie.

Inseminacja klaczy nasieniem mrożonym – metody i zalecana dawka

Na skuteczność inseminacji mrożonym nasieniem wpływ mają prawidłowa ocena ejakulatu, odpowiednie rozcieńczenie i dobrze dobrany protokół kriokonserwacji nasienia. Równie ważne jest także odpowiednie określenie momentu unasieniania na podstawie oceny owulacji u klaczy i poprawne dobranie techniki oraz procedury inseminacyjnej.

Słomki (8 × 0,5 ml) zawierające około 800 milionów wszystkich plemników i minimum 250 milionów plemników o progresywnej ruchliwości były uważane standardowo za prawidłową pojedynczą dawkę inseminacyjną kriokonserwowanego nasienia ogiera (Pasch i in., 2024). Międzynarodowe zalecenia handlowe dotyczące kriokonserwacji nasienia koniowatych określają, że odsetek ruchliwości postępowej plemników powinien wynosić 50–70% przed zamrożeniem i 30–35% po rozmrożeniu. Te minimalne wymagania dotyczące jakości świeżego nasienia w konwencjonalnych programach zamrażania nasienia koniowatych są potrzebne do

uzyskania dobrej jakości nasienia po rozmrożeniu, a wśród nich początkowa ruchliwość plemników jest najważniejszą zmienną. Wielokrotnie wykazano jednak, że związek pomiędzy ruchliwością plemników po rozmrożeniu a płodnością ogierów *in vivo* jest niewielki (Müller, 1987; Samper i in., 1991; Wilhelm i in., 1996; Kirk i in., 2005; Kuisma i in., 2006; Barrier-Battut i in., 2017). Aurich i in. (2020) donoszą, że jakość nasienia dopuszczanego do inseminacji po rozmrożeniu różni się nie tylko osobniczo pomiędzy ogierami, ale również pomiędzy rasami. Analiza regresji logistycznej dowiodła, że zmiennymi najbardziej wpływającymi na jakość nasienia po rozmrożeniu były wiek i rasa. Oznacza to, że kriotolerancja nasienia koni może mieć podłoże genetyczne.

W związku z droższymi dawkami nasienia cennych ogierów oraz częstymi przypadkami braku zadowalającej liczby progresywnych plemników po rozmrożeniu, w ostatnich dwóch dekadach nastąpił znaczny postęp technik inseminacyjnych klaczy. Dążono do maksymalnego zmniejszenia jednorazowej dawki inseminacyjnej, co w efekcie pozwoliło na opracowanie dwóch metod inseminacji ze zmniejszoną liczbą plemników (Lindsey i in., 2001, 2002). Główną metodą, dzięki której można stosować dawki inseminacyjne o obniżonej zawartości plemników, jest metoda głębokiej inseminacji domacicznej do rogu macicy *DHAI* (*Deep Horn Artificial Insemination*) lub też *RI* (*Rectally guided deep horn insemination*) (Samper i Plough, 2010). Jest to metoda modyfikująca tradycyjną inseminację do trzonu macicy, w której kateter inseminacyjny prowadzony jest przez trzon macicy aż do ipsilateralnego rogu macicy co oczekiwana lub potwierdzona owulacja (Pasch i in., 2024; Samper i Plough, 2010). Nasienie można także dostarczyć histeroskopowo (*Hysteroscopic insemination, HI*). Polega to na zdeponowaniu nasienia głęboko domacicznie przy brodawce jajowodu z pomocą endoskopu. Metody te pozwalają znacznie zmniejszyć jednorazową skuteczną dawkę do unasielenia, która może wynosić od 1 do 25 milionów plemników, zaleca się jednak, aby dawki o zawartości plemników poniżej 5 milionów dostarczać histeroskopowo (Samper i Plough, 2010). Techniki te zalecane są do stosowania, gdy ograniczona jest ilość oraz jakość mrożonego nasienia danego ogiera lub gdy reproduktor o cennych walorach genetycznych nie oddaje oczekiwanych ilości nasienia o pożądanej przeżywalności. Są to także metody pozwalające na maksymalne wykorzystanie potencjału pojedynczych ejakulatów (Samper i Plough, 2010; Pasch i in., 2024).

Istnieje także możliwość inseminowania klaczy nasieniem seksowanym. W takim wypadku, według Lindsey i in. (2002) i Gibb i in. (2017), zaleca się zastosowanie metody, która pozwala na inseminację dawką o obniżonej zawartości plemników, z uwagi na przewidywaną obniżoną jakość nasienia spowodowaną znaczącą ingerencją zewnętrzną na ejakulat oraz wydłużonym czasem od pobrania nasienia do inseminacji. Nasienie sortowane za pomocą cytometrii przepływowej jest szczególnie atrakcyjne dla hodowców i w ochronie ras zagrożonych ze względu na możliwość wyznaczenia pożądanej płci źrebięcia już w momencie inseminacji. W roku 2001 Lindsey i in. zbadali wskaźnik żrebności klaczy inseminowanych świeżym sortowanym nasieniem. Wynosił on tyle samo, co wskaźnik zażrebień nasieniem niesortowanym kriokonserwowanym (37,5%). Dla nasienia sortowanego i kriokonserwowanego było to zaledwie 13% zażrebień. W 2017 roku Gibb i in. po inseminacji nasieniem seksowanym i kriokonserwowanym uzyskali wskaźnik żrebności na poziomie 27%. Wciąż prowadzone są badania nad udoskonaleniem tej przyszłościowej metody. Samper i in. (2025) opracowywali w ostatnim czasie ulepszony proces seksowania nasienia koni. Wyniki wykazały poprawę ruchliwości, żywotności i obniżenie fragmentacji DNA plemników po seksowaniu. Chociaż zaobserwowano niewielki, stały wzrost peroksydacji lipidów w plemnikach sortowanych, jakość plemników w ciągu pierwszych 24 godzin po seksowaniu była porównywalna z jakością nieseksowanego, schłodzonego nasienia. Wskaźniki płodności w przypadku świeżego nasienia nie różniły się między plemnikami seksowanymi a plemnikami konwencjonalnymi.

Skuteczność mrożonego nasienia – wskaźniki zapłodnienia

Istnieje niewiele dostępnych danych porównujących bezpośrednio skuteczność zapłodnienia u koni w zależności od rodzaju użytego nasienia – świeżego, schłodzonego czy mrożonego. W badaniach przeprowadzonych przez Squires i in. (2006) podano, że wskaźniki zapłodnienia wyniosły odpowiednio: 60% dla nasienia świeżego, 44% dla schłodzonego i 46% dla mrożonego. W przypadku inseminacji świeże nasienie ogiera uznawane jest za najskuteczniejsze. Średnie wskaźniki ciąży na jeden cykl wynoszą zazwyczaj od 60% do 76%, a wartości poniżej 60% mogą wskazywać na problemy z płodnością ogiera (Kelly, 2022). Podobnie w artykule opublikowanym na łamach portalu *The Horse*, średni wskaźnik ciąży przy inseminacji świeżym nasieniem wynosi 65–75% na cykl. Poniżej tej granicy płodność ogiera może być uznana za obniżoną (Vigouroux, 2024). Porównując wyniki z trzech opracowań, kolejno z lat 1989, 2004 i 2014, wskaźniki ciąży po inseminacji nasieniem świeżym wahają się pomiędzy 76% a 83% (Vogelsang i in., 1989; Blanchard i in., 2004; Morrell i in., 2014). Z kolei badanie Haadem i in. (2015) wykazało, że 77% klaczy inseminowanych świeżym nasieniem zaszło w ciążę już w pierwszym cyklu. Dla porównania, skuteczność dla nasienia schłodzonego wyniosła 43%. Skuteczność na poziomie 75,7% na cykl przy zastosowaniu schłodzonego nasienia uzyskali Gáspárdy i in. (2020). Z kolei Tanner i Barrell (2023) uzyskali niższy wskaźnik ciąży dla schłodzonego nasienia, wynoszący 44%. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami, gdzie skuteczność inseminacji schłodzonym nasieniem wahała się od 43% do 80% (Squires i in., 2006).

Wskaźniki zapłodnień po użyciu mrożonego nasienia występują w aktualnych wynikach badań naukowych dość rzadko. Według Squires i in. (2006) i Tanner i Barrell (2023) w programach hodowlanych wahają się zazwyczaj od 40% do 60% na jeden cykl rujowy. W artykule przeglądowym z 2022 roku przedstawiono czynniki wpływające na skuteczność inseminacji mrożonym nasieniem, w tym jakość nasienia, liczbę plemników, czas owulacji i doświadczenie technika. Skuteczność wahała się zwykle od 30% do 50% na cykl (Kelly, 2022).

Podsumowanie

Dynamiczny rozwój technik reprodukcyjnych pozwolił na opracowanie wielu zaawansowanych procedur odpowiadających oczekiwaniom hodowców koni. Kontynuacja badań dotyczących optymalizacji protokołów kriokonserwacji nasienia ogierów, z uwagi na znaczące różnice osobnicze, zdaje się być najbardziej konieczna, aczkolwiek na rynku komercyjnym funkcjonują już dobrze sprawdzające się media i procedury do kriokonserwacji. Ochrona bioróżnorodności ras objętych programami ochrony *ex situ* powinna opierać się na najnowocześniejszych metodach, które są w stanie sprostać większości zagrożeń wynikających z malejących populacji chronionych ras. Najlepiej poznaną, podstawową i uniwersalną z nich jest przechowywanie kriokonserwowanego nasienia, które w znaczącym stopniu jest w stanie zabezpieczyć zasoby genetyczne na nieograniczony czas. Każda z omówionych metod biotechnik rozrodu może być pomocna w ochronie zasobów genetycznych, w zależności od zastosowania ich do konkretnych indywidualnych przypadków i potrzeb.

Piśmiennictwo

- Alvarenga M.A., Papa F.O., Landim-Alvarenga F.C., Medeiros A.S.L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Anim. Reprod. Sci.*, 89(1–4): 105–113.
- Amann R.P., Pickett B.W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.*, 7(3): 145–173.

- Aurich J., Kuhl J., Tichy A., Aurich C. (2020). Efficiency of semen cryopreservation in stallions. *Animals (Basel)*, 10(6): 1033; DOI: 10.3390/ani10061033.
- Barrier-Battut I., Kempfer A., Lemasson N., Chevrier L., Camugli S. (2017). Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology*, 15(97): 186–200.
- Batellier F., Magistrini M., Fauquant J., Palmer E. (1997). Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 48(3): 391–410.
- Bergeron A., Manjunath P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod.*, 73(10): 1338–1344; DOI: 10.1002/mrd.20565.
- Blanchard T.L., Thompson J.A., Brinsko S. (2004). Mating mares on foal heat: A five-year retrospective study. *Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*; Denver, CO, USA. 4–8 December 2004, pp. 525–530.
- Bochenek M. (2003). Seksowanie nasienia i ocena jakości plemników – najnowsze osiągnięcia cytometrii przepływowej. *Biotechnologia*, 1(60): 106–115.
- Bradecamp E.A. (2021). Centrifugation of semen: cushion technique. W: *Equine Reproductive Procedures*. Dascanio J.J., McCue P.M. (eds), pp. 557–560.
- Dean C.J., Hobgood A.M., Blodgett G.P., Love C.C., Blanchard T.L., Varner D.D. (2012). The addition of ticarcillin-clavulanic acid to INRA 96 extender for stallion semen cooling. *Equine Vet. J. Suppl.*, (43): 95–99.
- Dordas-Perpinya M., Yanez-Ortiz I., Sergeant N., Mevel V., Bruyas J.F., Catalan J., Delehedde M., Briand-Amirat L., Miro J. (2022). ProAKAP4 concentration is related to sperm motility and motile sperm subpopulations in frozen-thawed horse semen. *Animals (Basel)*, 12(23): 3417.
- Egyptien S., Deleuze S., Ledeck J., Ponthier J. (2023). Sperm quality assessment in stallions: How to choose relevant assays to answer clinical questions. *Animals (Basel)*, 13(19): 3123; DOI: 10.3390/ani13193123.
- Ferrer M.S., Canisso I.F., Ellerbrock R.E., Podico G., Lister B.N., Hurley D.J., Kline K., Palomares R.A. (2020). Optimization of cryopreservation protocols for cooled-transported stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 221: 106581; DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106581.
- Gaitskell-Phillips G., Martin-Cano F.E., Ortiz-Rodriguez J.M., Silva-Rodriguez A., Gil M.C., Ortega-Ferrusola C., Pena F.J. (2021a). In stallion spermatozoa, superoxide dismutase (Cu-Zn) (SOD1) and the Aldo-keto-reductase family 1 member b (AKR1B1) are the proteins most significantly reduced by cryopreservation. *J. Proteome Res.*, 20(5): 2435–2446.
- Gaitskell-Phillips G., Martin-Cano F.E., Ortiz-Rodriguez J.M., Silva-Rodriguez A., Gil M.C., Ortega-Ferrusola C., Pena F.J. (2021b). Differences in the proteome of stallion spermatozoa explain stallion-to-stallion variability in sperm quality post-thaw. *Biol. Reprod.*, 104(5): 1097–1113.
- Gáspárdy A., Renkó E., Somoskői B., Bába A., Cseh S. (2020). Practical experience with artificial insemination (AI) using fresh chilled and frozen semen in mares. *Acta Vet. Hung.*, 68(1): 85–90; DOI: 10.1556/004.2020.00007.
- Gibb Z., Grupen C.G., Maxwell W.M.C., Morris L.H.A. (2017). Field fertility of liquid stored and cryopreserved flow cytometrically sex-sorted stallion sperm. *Equine Vet. J.*, 49(2): 160–166; DOI: 10.1111/evj.12583.
- Haadem C.S., Nødtvedt A., Farstad W., Thomassen R. (2015). A retrospective cohort study on fertility in the Norwegian Coldblooded trotter after artificial insemination with cooled, shipped versus fresh extended semen. *Acta Vet. Scand.*, 14: 57–77.

- Hartwig F.P., Lisboa F.P., Hartwig F.P., Monteiro G.A., Maziero R.R.D., Freitas-Dell'Aqua C.P., Alvarenga M.A., Papa F.O., Dell'Aqua Jr J.A. (2014). Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*, 81(2): 340–346.
- Heitland A.V., Jasko D.J., Squires E.L., Graham J.K., Pickett B.W., Hamilton C. (1996). Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet. J.*, 28(1): 47–53; DOI: 10.1111/j.2042-3306.1996.tb01589.x.
- Hidalgo M. (2025). Sperm vitrification in horses and donkeys. *J. Equine Vet. Sci.*, 145, 105340; DOI: 10.1016/j.jevs.2024.105340.
- Jasko D.J., Little T.V., Smith K., Lein D.H., Foote R.H. (1998). Objective analysis of stallion sperm motility. *Theriogenology*, 30(6): 1159–1167; DOI: 10.1016/0093-691x(88)90291-9.
- Kelley D.E. (2023). Processing stallion semen for on farm use and cooled transport. *Equine Veterinary Education*, 36(1): 12–41
- Kelly G. (2022). Breeding with frozen semen: what are the considerations? *UK-Vet Equine*. 6(2): 68–71; DOI:10.12968/ukve.2022.6.2.68
- Kirk E.S., Squires E.L., Graham J.K. (2005). Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 64(6):1422–1439.
- Kosiniak-Kamysz K. (2007). *Biologia i konserwacja nasienia ogiera*. W: *Biologiczne uwarunkowania wartości rozrodowej samca*, Strzeżek J. (red.), ss. 99–129.
- Kuisma P., Andersson M., Koskinen E., Katila T. (2006). Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the current laboratory methods. *Acta Vet. Scand.*, 48: 14.
- LeFrappier L., Walston L., Whisnant C.S. (2010). Comparison of various extenders for storage of cooled stallion spermatozoa for 72 hours. *J. Equine Vet. Sci.*, 30(4): 200–204.
- Lindsey A.C., Bruemmer J.E., Squires E.L. (2001). Low dose insemination of mares using non sorted and sex-sorted sperm. *Anim. Reprod. Sci.*; 68(3–4): 279–289; DOI: 10.1016/s0378-4320(01)00165-8.
- Lindsey A.C., Morris L.H., Allen W.R., Schenk J.L., Squires E.L., Bruemmer J.E. (2002). Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. *Equine Vet. J.*, 34(2): 128–132; DOI: 10.2746/042516402776767178.
- Manjunath P. (2012). New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim. Reprod.*, 9(4): 809–815.
- Martin J.C., Klug E., Günzel A.R. (1979). Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, (27): 47–51.
- Martin-Cano F.E., Gaitskell-Phillips G., Ortiz-Rodriguez J.M., Silva-Rodriguez A., Roman A., Rojo-Dominguez P., Alonso-Rodriguez E., Tapia J.A., Gil M.C., Ortega-Ferrusola C., Pena F.J. (2020). Proteomic profiling of stallion spermatozoa suggests changes in sperm metabolism and compromised redox regulation after cryopreservation. *J. Proteom.*, 221: 103765.
- Miller C.D. (2008). Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. *Theriogenology*, 70(3): 463–468; DOI:10.1016/j.theriogenology.2008.04.037.
- Morrell J.M., Richter J., Martinsson G., Stuhmann G., Hoogewijs M., Roels K., Dalin A.M. (2014). Pregnancy rates after artificial insemination with cooled stallion spermatozoa either with or without single layer centrifugation. *Theriogenology*, 82(8): 1102–1105; DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.028.
- Müller Z. (1987). Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 35: 121–125.
- Novello G., Podico G., Segabinazzi L., Lima F.S., Canisso I.F. (2020). Stallion semen cooling using native phosphocaseinate-based extender and sodium caseinate cholesterol-loaded cyclodextrin-based extender. *J. Equine Vet. Sci.*, 92: 103104; DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103104.

- Pagl R., Aurich J.E., Müller-Schlösser F., Kankofer M., Aurich C. (2006). Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 degrees C. *Theriogenology*, 66(5): 1115–1122.
- Pasch L., Stefanovski D., Dobbie T., Lewis G., Turner R.M. (2024). Factors affecting pregnancy rates in mares bred with cryopreserved semen. *J. Equine Vet. Sci.*, 141: 105167; DOI: 10.1016/j.jevs.2024.105167.
- Plante G., Lusignan M.F., Lafleur M., Manjunath P. (2015). Interaction of milk proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 13: 92.
- Podico G., Spencer K.M., Magalhaes H.B., Canisso I.F. (2023). Semen quality of the first and second ejaculates collected from breeding inactive stallions after cooling and freezing. *Vet. Sci.*, 10(3): 173; DOI: 10.3390/vetsci10030173
- Ponthier J., Desvals M., Franck T., de la Rebiere de Pouyade G., Spalart M., Palmer E., Serteyn D., Deleuze S. (2012). Myeloperoxidase in equine semen: Concentration and localization during freezing processing. *J. Equine Vet. Sci.*, (32): 32–37.
- Ponthier J., Teague S.R., Franck T.Y., de la Rebiere G., Serteyn D.D., Brinsko S.P., Love C.C., Blanchard T.L., Varner D.D., Deleuze S.C. (2013). Effect of non-sperm cells removal with single-layer colloidal centrifugation on myeloperoxidase concentration in post-thaw equine semen. *Theriogenology*, 80(9): 1082–1087; DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.009.
- Ponthier J., Franck T., Parrilla-Hernandez S., Niesten A., de la Rebiere G., Serteyn D., Deleuze S. (2014). Concentration, activity and biochemical characterization of myeloperoxidase in fresh and post-thaw equine semen and their implication on freezability. *Reprod. Domest. Anim.*, 49(2): 285–291.
- Pukazhenthil B.S., Johnson A., Guthrie H.D., Songsasen N., Padilla L.R., Wolfe B.A., Coutinho da Silva M., Alvarenga M.A., Wildt D.E. (2014). Improved sperm cryosurvival in diluents containing amides versus glycerol in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalski*). *Cryobiology*, 68(2): 205–214.
- Ramires N.C., Sancler -Silva Y.F.R., Resende H.L., Guasti P.N., Monteiro G.A., Papa P.M. et al. (2015). Control methods and evaluation of bacterial growth on fresh and cooled stallion semen. *J. Equine Vet. Sci.*, 35(4): 277–282.
- Rečková Z., Filipčík R., Soušková K., Kopec T., Hošek M., Pešan V. (2022). The efficiency of different types of extenders for semen cooling in stallions. *Anim Biosci.*, 35(5): 670–676; DOI: 10.5713/ab.21.0300.
- Samper J.C., Plough T. (2010). Techniques for the insemination of low doses of stallion sperm. *Reprod. Domest. Anim.*, 2: 35–39; DOI: 10.1111/j.1439-0531.2010.01632.x.
- Samper J.C., Hellander J.C., Crabo B.G. (1991). Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 44: 107–114.
- Samper J.C., Hernandez Aviles J.C., Ramirez-Agamez L.F., Love C.C., Gonzalez-Marin C., Fleury P., Dini P., De La Fuente A., Foss R., Campos F.L., Ross P.J. (2025). The use of sex-sorted semen in horses. *J. Equine Vet. Sci.*, 145:105251; DOI: 10.1016/j.jevs.2024.105251.
- Sieme H., Oldenhof H., Wolkers W.F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim. Reprod. Sci.*, 169: 2–5. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.004.
- Smits K., Hoogewijs M., Woelders H., Daels P., Van Soom A. (2012). Breeding or assisted reproduction? Relevance of the horse model applied to the conservation of endangered equids. *Reprod. Domest. Anim.*, 4: 239–248; DOI: 10.1111/j.1439-0531.2012.02082.x
- Squires E., Barbacini S., Matthews P., Byers W., Schwenzer K., Steiner J., Loomis P. (2006). Retrospective study of factors affecting fertility of fresh, cooled and frozen semen. *Equine Vet. Educ.*, 18(2): 96–99.

- Tanner J.C., Barrell G.K. (2023). Reproductive performance of a cohort of Standardbred mares under a commercial breeding system. *Equine Vet. J.*, 56(4): 776–785; DOI: 10.1111/evj.13989.
- Tischner M. (2010). Weterynaryjne i hodowlane aspekty rozrodu koni – Ogier. Wyd. URK, ss. 41–57, 109–130, 148–159.
- Varner D.D. (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, 70(3): 448–462; DOI:10.1016/j.theriogenology.2008.04.023.
- Vigouroux L. (2024). The Horse. Improving Equine Fertility; <https://thehorse.com/1108873/improving-equine-fertility>
- Vogelsang M.M., Vogelsang S.G., Lindsey B.R., Massey J.M. (1989). Reproductive performance in mares subjected to examination by diagnostic ultrasound. *Theriogenology*, 32(1): 95–103; DOI: 10.1016/0093-691X(89)90525-6.
- Whitesell K., Stefanovski D., McDonnell S., Turner R. (2020). Evaluation of the effect of laboratory methods on semen analysis and breeding soundness examination (BSE) classification in stallions. *Theriogenology*, 142: 67–76. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.035.
- Wilhelm K.M., Graham J.K., Squires E.L. (1996). Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology*, 46(4): 559–578

Zatwierdzono do druku: 31 III 2026

THE USE OF CRYOPRESERVED SEMEN IN THE *EX SITU* CONSERVATION OF EQUINE GENETIC RESOURCES

Julia Warchoł, Piotr Gogol

SUMMARY

Ex situ conservation, alongside *in situ* conservation, is a crucial element of livestock genetic resources conservation. Cryopreserved biological material collected in gene banks constitutes a reserve gene pool that safeguards the biodiversity of populations in emergency situations, such as breed extinction or disease epidemics. In Poland, seven horse populations are protected: Małopolski, Wielkopolski, Silesian, Sokólski, Sztumski, Hucul and Polish Konik. Although natural mating is required for the reproduction of these breeds, in justified cases it is recommended to obtain and store frozen semen from selected stallions in order to maintain the continuity of breeding lines. In order for the collection of stallion semen to be effectively used in the future as part of breed conservation efforts, it is necessary to pay close attention not only to the quantity but also to the quality of the cryopreserved material. This article presents current research directions in improving cryogenic preservation of stallion semen and the development of insemination techniques that may be particularly useful in the reproduction of endangered horse breeds.

Keywords: horses, heritage breeds, stallion semen cryopreservation, biodiversity, *ex situ* conservation