

УДК 636.59.082.454:598.281.7

**УДОСКОНАЛЕННЯ СПОСОБІВ ЗАБОРУ СПЕРМИ ТА ОСНОВНІ
ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕЯКУЛЯТУ ЯПОНСЬКОГО ПЕРЕПЕЛА
(COTURNIX JAPONICA).**

Ю.І.ЛЕСНЯК, аспірант*

Л.І. КАЛАКАЙЛО, магістр

В.Г. СПИРИДОНОВ, доктор сільськогосподарських наук

М.Д. МЕЛЬНИЧУК, доктор біологічних наук, академік

Розглянуто основні підходи для успішного забору сперми японських перепелів, охарактеризовано якісні та кількісні показники їх еякуляту. З'ясовано, що стимуляція самців з використанням самиці є найбільш ефективною методикою з максимально якісними показниками: великим об'ємом еякуляту, високою концентрацією та великою кількістю живих морфологічно нормальних сперматозоїдів, що дуже важливо для дослідження репродуктивних особливостей перепелів.

Ключові слова: японський перепіл, способи забору сперми, якісні показники сперми, еякулят.

Японський перепел є одним з найпопулярніших видів птахів, який широко використовується не тільки як свійська птиця для отримання яєць і м'яса, але й в як лабораторна тварина, а також як модель для наукових досліджень. Дорослі птахи є відносно невеликими: маса тіла коливається від 100 до 200 г, а щоденне споживання корму від 20 до 30 г на особину. Самиці починають відкладати яйця в 6 тижневому віці. Репродуктивний період триває 10-12 місяців, за який самиці можуть знести близько 300 яєць. Інкубаційний період становить 17-18 днів, що дає можливість отримувати за рік близько чотирьох поколінь птахів.

Простота в обслуговуванні, низькі витрати корму, короткий інкубаційний період, швидке відтворення птахів робить цей вид зручною моделлю для експериментів з генетики, ендокринології, ембріології та фізіології.

Простий і ефективний спосіб забору сперми й осіменіння необхідні для того, щоб ефективно використовувати перепелів у дослідженнях та на виробництві. Дорзальний масаж живота найчастіше використовується для забору еякуляту у птахів (1 - 4). Проте, наші експерименти на перепелах показали, що за дорзального масажу живота отримано невеликі обсяги еякуляту (14 мкл у середньому) із низькою концентрацією сперматозоїдів (596×10^6 мл⁻¹). Тому для ефективного забору сперми можна застосовувати стимулювання самця з використанням самиці, що в подальшому успішно було використано в наших експериментах.

Мета дослідження - оцінити ефективність стимуляції самців з використанням самиць для забору еякуляту у японських перепелів, здійснити спостереження за реакцією самців та їх відповіддю на цю процедуру, а також провести кількісну та якісну оцінку основних параметрів еякуляту.

Матеріали та методи дослідження. У дослідженні були використані 30 самців японських перепелів і 10 самиць для стимуляції. Самців утримували в окремих клітках, а самиць групами при кімнатній температурі (22° С) та 14год./10год. циклі світло/темрява. Вода і збалансований за вітамінами та мінералами корм були доступні птахам без обмежень.

Експеримент проводили у два етапи. Під час першого 30 статевозрілим самцям (10-11 тижневого віку) 3-4 рази на тиждень робили дорзоабдомінальний масаж для оцінки їхньої реакції на забір сперми. Після цього відібрали 10 самців з найшвидшою ерекцією та еякуляцією, від яких під час другого етапу експерименту після використання самиць для їх стимуляції одержували сперму (рис. 1). У момент інтенсивного збудження спостерігався характерний вигин спини самця, після чого його швидко забирали від самиці, щоб запобігти зляганню, і відразу масували бічні стінки

клоаки, статевий орган дещо вивертався назовні і невдовзі з'являлась сперма. Від кожного самця здійснено 10 заборів сперми. Самиці, які використовувались для стимуляції самців були репродуктивного віку і характеризувались спокійним темпераментом, дозволяючи самцям швидко на них підніматися.



Рис 1. Стимуляція самця за допомогою самки.

Забір сперми від кожного самця здійснювали два рази на тиждень. Для забору еякуляту використовували дозатор. У більшості випадків для максимальної ефективності та зручності процедуру проводили два оператори.

У свіжозібраній спермі оцінювали такі показники: об'єм, колір, в'язкість еякуляту, концентрацію та морфологію сперматозоїдів, а також наявність кров'яних виділень і фекалій.

Концентрацію сперматозоїдів визначали за допомогою камери Маклера. Морфологію сперматозоїдів вивчали за допомогою фарбування за Романовським-Гімзою (13). У кожному мазку 300 сперматозоїдів розділяли на сім класів, серед них шість були представлені живими сперматозоїдами з такими ознаками: морфологічно нормальні, з патологією голівки, з патологічними шийками, з незначними відхиленнями в морфології,

сперматиди, сперматозоїди з іншими деформаціями, а також мертві сперматозоїди, наявність яких аналізували за допомогою мазків зафарбованих еозином (14). Крім того, у другому етапі експерименту визначали швидкість і тип реакції самців на забір сперми. Для того, щоб забезпечити достовірно якісну оцінку еякуляту було запропоновано, такий показник як фактор якості сперми (ФЯС), який розраховували за такою формулою:

$$\text{ФЯС} = \frac{\text{концентрація сперми (n} \times 10^6 \text{ мл}^{-1}) \times \text{об'єм еякуляту (мл)} \times \text{живі нормальні сперматозоїди (\%)}}{100\%}$$

Результати досліджень та їх обговорення. На основі реакції самців, процедуру забору сперми було розділено на чотири категорії: 1) самці, які дуже збуджувались відразу після розміщення на спині самиці, намагались злягатись і давали якісну сперму (категорія «а»); 2) перепели, від яких еякулят одержували за тривалішої стимуляції - близько 30 с (категорія «б»); 3) для стимуляції необхідно було понад 60 с, при цьому самці давали невеликий об'єм сперми змішаний з піною або забруднений кров'ю чи фекаліями (категорія «в»); 4) самці не реагували на присутність самки(категорія «г»).

Для штучного осіменіння використовували самців тільки категорії «а» і «б» (рис. 2).



Рис 2. Демонстрація виділення сперми самцем японського перепела після стимуляції з використанням самки.

Перепелина сперма за щільністю і зовнішнім виглядом була схожою на згущене молоко. Еякулят дуже збудливих самців часто був забруднений кров'ю.

Найважливішим показником для характеристики еякуляту вважається фактор якості сперми (ФЯС), який складається з трьох основних параметрів і дуже зручний для адекватної оцінки якості еякуляту.

Характеристику нативного еякуляту самців японських перепелів, зібраного після стимуляції з використанням самки, можна представити такими усередненими даними: 1) *концентрація сперми* – $678,0 \pm 196,08 \times 10^6$ мл^{-1} ; 2) *об'єм еякуляту* – $0,026 \pm 0,011$ мл; 3) *фактор якості сперми (ФЯС)* – $15,3 \pm 8,64$; 4) *класи сперматозоїдів*: а) кількість живих сперматозоїдів – $92,1 \pm 3,86$ %, б) морфологічно нормальні – $82,2 \pm 5,63$ %, в) патологія голівки – $3,1 \pm 1,90$ %, г) патологія шийки – $1,9 \pm 0,97$ %, д) незначні відхилення – $1,2 \pm 0,64$ %, е) інші деформації – $5,0 \pm 2,76$ %.

Висновки

1) За штучного осіменіння японського перепела, стимуляція самців з використанням самиці є ефективнішим методом для забору сперми порівняно з дорзоабдомінальним масажем. Цей метод стимуляції самців сприяв швидкій еякуляції, яка відбувалась протягом декількох секунд.

2) Під час застосування обох методик успіх залежав від вибору самця. Присутність сторонніх та незвичних предметів негативно впливала на реакцію самців і якість сперми.

3) За використання методу з абдомінальним масажем слід бути терплячим та спокійним, а при застосовуванні методики з використанням стимуляції самицями – слід бути уважними, щоб не пропустити момент, коли самця слід зняти з самиці, оскільки доволі часто цей момент складно проконтролювати. Знання пташиної поведінки, а також досвід правильного масування бічних стінок клоаки самця є дуже важливими для отримання очікуваного результату.

4) Для того, щоб самці звикли до процедури забору сперми необхідно 2 тижні.

5) Швидкий та правильний забір сперми у самців залежить від швидкості їхньої реакції на присутність самиці. За цією ознакою здійснювали добір самців. Для підвищення сексуального потягу їх утримували окремо від самиць.

6) Спостерігались несуттєві відмінності за кількісними та якісними характеристиками сперми самців перепелів на відміну від інших видів птахів (20).

7) Стимуляція самців з використанням самиць дала можливість отримувати еякулят з максимально якісними показниками: великим об'ємом сперми, високою її концентрацією та великою кількістю живих морфологічно нормальних сперматозоїдів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Burrows W.H. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. / W.H. Burrows, J.P. Quinn // *Poult. Sci.*, 1937; 16: 19-24.
2. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. / J.M. Blanco, G. Gee, D.E. Wildt, A.M. Donoghue // *Biol. Reprod.* – 2000 – 63. – 1164-1171.
3. Lukaszewicz E. Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa. / E. Lukaszewicz // *Theriogenology*, – 2001. – 55. – 1819-1829.
4. Wineland J. Management of broiler breeders for artificial insemination. First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. Bakst M.R., Wishart G.J., Eds. Beltsville. Maryland, 1994. 59-65.
5. Wentworth B.C. Egg production and fertility following various methods of insemination in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). / B.C. Wentworth, W.J. Mellen, // *J. Reprod. Fertil.* – 1963. – 6. – 215-220.
6. Kulenkamp A.W. Artificial insemination of Bobwhite quail. Br. / Kulenkamp A.W., Coleman T.H., Ernst R.A. // *Poult. Sci.*, 1967. – 8. – 177-182.
7. Marks H.L. A procedure for artificial insemination of Japanese quail. / Marks H.L., Lepore P.D. // *Poult. Sci.*, 1965. – 44. – 1001-1003.
8. Ogasawara F.X. A modified method of artificial insemination in the production of chicken - quail hybrids. / Ogasawara F.X., Huang R. // *Poult. Sci.*, 1963. – 42. – 1386-1392.
9. Romaniszyn K. Quality of semen and selected testometric features in male Japanese quails. / Tarasewicz Z., Udała, J., Szczerbínska D., Danczak A. // *Anim. Reprod. Rev.*, 1997. – 31. – 179-184.
10. The effect of semen collection from Japanese quail males (*Coturnix coturnix japonica*) on some biological traits of semen. / Chelmońska B., Jerysz A., Pokorny P., Ujma M. // *ZN Przeglądu Hodowlanego PTZ.* – 1997. – 31. – 274-276.

11. Che.lmo.nska, B., Ga.luszka, H., Dzieciuchowicz, M.: Instruction: Turkeys insemination. Warszawa, 1965; 1-28 (in Polish).
12. Che.lmo.nska B. Instruction of semen collection from Muscovy drake and duck artificial insemination. / Che.lmo.nska B., Dymkowska B., Jerysz A. // Agricultural University, Wroc.law, 1988. – 1-38 (in Polish).
13. Ja.skowski L. An attempt on evaluation of the amount of active spermatozoa in semen with the use of contrast staining. / Ja.skowski L. // Zeszyty Problemowe Postępow Nauk Rolniczych. – 1966. – 67. – 119-122 (in Polish).
14. Effect of light source on characteristics of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) semen. / [Gwara T., Walczak M., .Lukaszewicz E., Che.lmo.nska B.] // Zesz. Nauk. AR we Wroc.lawiu, Zootechnika L., 2004. – 488. – 103-109.
15. Kowalczyk A. Analysis of changes in morphology, biochemistry and fertilizing ability of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) spermatozoa in semen subjected to cryopreservation process. PhD Thesis. / A. Kowalczyk // Wroclaw University of Environmental and Life Sciences. – 2006 (in Polish).
16. Che.lmo.nska B. Observations on semen collection from drakes by dorso-abdominal massage method. / Che.lmo.nska B., Ga.luszka H. // Zeszyty Problemowe Postępow Nauk Rolniczych, 1966. – 61. – 273-277 (in Polish).
17. Michel, I.T.: Management of roosters for semen production: ideas from an independent grower. First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. Bakst, M.R., Wishart G.J., Eds., Belstville. Maryland, 1994; 51-58.
18. Che.lmo.nska, B., Radzanowska, G., Koch, E., Chrzanowska, M.: Aspartate transaminase activity in semen plasma and spermatozoa morphological picture in ganders and cocks reared as single or in a group. Wyniki Prac Badawczych Zak.ladu Hodowli Drobiu IZ, 1984; 10: 181-190 (in Polish).
19. Lukaszewicz E. Evaluation of fresh and frozenthawed semen of individual ganders by assessment of spermatozoa motility and morphology. / Lukaszewicz E., Kruszy.nski W. // Theriogenology, 2003. – 59. – 1627-1640.

20. Hazary R.C. Application of an MTT reduction assay for assessing sperm quality and predicting fertilizing ability of domestic fowl semen. Br. Hazary R.C., Chaudhuri D., Wishart G.J. Poult. Sci., 2001. – 42. – 115-117.

21. Baumgartner J.: Prepelica japonska ako laboratorne zvieria. Veterinarstvo, 1990; Serie C: 70–72 (in Slovak).

22. Fujihara, N., Koga, O.: Physiological function of the dorsal proctodeal gland foam of the male quail. World Quail Conf., Tartu-Tallin, 1991. – 78-83.

23. Bunaciu, M., Bunaciu, P., Cimpeanu, I.: The influence of mating designed on the reproductive performance in Japanese quail. 9th European Poult. Conf., Glasgow, 1994. – Vol. 1; 314-316.

24. Buxton J.R. Enzymes and electrolytes in the semen of Japanese quail. / Buxton J.R., Orcutt F.S.Jr. // Poult. Sci., 1975. – 54. – 1556-1566.

25. The effect of dimethylacetamide level on morphology and fertilizing ability of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) spermatozoa. / Che.lmo.nska, B., .Lukaszewicz, E., Kowalczyk, A., Jerysz, A. // Theriogenology, 2006. – 65. – 451-458.

26. Brozek C., Knothe A. A study on some abnormalities of Japanese quail spermatozoa. / Brozek C., Knothe A. // Acta Biol. Cracoviensia, Zool., 1974. – 17. – 77-83.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБОВ ЗАБОРА СПЕРМЫ И ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭЯКУЛЯТА ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА (*COTURNIX JAPONICA*).

Лесняк Ю.И., Калакайло Л.И., Спиридонов В.Г., Мельничук М.Д.

Рассмотрены основные подходы для успешного забора спермы японских перепелов, охарактеризованы качественные и количественные показатели их эякулята. Выяснено, что стимуляция самцов с использованием самки есть наиболее эффективной методикой с максимально качественными показателями: большим объемом эякулята, высокой концентрацией и большим количеством живых морфологически нормальных сперматозоидов, что является очень важным для исследования репродуктивных особенностей перепелов.

Ключевые слова: японский перепил, способы забора спермы, качественные показатели спермы, эякулят.

IMPROVED METHODS OF SEMEN COLLECTION AND THE MAIN CHARACTERISTICS OF THE EJACULATE OF THE JAPANESE QUAIL (COTURNIX JAPONICA).

Lesniak Y.I., Kalakaylo L.I., Spiridonov V.G., Melnichuk M.D.

The main approaches for the successful collection of Japanese quails sperm with female stimulation and describing the qualitative and quantitative characteristics of ejaculate. It was established that stimulation of males using females is the most effective method of maximum quality characteristics: a large volume of ejaculate, and a high concentration of a large number of live morphologically normal sperm is very important to study the reproductive characteristics of quail.

Keywords: Japanese quail, semen collection, characteristics of sperm, ejaculate.