

9. SZAPORODÁSBIOLÓGIAI TALÁLKOZÓ

**BALATONFÜRED,
2002. november 8–9.**

A MEGÚJULÓ SZAPORODÁSBIOLÓGIA

THE RENEWING REPRODUCTION BIOLOGY

Vendégszerkesztő (Guest editor):

Barna Judit

AZ X- ÉS Y-KROMOSZÓMA MIKROSKÓPOS FELISMERÉSE BIKAONDÓSEJTEKBE (IRODALMI ÁTTEKINTÉS)

RÉVAY TAMÁS — P. TARDY ERIKA — MOHAMED HASSANANE —
NAGY SZABOLCS — EDVI M. ERIKA — HIDAS ANDRÁS — WILLEM RENS —
INGEMAR GUSTAVSSON — KOVÁCS ANDRÁS

ÖSSZEFOGLALÁS

Az ivarspecifikus és ivarorientált spermaminták ellenőrzésének korszerű laboratóriumi módszere az X- és Y-kromoszómák azonosítása az ondósejtek fejében különböző színű fluoreszcens in situ hibridizációval. Ismertetik az X- és Y-specifikus DNS-próbák előállításának és jelölésének különböző módszereit. A kettős jelölést bikaspermán elsőként közölték. A bikaondósejtek ivarának és élő/elhalt státuszának egyidejű értékeléséről az idén számoltak be.

SUMMARY

Révay, T. – P. Tardy, E.Ms. – Hassanane, M. – Nagy, Sz. – M. Edvi, E.Ms. – Hidas, A. – Rens, W. – Gustavsson, I. – Kovács, A.: MICROSCOPIC IDENTIFICATION OF X-AND Y-CHROMOSOMES IN BOVINE SPERMATOZOA (METHODOLOGICAL REVIEW)

Identification of the X- and Y-chromosomes in the heads of spermatozoa by fluorescence in situ hybridization (FISH) with different colours is the most modern method of laboratory control of sex-determined, or sex-oriented semen samples. Different methods for producing and labeling X- and Y-specific DNA-probes are discussed. Dual labeling of bovine spermatozoa was first published by the authors. Simultaneous evaluation of sex and viability status of bovine spermatozoa was published this year.

A tejtermelés és a szaporaság a nőivarhoz kötött, míg a hústermelésben a hímivar van fölényben. Az X-, illetve Y-kromoszómát hordozó spermiumok arányának eltolása (ivarorientált sperma), vagy szeparálásuk (ivardeterminált sperma) alapvetően változtatná meg a szarvasmarha-tenyésztés stratégiáját (Horn és mtsai, 1974; Blottnér és mtsai, 1990; McEvoy, 1992).

Az X-kromoszómát hordozó bikaondósejtek teljes DNS-tartalma 3–4%-kal haladja meg a hímneműekét, ennek alapján áramlási citometriával megoldották akár 95%-os tisztaságú ivar szerinti elválasztásukat. Az így előállított ivardeterminált spermával végzett termékenyítésből a várt arányban a kívánt ivarú borjak születtek (Johnson, 1995), de az előállítható termékenyítő adagok száma korlátozott és azok fertilitása csökkent (McEvoy, 1992; Maxwell és mtsai, 1996; Cunningham, 1999; Caballero és mtsai, 2002; Garner és Suh, 2002).

Más módszerek közül ülepítés után számoltak be arról, hogy az alsó frakcióból 2/3 arányban üszők, míg a felsőből hasonló arányban bikaborjak születtek (Bhattacharya, 1958, 1962; Schilling, 1966; Knaack, 1968; Iváncsics, 1973, 1978). Az egyszerű és olcsó ülepítés az ekvibrációs időben jól beépíthető a mélyhűtési technológiába, a fertilitást számottevően nem befolyásolja, de a közölt ivararányok ismételtetősége bizonytalan.

Az X- és Y-ondósejtek elkülönítésre más módszereket - centrifugálás hígítóban és különböző gradiensekben (albumin, Percoll, cukor), a sejtek felúsztá-

tása (swim-up), elektroforézis és felületi eltéréseken (hidrofobicitás, ivarspecifikus felületi antigének) alapuló megoszlás és immunreakció — is kipróbáltak, de a szarvasmarha esetében nem számoltak be ismételt eredményekről (McEvoy 1992; Cumming, 2002).

Az elkülönítés bármely módjának laboratóriumi ellenőrzése olcsóbb, gyorsabb és statisztikai szempontból is jobb, mint a termékenyítés után kilenc hónappal megszülető borjak ivararánya. Egy ilyen módszer az elkülönítés hatásának azonnali értékelése révén lehetővé teszi a folyamatos kutatást.

A hímnemű ondósejtek ivarának azonosítását először Y-kromoszóma-specifikus izotóppal jelzett DNS-próbákkal történő *in situ* hibridizációval oldották meg (Schwerin és mtsai, 1991). A technika a radioaktív Y-próba detektálásának hosszadalmassága és az X-kromoszómát hordozó ondósejtek jelölésének hiánya miatt a gyakorlatban nem terjedt el.

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH, Pinkel és mtsai, 1986) lehetővé tette kettő, vagy több különböző kromoszóma gyorsabb, egyidejű azonosítását. Az ondósejtek fejének és kromatin állományának fellazítása után (papainos emésztés) a hődenaturált DNS- molekulához, a vizsgálandó szakasszal homológ, jelzett DNS-próbát hibridizálunk. Nagyobb próba esetén direkt fluoreszcens jelölést, kisebbnél indirekt detektálás alkalmazhatunk. Ekkor a DNS-próbához egy közvetítő nem-fluoreszcens molekulát kapcsolunk (haptén), ami a leggyakrabban biotin vagy digoxigenin. A beépített biotin molekulákra specifikus avidin fehérjéhez, a digoxigeninre pedig specifikus antitestekhez kapcsolható a fluorokrom. Az egyes próbák eltérő színű fluoreszcens festékekkel jelölhetők. Az ember és az egér bármely kromoszómáját, vagy azok részeit specifikusan jelölő próbák több cégtől is beszerezhetők, míg a haszonállatoknál ez csak napjainkban kezd megvalósulni. Ezért az egyes munkacsoportok különböző módszerekkel előállított saját próbát használtak. Az X- és Y- szarvasmarha ondósejtek egyidejű jelölését elsőként Hassanane és mtsai (1999) oldották meg. Az Y-próbát öt Y-kromoszóma metafázisos preparátumokról mikromanipulátorral történt levakarása után, azok DNS-ét polimeráz láncreakcióval (PCR) sokszoroztva és digoxigeninnel jelölve állították elő, míg az X-kromoszómát klónozott DNS-próbával (cosmid, PL44) jelölték. A mikromanipuláció nagy gyakorlatot, biztos kezet kíván, hiszen más kromoszómák akár csak megérintése a túvel szennyezést, nonspecifikus hibridizációs jelet eredményez. Az üvegtúvel izolált néhány kromoszómafragmens tömör szerkezetét topoizomeráz I kezeléssel kissé kitekerjük, majd a PCR sokszorozáshoz ún. random primert használunk, amely képes bármely, a reakciócsőben található DNS-t rövid fragmensek (átlag 300bp) formájában megsokszorozni. Ez egyben rávilágít a technika kivitelezéséhez elvárt extrém sterilitás szükségességére is, hiszen minden szennyező DNS bekerül a később még PCR-el jelölt próba szekvenciájába. További hátrány, hogy Y-próba ezzel a módszerrel csak limitált mennyiségben állítható elő, szükségessé téve az egész eljárás változó sikerű ismétlését.

A különböző nagy méretű klónok (cosmid, BAC=bakteriális-, YAC=élesztő mesterséges kromoszóma) egyszerűen kezelhető, érzékeny hibridizációs próbaként használhatók, azonban meg kell említeni a klónok folyamatos fenntartásának, szaporításának, a DNS sejtekből történő izolálásának munka és labor igényét. Mindez ugyanakkor eltörpül a klóntár létrehozásának, egy-egy kromoszóma specifikus klón szelekciójának költség-, idő- és munkaigénye mellett.

Piumi és mtsai (2001) az Y-kromoszóma felismerésére egy rövid, ismétlődő szekvenciákat tartalmazó próbát használtak (BRY4a), míg a másik ivari kromoszóma evolúciós konzerváltságát kihasználva a szarvasmarha X-kromoszómáját kecske BAC-próbával jelölték.

Az Y-kromoszóma jelölésére jól használhatóak a különböző repetitív szekvenciák. A rövid ismétlődő „szekvenciamag” genomiális DNS-templátból kiindulva egyszerű PCR-el megsokszorozható, indirekt módon jelölhető és érzékenyen detektálható. *Révay és mtsai* (2000) a BC1.2 lókuszt jelölték a szarvasmarha ondósejtekben. A módszer egyszerű és olcsó, továbbá rokon fajokon (jak, bivaly) is használható (*Révay és mtsai*, 2002a,b). Bár statisztikailag bizonyított ez utóbbi próba megbízható felhasználása a szexálásra, a nem jelölt hímvarsejtek ivarára csak következtethetünk. Célszerű tehát olyan hibridizációs rendszert összeállítani, amely mindkét ivari-kromoszómát vizsgálni képes.

Rens és mtsai (2001) a teljes X- és Y-kromoszómát jelölő „painting” próbát állítottak elő a szeparált szarvasmarha spermiumok elválasztásának ellenőrzésére. Az áramlási citometriával elkülönített jak X- és Y-kromoszómákat a már említett random PCR eljárással sokszorosították és jelölték. Az Y-próba direkt, az X- pedig indirekt jelölést kapott.

A spermiumszeparálási eljárások a sejtek életképességére is eltérően hatnak. *Révay és mtsai* (2002c) a bikaondósejtek membrán-integritásának és ivari kromoszóma tartalmának kombinált vizsgálatára alkalmas módszert írtak le. Tripánkék/Giemsza festés (*Kovács és Foote* 1992) után végzett papainos kezelés hatására a festetlen élő ondósejtek feje kétszeresre duzzad, míg a tripánkékkel festett elhalt fejek nem dekonzenálhatók. Az ezt követő FISH során az egyes sejtekhez hozzárendeljük az ivari-kromoszómákat. Az ondósejtek fejének eltérő mérete mellett az alkalmazott DAPI (diamino-fenilindol) háttérfestés színe is eltérő, a nagy élők sötét ibolya, míg a kisebb elhaltak világoskék színűek. Így az egyes sejtek neme és élő/elhalt státusza egyszerre ismerhető fel a fluoreszcens mikroszkópban. A módszer az ivarspecifikus spermaminták ellenőrzésére használható.

IRODALOM

- Bhattacharya, B.C.*(1958): Sex control in mammals. Z. Tierzucht. Züchtbiol., 72. 250–254.
- Bhattacharya, B.C.*(1962): Differential sedimentation rates of X- and Y-spermatozoa and predetermination of sex. Z. Wiss. Zool. A., 166. 204–250.
- Blotner, S. – Schwerin, M. – Matzel, J. – Nehring, H. – Pitra, C.*(1990): Predetermination of sex in mammals: new prospects? Biol. Zentralbl., 109. 425–445.
- Caballero, J. – Aguilar, J. – Cattaneo, L. – Perez, S.*(2002): Effect of incubation and flow cytometry on membrane integrity and mitochondrial function of bovine sperm. Theriogenology, 57. 744.
- Cumming, I.R.*(2002): The separation of mammalian sperm according to sex chromosome content. Anim. Breed. Abst., 70. 13–26.
- Cunningham, E.P.*(1999): The application of biotechnologies to enhance animal production in different farming systems. Livest. Prod. Sci., 58. 1–24.
- Garner, D.L. – Suh, T.K.*(2002): Effect of Hoechst 33342 staining and laser illumination on the viability of sex-sorted bovine sperm. Theriogenology, 57. 746.
- Hassanane, M. – Kovács, A. – Laurent, P. – Lindblad, K. – Gustavsson, I.*(1999): Simultaneous detection of X- and Y- bearing Bull spermatozoa by double colour fluorescence *in situ* hybridization. Mol. Reprod. Dev., 53. 407–412.
- Horn, A. – Dunai, A. – Bozó, S. – Deák, M.*(1974): Az ivararány befolyásolásának lehetősége és következménye a gazdasági állatok tenyésztésében. Állattenyésztés, 23. 35–42.

- Iváncsics, J.(1973): Vizsgálatok a szarvasmarha ivararányának befolyásolására. A Mezőgazdaságtudományi Kar Közleményei, 16. 61–68.
- Iváncsics, J.(1978): Kísérletek az ivarspecifikus sperma előállítására és felhasználására az állattenyésztésben. Kandidátusi értekezés, Mosonmagyaróvár
- Johnson, L.A.(1995): Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7. 893–903.
- Knaack, J.(1968): Sperm dimorphism in cattle. *Fortpfl. Besam. Aufzucht Haustiere*, 4. 256–269.p.
- Kovács, A. – Foote, R.H.(1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotechn. Histochem.*, 67. 119–124.
- Maxwell, W.M.C. – Welch, G.R. – Johnson, L.A.(1996): Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8. 1165–1168.
- McEvoy, J.D.(1992): Alteration of the sex ratio. *Anim. Breed. Abstr.*, 60. 97–111.
- Pinkel, D. – Straume, T., – Gray, J.W.(1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence in situ hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 89. 1388–1392.
- Piumi, F. – Vaiman, D. – Cribiu, E.P. – Guérin, B. – Humblot, P.(2001): Specific cytogenetic labeling of bovine spermatozoa bearing X or Y chromosomes using fluorescent in situ hybridization (FISH). *Genet. Sel. Evol.*, 33. 89–98.
- Rens, W. – Yang, F. – Welch, S. – O'Brien, P.C.M. – Solanky, N. – Johnson, L.A. – Ferguson-Smith, M.A.(2001): An X-Y paint set and sperm FISH protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures. *Reproduction*, 121. 541–546.
- Révay, T. – P. Tardy, E. – Tóth, A. – Kovács, A. – Salgó, A.(2000): Sexing bovine cells by FISH with a synthetic Y-probe. 14th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals, Brno
- Schilling, E.(1966): Experiments in sedimentation and centrifugation of bull spermatozoa and their sex ratio of bor calves. *J. Reprod. Fertil.*, 11. 469–472.
- Schwerin, M. – Blotner, S. – Thomsen, P.D. – Roschlau, D. – Brockmann, G.(1991): Quantification of Y chromosome bearing spermatozoa of cattle using *in situ* hybridization. *Mol. Reprod. Dev.*, 30. 39–43.

Szerzők címe: Révay, T.: Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
 Authors' address: Biokémiai és Élelmiszertudományi Tanszék
 Budapest University of Technology and Economics,
 Department of Biochemistry and Food Technology
 H-1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3.
 P. Tardy, E.: Semmelweis Egyetem, Egészségtudományi Kar,
 Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika,
 Semmelweis University, Faculty of Health Science,
 Department of Obstetrics and Gynecology
 Hassanane, M.: National Research Center, Dokki, Giza, Egyiptom
 Edvi, M.E. – Hidas, A.: Kisállattenyésztési Kutatóintézet
 Institute for Small Research
 H-2101 Gödöllő, Pf. 417.
 Nagy, Sz. – Kovács, A.: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
 Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
 H-2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.
 Rens, W.: University of Cambridge, Department of Clinical Veterinary
 Medicine, Anglia Cambridge
 Gustavsson, I.: Swedish University of Agricultural Sciences,
 Department of Animal Breeding and Genetics,
 Centre of Reproductive Biology in Uppsala, Svédország

SPERMAÉRTÉKELÉS PETEBUROK KÖTÖDÉSI TESZT SEGÍTSÉGÉVEL *

SZABARI MIKLÓS — NÁNÁSSY LÁSZLÓ — SZABÓ LÁSZLÓ — BARANYAI BENCE — PETROVICS ÁGNES — KOVÁCS ANDRÁS — ZOMBORSZKY ZOLTÁN — GÓCZA ELEN — BODÓ SZILÁRD

ÖSSZEFOGLALÁS

A kísérletekben mélyhűtött bikaspermák *in vitro* peteburok kötődését (*zona binding assay*, ZBA) vizsgálták. Optimalizálták a kumulusz sejtek eltávolításának módszerét. Tanulmányozták a kiértékelhetőséget különböző termékenyítőkoncentrációk esetén, és az 5000 spermium/petesejt arányt már gyakorlatilag kiértékelhetetlennek találták. 4000 spermium/petesejt koncentrációt választva három tenyészbika spermájának eredményei között jelentős különbséget tapasztaltak. Megállapítható, hogy az eljárás képes a peteburokhoz való kötődés tekintetében egyedi eltérések kimutatására.

SUMMARY

Szabari, M. – Nánássy, L. – Szabó, L. – Baranyai, B. – Petrovics, Á.Ms. – Kovács, A. – Zomborszky, Z. – Góczy, E.Ms. – Bodó, Sz.: SPERM EVALUATION USING ZONA BINDING ASSAY

In the experiments, the zona binding ability of thawed bull sperm was examined. The method of removing cumulus cells was optimised. The possibility of evaluating results was studied using different sperm concentrations for the assay. It is practically impossible to evaluate the samples at the 5,000 sperm cell/oocyte concentration. There was significant difference between three AI bulls, when 4,000 sperm cell/oocyte was applied. It was established that the method is sensitive enough to detect individual differences of bull sperm in the ability of binding the zona pellucida.

BEVEZETÉS

A szarvasmarha-tenyésztés alapvető érdeke, hogy a legjobb genetikai értékű és termékenyítőképes szaporítóanyag kerüljön közforgalomba. Ma a szaporítóanyag előállításakor elsősorban a sperma koncentrációját, a motilitást, illetve a spermiumok morfológiáját bírálják. Az egyes értékelési eredmények és a fertilitás között azonban nem található minden esetben szoros kapcsolat. A termékenyítés komplex biológiai folyamata megköveteli a sperma több tulajdonságának egyidejű, kombinált vizsgálatát. Ezt szolgálja a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont alkalmazott szaporodás biológiai laboratóriumában folyó *in vitro* komplex spermaértékelési eljárás kidolgozása. Ennek a komplex minősítési rendszer részeként a spermának a peteburokhoz való kötődési képességét (*zona binding assay*, ZBA) vizsgáltuk. A teszt a termékenyítés során a petesejtek burkához (*zona pellucida*, ZP) kötődő spermiumok számának a megállapítására szolgál. A módszer elsőként humán vonatkozásban, 1976-ban közölték, azóta számos háziállat fajban elterjedt az alkalmazása. Szarvasmarhában (*Fazeli és mtsai*, 1993; *Graule*

* A kísérleteket a D-93/2001 FVM, és az 4/031/2001 NKFP pályázat támogatta

és mtsai, 1995; Zhang és mtsai, 1998, 1999; Rodriguez-Martinez, 2000; Larsson és Rodriguez, 2000), lóban (Fazeli és mtsai, 1995; Juhász és mtsai, 2000), sertésben (Fazeli és mtsai, 1995; Larsson és Rodriguez, 2000), kutyában (Mayenco-Aguirre és Pérez-Cortés, 1998; Ivanova és mtsai, 1999), kecskében és juhban (Larsson és Rodriguez, 2000) közöltek eredményeket. A petesejtburokhoz kapcsolódó spermiumok száma humán (Burkman és mtsai, 1988), szarvasmarha (Fazeli és mtsai, 1993, 1997; Rodriguez-Martinez, 2000; Zhang és mtsai, 1999) és ló (Fazeli és mtsai, 1995) kísérletekben igazoltan összefüggésben van a sperma *in vivo* termékenyítő képességével, ezért használható a termékenyítő képesség előrejelzésére. Különbséget lehet tenni a teszt segítségével a bikák termékenyítő képessége között is (Gordon, 1994; Braundmeier és mtsai, 2002).

Kísérleteink célja az volt, hogy a Zhang és mtsai (1998, 1999) által közölt *in vitro* spermaértékelési módszert adaptáljuk a mesterséges termékenyítésre használt bikaspermák fertilitásának pontosabb előrejelzéséhez.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleteinket mélyhűtött szaporítóanyaggal végeztük. A bika spermaminták az Országos Mesterséges Termékenyítő Állomásról származtak. A ZBA-hoz a műszalmázott spermaminták felolvasztása 37 °C-on, 12 másodperc alatt történt. Swim-up kezelést követően a termékenyítő médium IVF-TALP volt, amely 5 µg/ml heparin kiegészítést is tartalmazott (Zhang, 1998).

Az *in vitro* vizsgálatokhoz szükséges petesejteket, levágott szarvasmarhák petefészkeiből, 18G-s Luer tűvel nyertük ki. A ZBA-hoz az összegyűjtött kumuluszos petesejteket le kell csupaszítani (vortexelés). A leírt protokoll számunkra nem bizonyult erre a célra alkalmasnak. Ezért a megfelelő médium kiválasztása érdekében, a petesejtek vortexelését 15 perc preinkubálás után, 10 percig Ca⁺⁺ és Mg⁺⁺ mentes PBS-ben, illetve 2%-os Na-citráttal kiegészített TALP-HEPES-ben (Liu és mtsai, 1995) is elvégeztük. Ezt követően a petesejteket TALP-HEPES médiumban átmostuk, majd 3% fetal calf serum-mal (FCS) kiegészített PBS-ben, 4 °C-on inaktívtuk, és a másnapi felhasználásig tároltuk. A sejtek élő-holt állapotát tripán-kék festéssel jellemeztük.

Az *in vitro* termékenyítéskor, a swim up-pal előszelektált spermaminták első 340 µl-ét, 60 perc elteltével használtuk fel. A sperma-koncentráció beállítása után (1000, 2000, 3000, 4000, 5000 spermium/petesejt) a 40 µl spermát tartalmazó IVF-TALP+5 µg/ml heparin médiumból álló termékenyítőcseppekhez adtuk 10 µl térfogatban, a termékenyítendő öt petesejtet. Az 50 µl-es cseppeket, 4 órán keresztül 39 °C, 5% CO₂ közegben inkubáltuk.

Ezt követően a termékenyített petesejtet 3% FCS-sel kiegészített 0,5 ml PBS cseppben átmostuk, majd 450 µm átmérőjű kapillárisal tízszer pipettázva eltávolítottuk a lazán kapcsolódó spermiumokat a ZP-ről. A ZP-hez szorosan kötődő spermiumok számának meghatározásához propidium jodid DNS festékkel (5 µg/mL, Sigma) 30 percig 39 °C, 5% CO₂ inkubáltuk a petesejteket (Zhang és mtsai, 1998). A ZP-hoz kötött spermiumokat fluoreszcens és konfokális mikroszkóp alatt megszámláltuk. A statisztikai elemzésekhez ANOVA tesztet és Welsh T-próbát használtunk.

EREDMÉNYEK

A ZBA alap kritériuma, hogy a petesejteket teljesen megszabadítsuk a rajtuk lévő kumuluszsejtektől, mert ez a mérés objektivitását nagyban módosíthatja. Eredményeink szerint a Na-citrátos TALP-HEPES médiumban végzett petesejt vortexelés, mintegy 10%-kal hatékonyabb volt, mint a Ca^{++} és Mg^{++} mentes PBS-ben végzett (1. táblázat). Ennek alapján Zhang és mtsai (1998) által leírt módszer helyett mi a Na-citrátos médiumot javasoljuk a kumuluszsejtek letisztításához.

1. táblázat

Különböző médiumok hatása a kumulusz sejtek eltávolíthatóságára

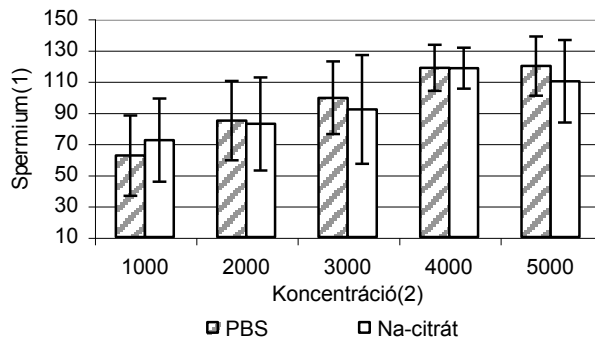
	Petesejt(3)		%
	összes(4)	kumuluszos(5)	
Ca^{++} és Mg^{++} mentes PBS(1)	513	166	32,4
2% Nátrium-citrát TALP-HEPES(2)	399	91	22,8

Table 1.: Effect of different mediums in removing cumulus cells
 Ca^{++} and Mg^{++} free PBS(1), 2% sodium-citrate TALP-HEPES (2), oocytes(3), total(4), oocytes with cumulus cells after vortexing(5)

A ZBA-hoz a petesejtek inaktiválása is szükséges, ennek magyarázata az, hogy a termékenyítés során a polispermia elleni aktív sejtválaszokat, a kortikális és zona reakciókat kiküszöböljük. Ennek egyik egyszerű módszere a petesejtek lehűtése. Az eredeti protokoll szerint egy éjszakán keresztül hűtik a petesejteket. Az eljárás felgyorsítása érdekében 4 °C-on vizsgáltuk, hogy elegendő-e rövidebb tárolási idő? Eredményeink szerint 30 perces tárolás a vizsgált sejtek 80%-át, az 1 órás tárolás pedig a sejtek 100%-át elpusztította.

Zhang és mtsai (1999) leírt módszerben előírt 5000 sperma/petesejt koncentráció alkalmazásakor a nagyszámú spermakötődés jelentősen megnehezíti a sejt számlálást. Az értékelés könnyítése céljából kisebb, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 spermium/petesejt koncentrációk ZBA hatását vizsgáltuk (1. ábra).

1. ábra: A peteburok kötődési teszt (ZBA) különböző sperma-koncentráció függvényében

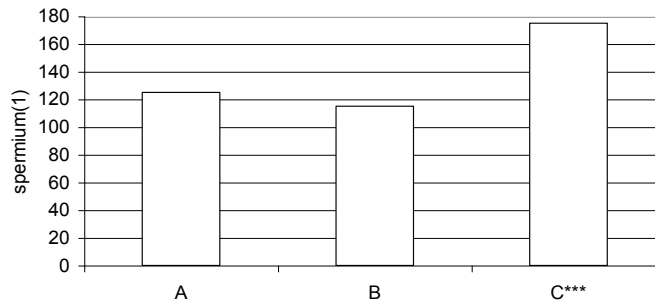


Szignifikáns eltérés ($P < 0,001$) a 3000-es és a 4000-es sperma-koncentráció között(3)

Fig. 1: Results of ZBA using different sperm concentrations
sperm(1), concentration(2), significant difference between the results of 3000 and 4000 sperm cell/oocyte concentration(3)

4000 spermium/petesejt koncentrációjú termékenyítést végezve három bika mintáit hasonlítottuk össze. Azt tapasztaltuk, hogy az „C” bika ZBA eredménye a másik két bika eredményétől igen jelentősen eltért (2. ábra).

2. ábra: Különböző bikák 4000 sejt-koncentrációjú spermamintáinak peteburok kötődési tesztje



*** P<0,001

Fig.2.: Results of ZBA of different bulls at 4000 sperm cell/oocyte concentration sperm(1)

KÖVETKEZTETÉSEK

A módszer adaptálása során a petesejtek kumuluszról való megszabadításához a 2%-Na-citrátos TALP-HEPES inkubálást követő hosszabb idejű, 10 perces vortexelést találtuk megfelelőnek. Eredményeink szerint legfeljebb 4000 spermium/petesejt koncentráció esetén számolhatók még a fluoreszcens jelek spermiumonként elkülöníthetően.

Megállapításunk szerint a 4 °C fokra hűtés 60 perc alatt teljesen inaktíválja a petesejteket. Három bika hímvarsejtjeinek peteburokhoz való kötődés eredményeit összehasonlítva jól kimutatható, statisztikailag is igazolható különbséget lehetett tenni. A bikák között megfigyelhető különbségeket más, *in vitro* spermavértékelési módszer eredményével és az üzemi termékenyítési adatokkal is össze kívánjuk a jövőben vetni. Az adatok elemzése alapján dönthető el, hogy a ZBA módszer mennyire lehet alkalmas a bikák fertilitásának előrejelzésére.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönjük a segítségét Gróf Mihályné, asszisztensnek, és együttműködését Dr. Solti Lászlónak, a Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék vezetőjének, és Dr. Cseh Sándornak, az Andrológiai és Asszisztált Reprodukciós Laboratórium vezetőjének.

IRODALOM

- Braundmeier, A.G. – Demers, J.M. – Shanks, R.D. – Saacke, R.G. – Miller, D.J.(2002): J. Androl. 23. 5. 645–651.
- Burkman, L.J. – Coddington, C.C. – Franken, D.R. – Kruger, T.F. – Rosenwaks, Z. – Hodgen, G.D. (1988): The hemizona assay (HZA): Development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. Fertil. Steril., 49. 4. 688–698.

- Fazeli, A.R. – Steenweg, W. – Bevers, M.M. – De Loos, F.A. – van den Broek, J. – Bracher, V. – Parlevliet, J. – Colenbrander, B.(1995): Relationship between stallion sperm binding to homologous hemizona and fertility. *Theriogenology*, 44. 5. 751–760.
- Fazeli, A.R. – Steenweg, W. – Bevers, M.M. – De Loos, F.A. – van den Broek, J. – Colenbrander, B.(1993): Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. *Vet. Rec. J.*, 2; 132. 1. 14–6.
- Fazeli, A.R. – Zhang, B.R. – Steenweg, W. – Larsson, B. – Beyers, M.M. – van den Broek, J. – Rodríguez-Martínez, H. – Colenbrander, B.(1997): Relationship between sperm-zona pellucida binding assays and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 48. 5. 853–863.
- Gordon, I.(1994): Laboratory production of cattle embryos. CAB International, Wallingford, 266.
- Graule, B. – Braun, J. – Stolla, R.(1995): Binding of spermatozoa to bovine oocytes and their penetration rates in a homologous IVF system. *Theriogenology*, 43. 1. 224–224.
- Ivanova, M. – Mollova, M. – Ivanova-Kicheva, M.G. – Petrov, M. – Djarkova, T. – Somlev, B.(1999): Effect of cryopreservation on zona-binding capacity of canine spermatozoa *in vitro*. *Theriogenology*, 52. 1. 163–170.
- Juhász, J. – Nagy, P. – Kulcsár, M. – Huszenicza, Gy.(2000): Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: A review. *Act. Vet.*, Brno, 69. 247–259.
- Larsson, B. – Rodríguez, H.(2000): Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? *Anim. Reprod. Sci.*, 60–61. 1–4. 327–336.
- Liu, Y. – Holyoak, G.R. – Wang, S. – Bunch, T.D.(1995): The importance of cumulus cells on the *in vitro* production of bovine oocytes. *Theriogenology*, 43. 1. 267–267.
- Mayenco-Aguirre, A.M. – Pérez Cortés, A.B.(1998): Preliminary result of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology*, 50. 2. 195–204.
- Rodríguez-Martínez, H.(2000): Evaluation of frozen semen: Traditional and new approaches, Topics in bull fertility, *Int. Vet. Inf. Ser.*, <http://www.ivis.org>
- Rodríguez-Martínez, H. – Larsson, B.(1998): Assessment of sperm fertilizing ability in farm animals. *Acta Agric. Scand., Sect. A. Anim. Sci., Suppl.* 29. 12–18.
- Rodríguez-Martínez, H. – Larsson, B. – Zhang, B.R. – Söderquist, L.(1997): *In vitro* assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *J. Reprod. Develop.*, 43. 1.
- Zhang, B.R. – Larsson, B. – Lundeheim, N. – Haard, M.G.H. – Rodríguez-Martínez, H.(1999): Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. *Int. J. Androl.*, 22. 253–260.
- Zhang, B.R. – Larsson, B. – Lundeheim, N. – Rodríguez-Martínez, H.(1998): Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Int. J. Androl.*, 21. 207–216.

Szerzők címe: Szabari, M. – Zomborszky, Z.: Kaposvári Egyetem, University of Kaposvár
 H-7400 Kaposvár, Guba Sándor utca 40.

Authors' address: Nánássy, L.: Nyugat-Magyarországi Egyetem, University of West Hungary
 H-9200 Mosonmagyaróvár, Vár 2.

Szabó, L. – Baranyai, B. – Bodó, Sz. – Gócsa, E.: Mezőgazdasági
 Biotechnológiai Kutatóközpont, Agricultural Biotechnology Center
 H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert utca 4.

Petrovics, Á.: Szent István Egyetem, Szent István University
 H-2100 Gödöllő, Páter Károly u. 1.

Kovács, A.: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
 Research Institute of Animal Production and Nutrition
 H-2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.

SPERMAÉRTÉKELÉS MIKRO SWIM UP ELJÁRÁS SEGÍTSÉGÉVEL *

NÁNÁSSY LÁSZLÓ — SZABARI MIKLÓS — SZABÓ LÁSZLÓ — BARANYAI BENCE — PETRO-
VICS ÁGNES — KOVÁCS ANDRÁS — BALI PAPP ÁGNES — GÓCZA ELEN —
BODÓ SZILÁRD

ÖSSZEFOGLALÁS

Három tenyészbika jelölt felolvasztott műszalmájából származó spermamintákat hasonlítottak össze a *swim up* spermaszelektációs eljárás egy a szerzők által újonnan kidolgozott változatával, az ún. *mikro swim up* segítségével. A felülúszó koncentrációját, a hímivarsejtek életképességét és akroszómájuk épségét vizsgálták az idő előrehaladtával egy órán belül. A létrehozott eljárás alkalmasnak bizonyult spermaminták közötti különbségek kimutatására.

SUMMARY

Nánássy, L. – Szabari, M. – Szabó, L. – Baranyai, B. – Petrovics, Á.Ms. – Kovács, A. – Bali Papp, Á.Ms. – Góczy, E.Ms. – Bodó, Sz.: SPERM EVALUATION USING MICRO SWIM-UP

Semen samples frozen from three bull AI candidates were compared using a version of Swim up, called Micro Swim up, developed in our laboratory. The concentration, the viability, and the acrosome status of the sperm in the supernatant were studied in the function of time in 60 min. The new method proved to be appropriate for detecting differences between sperm samples.

BEVEZETÉS

A bikasperma jó termékenyítőképességének — mind *in vivo*, mind *in vitro* — egyaránt nagy jelentősége van a szarvasmarha tenyésztésben (Bodó és mtsai, 2000). A tenyészbika jelöltek mesterséges termékenyítésre való alkalmasságát az ivadékvizsgálatban elért néhány száz termékenyítésből jelzik előre, ez azonban nem mindig elegendő ahhoz, hogy biztonsággal meghatározzuk ezt a tulajdonságot. Rodriguez-Martinez (2000) szerint a sperma felolvasztás utáni motilitásának szubjektív értékelése a mesterséges termékenyítésre szánt bika spermaminőségének megállapítására egy egyszerű és a legáltalánosabban használt módszer, de nem elegendő előrejelzője a sperma termékenyítőképességének. A spermamintának csak több szempontból való, funkcionális jellemzése nyújthat tájékoztatást a minta feltételezett *in vivo* fertilitásáról. Kísérleteinkben a funkcionális jellemzést *swim up* (Parrish és mtsai, 1986) eljárás segítségével végeztük. A módszer segítségével a jó motilitással rendelkező hímivarsejteket lehet az eredeti spermamintából koncentrálni.

* A kísérleteket a D-93/2001 FVM, és az 4/031/2001 NKFP pályázat támogatta

ANYAG ÉS MÓDSZER

Három Holstein-fríz tenyészbika („A”, „B”, „C”), mélyhűtést követően felolvasztott spermáját használtuk a kísérletben. A kísérleteket három ismétlésben végeztük el. Az eljáráshoz Sperm-Talp médiumot használtunk. A hagyományos *swim up* módszert leíró protokollt egy teljes műszalmányi minta szeparálására dolgozták ki. A Sperm-TALP médiumot 10 ml-es centrifugacsövekbe (NUNC) töltjük 1 ml-enként, majd ezeket 15 percre 39 °C-os termosztátba rakjuk. A műszalmák felolvasztása 39°C-os vízben történik. Tartalmukat többszöri pipettázással összekeverve homogenizáljuk, majd mintánként az 1000 µl-nyi Sperm-TALP alá 170 µl spermát rétegzünk. Ezután a mintákat függőleges helyzetben visszahelyezzük a termosztátba, és a csöveket 60 percig inkubáljuk. Az idő leteltével, a felülúszóból, 750 µl-t 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyezünk át, majd 300 g-n 10 percig centrifugáljuk. Centrifugálás után a felső 500 µl-es részt eltávolítjuk, majd a maradék folyadékot használjuk a mérésekhez.

Kísérletünkben a *swim up* eljárás egy órás inkubációs ideje alatt bekövetkező változásokat akartuk vizsgálni, ezért 5–15–30–45–60 percenként vettünk mintát. Mivel a hagyományos eljáráshoz mérésenként egy műszalmára van szükség, kidolgoztunk egy arányosan kicsinyített eljárást, amit *mikro swim up*-nak neveztünk el, így egyetlen műszalma felhasználásával lehet a bekövetkező időbeli változást tanulmányozni. Előnye, hogy a módszer későbbi, gyakorlatban való alkalmazáskor az esetenként igen drága szalmák felhasználása csökkenthető. A *mikro swim up* esetén egy műszalmából származó 170 µl-nyi spermát osztunk öt részre, s 25 µl-t rétegezve 147 µl Sperm-TALP alá 500 µl-es PCR csövekbe. A felülúszóból 110 µl-t centrifugálunk le, majd 73 µl-nyi felülúszót eltávolítva a csapadékot a maradék médiumban felkeverjük. Az egyéb inkubációs és mintavételi lépések megegyeznek a hagyományos *swim up*-nál leírtakkal.

A kiindulási frakcióban bekövetkező változásokat is nyomon kívántuk követni, ezért eltartási tesztet végeztünk. A *swim up* során felhasznált sperma egy részéből 4:1 arányú hígítást készítettünk Sperm-TALP-pal, majd az idő előrehaladtával a *swim up* mintákkal megegyezően vizsgáltuk.

A hímivarsejtek koncentrációjának meghatározásához Makler-kamrát használtunk.

A spermiumok életképességét és akroszómájuk épségét Kovács és Foote (1992) által kidolgozott festési eljárás segítségével vizsgáltuk. Az életképességet 0,2% tripánkék-oldattal (Sigma, T8154 0,4% törzsoldat fiziológiás sóoldattal hígítva 1:1 arányban) határoztuk meg, az akroszómát Giemsa-val (3 ml 7,5% Sigma, GS500 törzsoldat 37 ml desztillált vízben oldva) festettük. A festődött részek színeződése alapján hét kategóriát tudtunk elkülöníteni (Nagy és mtsai, 1999). A statisztikai értékelést az INSTAT nevű számítógépes program segítségével végeztük.

EREDMÉNYEK

Első lépésben, a hagyományos *swim up* során nyert felülúszóban az idő függvényében, a koncentrációváltozást vizsgáltuk. Minden egyes bika mintájá-

ban, 30 percnél mértük a legnagyobb a koncentrációértékeket. Ezt a koncentrációváltozást összehasonlítva a *mikro swim up* felülúszójában kapott változásokkal, mind a három bika esetében ugyanolyan lefutású, 30 percnél csúcspot mutató görbét kaptunk A három bika *mikro swim up* során kapott felülúszó és a kiindulási minta koncentrációjának egymáshoz való viszonyításakor statisztikailag igazolható különbségeket kaptunk. „A” bika esetében az összes spermium 25,5%-a, „B” bika esetében 15,4%-a, míg „C” bika esetében 13,9%-a úszott fel, a maximális felülúszó koncentrációt adó időpontban (1. táblázat).

1. táblázat

A bikák mikro swim up-jában különböző időpontokban mért felülúszó koncentrációértékek, $\bar{x} \pm s$

Idő(1)	5'	15'	30'	45'	60'
„A” bika(2)	6,4±0,5 ^{a***}	12,8±0,5 ^{b***}	15,3±1,2 ^{c**}	14,5±0,4 ^{b**}	13,3±0,2 ^{b**}
„B” bika(2)	4,8±0,3 ^{a**}	8,6±0,3 ^{bd**}	9,3±0,1 ^{bd*}	7,8±0,9 ^{b*}	6,3±0,2 ^{c*}
„C” bika(2)	4,2±1,0 ^{a*}	6,8±0,4 ^{b*}	8,4±0,2 ^{c*}	6,8±0,3 ^{b*}	6,3±0,5 ^{b*}

Statisztikai próba: ANOVA a,b,c,d: az oszlopokban levő szignifikáns különbségek (P<0,05); *, **, ***: sorokon belüli szignifikáns különbségek (P<0,05)(3)

Table 1: Spermatozoa concentration in the supernatant of semen during micro swim up, $\bar{x} \pm s$ time(1), bulls(2), significant differences (P<0.05) in rows are indicated by letters, differences in columns are indicated by asterisk and cross; Measurements were replicated three times, data were analysed by ANOVA(3)

A táblázatban látható, hogy „A” bika felülúszójában statisztikailag szignifikánsan nagyobb a hímivarsejtek koncentrációja, mint „B” bika és „C” bika esetében a 15. perctől fogva. Az utóbbi két bika között a koncentrációban statisztikailag igazolható különbséget nem találtunk. „A” bika és „C” bika esetében a 30 perces koncentrációcsúcs igazolható, „B” bika esetében ez nem annyira kifejezett, a negyedórás és félórás eredmények nem térnek el jelentősen egymástól.

A kiindulási frakcióban, 60 perc után, az egyes kategóriákba eső sejtek aránya nem változott, az élő ép akroszómájú sejtek aránya „A” bika esetében 81,4%, „B” bika ehhez hasonlóan 80%. A „C” bika mintája azonban csupán 60% élő ép akroszómájú sejtet tartalmazott.

2. táblázat

Az élő, ép akroszómájú sejtek átlaga a kiindulási, illetve a felülúszó frakcióban („C” bika), $\bar{x} \pm s^a$

Idő(1)	5'	15'	30'	45'	60'
Eltartási t.(2)	120,0±4,6*	122,0±2,7*	121,0±3,6*	118,7±2,7*	118,7±6,1*
Felülúszó(3)	165,4±5,0**	172,0±3,6**	170,0±3,6**	165,7±3,8**	167,0±4,0**

^a: kenetenként leszámolt 200 sejtől az élő, ép akroszómájú sejtek száma, a statisztikai teszt: Student-t próba. A számlálást 3 ismétlésben végeztük, * P<0,0001(4)

Table 2.: The average of live spermatozoa with intact acrosomes in the fresh semen and in the supernatant in samples of Bull C, $\bar{x} \pm s$ time(1), storage test(2), supernatant(3), ^a: number of live and intact cell counted in 200 cells in smear; statistical test: Student-t test. Counting were repeated three times(4)

A felülúszó vizsgálatok az élő ép akroszómájú sejtek aránya az idő előrehaladtával nem változott: „A” bika és „B” bika esetében 90% körüli (90,5 és 89,6%), „C” bikánál 84%. A” bika és „B” bika esetében a *mikro swim up* javító hatása 9 és 9,6%, amíg „C” bikánál ez az érték 24%, ami szignifikáns különbséget jelent (2. táblázat).

Az akroszóma sérült és a sérült farkú spermiumok aránya sem a felülúszóban, sem a kiindulási frakcióban nem változott a 60 perces inkubáció alatt.

KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink során sikerült kidolgozni a *mikro swim up* eljárást, melynek segítségével a hagyományos *swim up* során történő változásokat modellezhetjük. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a *mikro swim up* jól modellezhető a hagyományos, *in vitro* termékenyítésben elterjedt *swim up* eljárás. Lehetőségünk nyílt eltérő mintákra jellemző egyedi koncentráció, és motilitási értékeket vizsgálatára. Az inkubáció alatt a felülúszó spermiumkoncentrációjában az idő előrehaladtával lényeges változást tapasztaltunk. Mindhárom bika *swim up* során kapott felülúszójának koncentráció-maximuma 30 percnél volt. Később a koncentráció csökkenni kezdett, ezért a vizsgált bikák *in vitro* fertilizációban való használatok javasolható a *swim up* 60 perces inkubációs idejét 30 percre csökkenteni, a maximális motilis spermiumot tartalmazó termékenyítő oldat kialakításához. A *swim up* képes jelentősen javítani termékenyítő anyag minőségét: „C” bikánál az eljárás 24%-kal növelte meg az ép, motilis hímivarsejtek arányát. Az idő előrehaladtával, egy órán belüli eltartást vizsgálva a hímivarsejtek akroszóma, és fark membrán állapota nem változott.

A *mikro swim up* eljárás segítséget nyújthat az *in vitro* embrió-előállítási programok során a megfelelő bika kiválasztásához, ha a kiválasztásnál az idő függvényében felrajzolható koncentráció görbe fél órát követő ereszkedésének mértékét, és a koncentráció-maximumot vesszük figyelembe. A bikák között megfigyelhető különbségeket az üzemi termékenyítési adatok tükrében is értékelni fogjuk. Az adatok alapján megállapítható lesz, hogy a spermát funkcionálisan értékelő *mikro swim up* módszer mennyire lehet alkalmas a bikák fertilitásának megjósolására.

Egyetlen vizsgálati módszer használata természetesen nem adhat elég információt a sperma minőségéről, ezért érdemes több szempontból, morfológiailag és funkcionálisan is több módszerrel (pl. *swim up*, CTC vizsgálat, peteburok kötődési teszt, *in vitro* termékenyítés) vizsgálni a termékenyítő anyagot az objektívabb jellemzés számára.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönjük a segítséget Somfai Tamásnak, Dr. Nagy Szabolcsnak és Gróf Mihálynénak, és együttműködését Dr. Solti Lászlónak, a Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék vezetőjének, és Dr. Cseh Sándornak, az Andrológiai és Asszisztált Reprodukciós Laboratórium vezetőjének, valamint a SZIE Állatorvos-tudományi Karának.

IRODALOM

- Bodó, Sz. – Nagy, Sz. – Baranyai, B. – Somfai, T. – Gócza, E. – Kovács, A.(2000): Sperma minőség jellemzése Swim Up előtt és után. Állattenyésztés és Takarmányozás, 49. 581–583.
- Kovács, A. – Foote, R.H.(1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. Biot. Histoc., 67.119–124.
- Nagy, Sz. – Házas, G. – Bali Papp, Á. – Iváncsics, J. – Szász, F. – Szász, F. Jr. – Kovács, A. – Foote, R.H.(1999): Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. Theriogenology, 52.1153–1159.
- Parrish, J.J. – Parrish, J.L. – First, N.L.(1986): Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Biol. Reprod., 30. 112.
- Rodriguez-Martinez, H.(2000): Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. In : topics in bull fertility. Chenoweth, P.J.(Ed.) International Veterinary Information Service

Szerző címe: Nánássy, L. – Bali Papp, Á.: Nyugat-Magyarországi Egyetem
Authors' address: University of West Hungary
H-9200 Mosonmagyaróvár, Vár 2.
Szabari, M.: Kaposvári Egyetem
University of Kaposvár
H-7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40.
Szabó L. – Baranyai, B. – Gócza, E. – Bodó, Sz.:
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Agricultural Biotechnology Center
H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.
Petrovics, Á.: Szent István Egyetem
Szent István University
H-2100 Gödöllő, Páter Károly u. 1.
Kovács, A.: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Research Institute of Animal Production and Nutrition
H-2053, Herceghalom Gesztenyés út 1.

A TERMÉKENYÜLÉSI EREDMÉNYEK JAVÍTÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI TEJELŐ SZARVASMARHA ÁLLOMÁNYBAN

GÁBOR GYÖRGY — SZÁSZ FERENC

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők a tejelő szarvasmarha szaporodási eredményeinek javítását célzó kutatási program keretében bikákban a here hőszabályozását tanulmányozták alapkutatási szinten és megállapították, hogy egyszeri GnRH injekció hatására a here hőszabályozására jellemző folyamatok tanulmányozhatók az általuk kifejlesztett tütermisztorok és egy többcsatornás számítógépes adatgyűjtő segítségével. A here ultrahangos vizsgálati eredményei, valamint a saját fejlesztésű számítógépes sperma motilitásvizsgáló segítségével a gyakorlatban felhasználható vizsgálati módszereket fejlesztettek ki.

A teheneknél a két ellés közötti idő csökkentése volt a cél. Vizsgálataik alapján azt a következtetést vonták le, hogy a kísérletek során alkalmazott Ovsynch és Provsynch ovuláció szinkronizálási módszerek és az időhöz kötött programozott termékenyítés, valamint a korai (28–35 nap közötti) vemhességvizsgálat egyaránt alkalmas a kitűzött cél megvalósítására. A korai vemhességvizsgálati módszerek közül az ultrahang segítségével azonnali információk nyerhetők, és az üres tehenek kiválogatásával egy időben a petefészkek vizsgálata is megtörténik. A diagnózis felállítása után azonnali oktani kezeléssel a tehenek vemhesítésre történő előkészítése megtörténik.

A vemhességi fehérje (VSPB) vérmintából való kimutatásán alapuló ELISA teszt ugyancsak alkalmas az üres tehenek kiválogatására és eredményesen használható, a két ellés közötti idő csökkentésére.

SUMMARY

Gábor, Gy. – Szász, F.: POSSIBLE METHODS FOR THE IMPROVEMENT OF FERTILITY RESULTS IN DAIRY HERDS

The aim of the recent examinations described by the authors was the improvement of the fertility result in dairy cattle. The testicular thermoregulation of the bulls was studied in a basic research programme with the help of custom needle thermocouples and a computerized, multi-channel data collector system. They stated that a single GnRH injection starts the testicular thermoregulation and the above described devices are useful for its study. Examination of the testicular echotexture by ultrasound and the semen motility by a computer assisted (CASPAR) semen analyzing method are useful on a practical level.

The aim of the examinations in cows was decreasing the parturition interval. The authors concluded that all methods, including Ovsynch and Provsynch protocols, timed AI and the early pregnancy detection (28–32 days after AI), are effective for decreasing the parturition interval. Rectal ultrasound is a quick, non-invasive method for detecting open cows and examining ovaries, and also gives a chance for the immediate treatment of the cows, in order to prepare them for the next AI. Examination of pregnancy specific protein B (BSPB) by a custom ELISA test in the blood sera is also an effective tool for the decreasing of parturition interval.

BEVEZETÉS

A magyar tejelő szarvasmarha tehén populáció (közel 360 ezer tehén) több mint 90 százalékát mesterségesen termékenyítik. A termékenyítések általában az ivarzó állatok kiválogatása, majd annak pozitív elbírálása után történnek meg.

A tejelő tehenészetek szaporodásbiológiai problémáinak főbb okai napjainkban Magyarországon:

- viszonylag nagy létszámú állományok
- kötetlen tartás bevezetése
- tejtermelés növekedése
- takarmányozási hibák
- az ivarzó egyedek kiválogatása az elégtelen személyi feltételek miatt rossz hatásfokú
- a mesterséges termékenyítéssel kapcsolatos hibák (spermaminőség, spermakezelés)
- management hiányosságok (adatnyilvántartás, adatszolgáltatás) és a számítógépes nyilvántartások alkalmazásának hiánya, vagy nem szakszerű használata)

SAJÁT VIZSGÁLATOK

Kutatási munkatervünk megtervezésekor arra törekedtünk, hogy a fogamzást azonos mértékben meghatározó hím- és nőivarral kapcsolatos gyakorlati problémákkal egyaránt foglalkozzunk.

A hím ivarral kapcsolatos kutatásainkat két fő részre osztottuk:

- A here hőszabályozása (alapkutatás).
- A here morfológiai vizsgálata, spermaminősítés (alkalmazott kutatás).

A here hőszabályozása: A kutatómunka során három állatfaj (szarvasmarha, juh, sertés) ivarérett, továbbtenyésztésre nem kijelölt (vagy tenyésztési selejt) apaállatainak vizsgálatát végeztük. A juh kísérletek legfőbb célja a módszerek kidolgozása volt, mivel a kosok kezelése jár a legkevesebb problémával, ugyanakkor a herék, ill. a hereborék mérete nagyban megkönnyítette az előkészítő munkát. A bika és a sertés kan kísérletek célja a mesterséges termékenyítésre leginkább használt fajok vizsgálata volt. A kísérleteket az OTKA 32317 sz. elnyert pályázat támogatásával végeztük.

A here hőmérsékleti adatainak vizsgálatára egy 16 csatornás adatgyűjtőt készítettünk. Ez azt jelenti, hogy egyidejűleg 16 hőmérsékleti adatot tudunk mérni, és rögzíteni. A túrterisitorokat a kísérleti és a kontroll állat heréibe helyeztük a vizsgálat megkezdése előtt (három intratesztikulárisan, egyet pedig a hereborék bőre alá), herénként összesen négyet (egyét a here csúcsán, egyet az alján, egyet középen mélyen a herébe nyomva, a negyediket pedig középen bőr alá). A rektális hőmérőket a végbélben rögzítettük a vizsgálat kezdete előtt. Amikor a hőmérséklet stabilá vált (általában a rögzítés és a terisitorok behelyezése után 25–40 perc múlva), kezdtük az állatok kezelését GnRH-val.

Egyszerre egy-egy kísérleti és kontroll állat párhuzamos vizsgálatát végeztük el. A GnRH (ill. a placebo) kezelés előtt epidurális érzéstelenítést alkalmaztunk (Rompun 0,35 ml/állat, desztillált vízzel 2,5 ml-re hígítva) majd vért vettünk (LH és tesztoszteron plazma koncentráció meghatározására). Az epidurális érzéstelenítés hatékonyságának ellenőrzése után a mindkét állat heréibe és a hereborék alá (3-3 ponton: csúcs, közép, alap; illetve középen a bőr alá) injekciós tűkbe épített termisztorokat helyeztünk be. A termisztorok adatait folyamatosan a multiplex mérés-adatgyűjtő segítségével számítógépen rögzítettük a GnRH kezelés előtti perctől kezdve 90 percen keresztül. A GnRH kezelést követő 90. percben pedig hormon-meghatározás céljából ismét vért vettünk (Post és mtsai, 1987; Gábor és mtsai, 1995). Az állatok a kísérlet végén vágásra kerültek.

Az eddigi adatok alátámasztani látszanak a korábbi hipotézisünket, ill. kísérleti adatainkat, miszerint a GnRH hatására a here(borék) hőmérséklete megemelkedik, és a regulációs folyamatok azonnal működésbe lépnek ennek kompenzálására (Coulter és mtsai, 1988; Gábor és mtsai, 1998abc, 2001). Az eddigi adatok arra utalnak, hogy a hereborék bőrén keresztül távozik az extra hő nagyobbik része, és talán kisebb szerepe lehet a here vérellátásának változtatásával (*testicular blood flow*) járó folyamatoknak.

A here morfológiai vizsgálata, spermaminősítés: 1993 óta foglalkozunk a hímivarú háziállatok andrológiai vizsgálatával. A here ultrahanggal történő diagnosztikai vizsgálatát Coulter és Baily (1988) cikke nyomán kezdtük meg, akik úgy találták, hogy az ultrahang diagnosztika még egy viszonylag hosszú időszakban történő alkalmazása sem eredményezi a szaporodási „kapacitás” csökkenését, azaz egy olyan „non invazív” beavatkozás, ami a belső szerkezetet a képalkotás módszerével a vizsgáló számára értékelhető módon jeleníti meg. Eleinte egy Scanner 450 VET ultrahang készüléket használtunk egy 7,5 MHz-es lineáris transducerrel és azt találtuk, hogy a here ultrahangos szerkezetének (echotexture) vizsgálati módszere a gyakorlat igényeinek megfelelő. Az általunk 1996-ban kidolgozott ultrahangos here vizsgálati módszer a here finom szerkezetének morfológiai vizsgálata révén kiegészíti a spermavizsgálatot, és így alkalmassá válhat a gyenge fertilitású hímivarú tenyészállatok kiszűrésére. Ezt a módszert az évek során folyamatosan fejlesztettük (jelenleg is), és természetesen a gépparkot is fejlesztettük (ma Scanner 100 VET típusú ultrahanggal és kétfrekvenciás lineáris fejjel vizsgálunk 6 ill. 8 MHz-en). A vizsgálatok végzéséhez több, az eljárást standardizáló segédeszközt és szoftvert fejlesztettünk ki, és eredményeinket folyamatosan konferenciákon ill. szaklapokban ismertettük (Gábor és mtsai, 1997, 1998abc, 1999, 2001).

A jelenleg is folyó OTKA kutatásunkban is kiemelt szerep jut az ultrahangos herevizsgálatoknak, mivel az eddigi tapasztalatok alapján az egyes egyedek eltérő módon reagálnak a GnRH kezelésre, és ennek oka egyértelműen a herében keresendő. A vizsgálat utáni *in vitro* (pl. szövettani) vizsgálatok a tú termisztorok miatti szöveti roncsolódás miatt nem, vagy csak korlátozottan lehetnek alkalmasak az okok pontos feltárására, ezért egyértelműen a kezeléseket előtti *in vivo*, a here finomszerkezetét vizsgáló módszerek jöhetnek szóba. Ezek közül pedig az ultrahang a legalkalmasabb, mivel ez még a tú termisztorok pontos lokalizációját is lehetővé teszi.

A tenyész apaállatok fertilitásának vizsgálata a sperma minőségének és az állatok szexuális viselkedésének tanulmányozásán alapszik. Az ejakulátum objektív vizsgálatára már rendelkezésre állnak a kutatás (videomikrográf, *Leidl*, 1987) és a gyakorlat számára (HTM motility analyzer, IMV, L'Aigle, France) egyaránt alkalmas eszközök. A CASA (Computer Assisted Semen Analysis) módszer elterjedését a számítástechnika elmúlt években tapasztalt fejlődése nagyban elősegítette (*Farrell és mtsai*, 1998).

A sperma vizsgálatára saját fejlesztésű CASA rendszert használunk (CASPAR). A módszer lényege, hogy a sperma vizsgálatára használt mikroszkóphoz kamerát csatlakoztatunk, és annak a jeleit 2–3 másodpercen keresztül rögzítjük (*Gábor és mtsai*, 2002). A rögzítés a számítógép merev lemezére történik olyan módon, hogy először a kamera által közvetített analóg képet egy digitalizáló kártya segítségével digitális jelekké alakítjuk, hogy a számítógép számára értelmezhető legyen (36 kép percenként). Ezt követően a szoftver másodpercenként 3 mintát (képet) kiemel, és azokat egymásra másolja. Ezzel a sperma motilitás gyors értékelése már lehetségessé válik, mivel az élő, egyes vonalban előre haladó sejtek gyöngyfüzért formáznak, míg a holt sejtek egyedi sejtekként jelennek meg. Az élő, de gyenge motilitású, sejtek kört formáznak. A szoftver alkalmas az élő sejtek arányának meghatározására, ezen kívül még a normális motilitású sejtek sebességének a mérésére is. Az eljárás alkalmazását az teszi lehetővé, hogy a tetszőleges hígítású ejakulátumot 10 µm rétegvastagságot biztosító Makler kamrába cseppentjük, és ez garantálja azt, hogy a sejtek 1 rétegben jelennek meg a mikroszkóp látóterében, és a felvételek mélységélessége nem romlik, mivel a sejtek nem képesek mélységben elmozdulni, kizárólag síkban mozoghatnak.

A nőivarral kapcsolatos vizsgálatok: A szaporodásbiológiai munka alacsony hatékonyságát a gyenge fertilitási eredmények, ill. az ivarzók megtalálásának alacsony aránya jelzi (amerikai adatok 50% alatti eredményességet tartanak reálisnak). Az persze egy külön tanulmányt is megérne, hogy a csendes ivarzók aránya-e nagyon magas, vagy pedig személyi problémák miatt ilyen gyenge az ivarzó állatok kiválogatása. Az ivarzók kiválogatásának a kérdése nemcsak hazánkban okoz problémát, hanem külföldön is. Nem véletlen, hogy több automatikus ivarzás megfigyelő rendszert is kidolgoztak már.

Az ivarzó egyedek kiválogatásának főbb jelenlegi módszerei a hazai és a nemzetközi gyakorlatban:

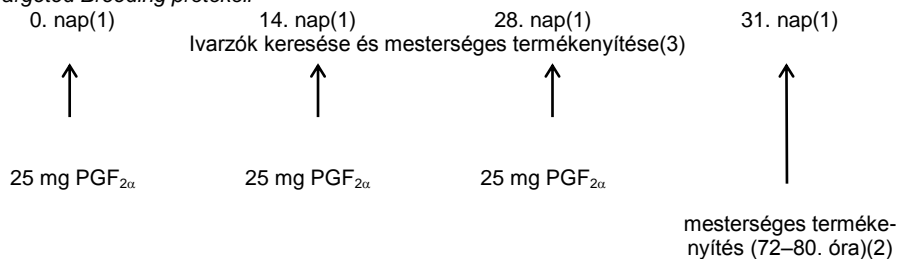
- vizuális, hagyományos módon,
- markerek használata,
- festékek,
- beépített rádióadó (*Senger*, 1994),
- a fiziológiai változások műszeres, vagy automatikus detektálása,
- tej mennyiség csökkenése,
- lépésszámlálás,
- hőmérséklet emelkedésének mérése (rektális ill. infravörös thermometria, thermográfia).

A fentiekből is látszik, hogy bár a módszerek sokasodnak (még napjainkban is), ami arra utal, hogy száz százalékig megbízható megoldás a mai napig nem ismeretes.

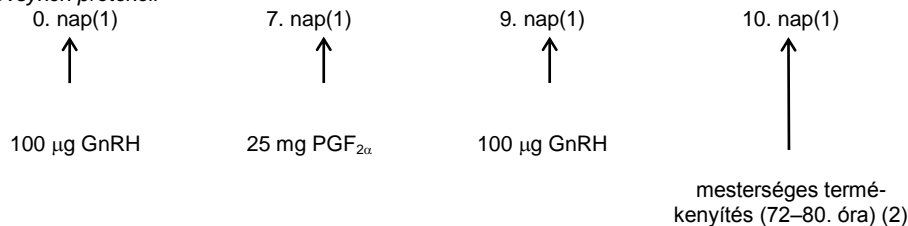
Ezt felismerve amerikai kutatók újra elővették korábbi protokollokat, amelyek PGF_{2α} segítségével végzett ivarzás indukciós eljárások voltak. Ezek az eljárások hatékonyak voltak, de csak akkor, ha változatlanul kötődtek az ivarzások detektálásához. A cél ugyanakkor egy olyan eljárás kialakítása volt, aminek a segítségével a meghatározott időpontban ivarzás detektálása nélkül „vakon” lehet termékenyíteni. Az a tény, hogy ezek a kutatások elsősorban Wisconsinban és Floridában folytak azt jelzi, hogy a főként a nagy tejtermelésű, ill. a hőstressznek jobban kitett állományok az érintettek az alacsony reprodukció okozta károkban.

Az elmúlt években három ivarzás-, ill. ovuláció szinkronizálási módszer terjedt el a tejlő tehénészetek szaporodási zavarainak csökkentésére.

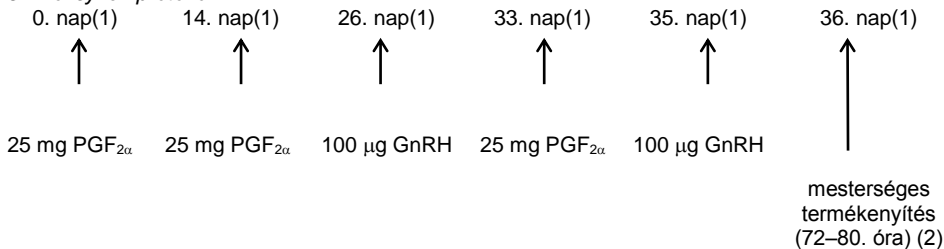
1. Targeted Breeding protokoll



2. Ovsynch protokoll



3. Provsynch protokoll



day(1), AI(2), heat detection and AI(3)

A módszerek közötti fő különbség, hogy míg a Targeted Breeding esetén szinkronizált ivarzásról, az Ovsynch és a Provsynch esetén pedig szinkronizált ovulációról van szó. Egy összehasonlító vizsgálat során (1. táblázat) a laktáció 60–75. napja közötti állatok esetén a Targeted, a 76. nap fölötti egyedeknél pedig az Ovsynch módszer volt a jobb. Üszők esetén egyértelműen a Targeted módszer szerepelt jobban: a vemhesülési arány 74,4, ill. 35,1% volt.

1. táblázat

**A Targeted Breeding és az Ovsynch módszer összehasonlító vizsgálata tehenekben
(Nebel és Jobst, 1998)**

Az elléstől eltelt idő(1)	Vemhesülés, %(2)	
	Targeted Breeding n=154	Ovsynch n=156
60. és 75. nap között(3)	39,4	26,0
76. nap fölött(4)	38,8	43,3
Összesen(5)	39,0	37,8

Table 1.: Comparative study of the Targeted Breeding and Ovsynch protocol in dairy cows (Nebel and Jobst, 1998)
days after calving(1), pregnancy rate(2), day between 60–75(3), over 76 days(4), total(5)

Ovsynch protokoll: Első vizsgálatainkat 1997 és 2000 között végeztük (Gábor és mtsai, 2002). Az állományszintű vizsgálatok során az anösztruszos állatok kezelésére az Ovsynch módszert választottuk, mivel el akartuk kerülni az ivarzók kiválogatásával járó procedúra okozta hibákat. Kizárólag látható ivarzási tüneteket nem produkáló állatokkal kezdtük a vizsgálatokat. A fentiekben leírt eredeti protokollt használtuk (Burke és mtsai, 1996; Pursley és mtsai, 1997; Risco és mtsai, 1998) és valamennyi állat mindhárom kezelést megkapta. A GnRH Fertagyl (Intervet, 100 µg, im.) volt, míg a PG készítmény a Dinolytic (Upjohn, 35 mg, im.). Összesen 25 állat kezelését végeztük el.

A későbbiekben a GnRH dózist megemeltük 150 µg/állatra (a kezelés változatlanul im. történt), mivel az 1 ml beadása (rövid, vastag injekciós tű) a gyakorlati körülmények között nem mindig garantálta a teljes dózis egyértelmű bejutását a kezelt állatok szervezetébe.

A protokollt kifejlesztő kutatók szerint a tejelő tehenek több mint 90%-a szinkronizált ovulációval reagál a kezelésre és közel 40%-os a vemhesülési arány. Üszők esetében a szinkronizált ovuláció aránya 70% alatt marad. Azt valószínűsítik ennek hátterében, hogy a tejelő teheneknél majdnem két tüszőérési hullám alakul ki egy ciklus során, míg az üszőknél 3 tüszőérési hullám van a ciklusban. Míg a tehenek esetében a sárgatest (CL) megakadályozza az ivarzási tüneteket ill. az ovulációt (egészen a 2. GnRH injekcióig), addig az üszőkben a CL gyors regressziója ill. az újonnan megérett tüsző a PG kezelés időszakában ivarzást válthat ki.

Vizsgálataink során ezért mi kizárólag teheneket kezeltünk.

Az eredmények igazolják más szerzőknek a programozott termékenyítésre vonatkozó korábbi adatait. A GnRH és a prosztaglandin készítmények kiválasztása az irodalmi adatok mellett saját korábbi nem publikált kísérleti eredményeinken alapult. A kereskedelmi forgalomban kapható GnRH készítmények összehasonlító vizsgálata során ugyanis azt tapasztaltuk, hogy a GnRH kezelésre adott 40, 60 és 90 perces szérum LH szintek a Fertagyl esetében a többi készítménnyel összehasonlítva szignifikánsan magasabb értékeket mutattak.

A vizsgálati eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a termékenyülési eredmények javíthatók ovuláció-, ill. ivarzás szinkronizálás utáni programozott termékenyítés segítségével tejelő szarvasmarha állományban, illetve megelőzhető a szaporasági mutatók romlása a meredeken emelkedő

tejtermelés ellenére is. A módszer alkalmazása a laktációs anösztrusszal összefüggő esetekben indokolt. A kezelés eredményessége a kezelésre kerülő állatok kiválogatásán múlik. A rektálisan tapintható (vagy ultrahanggal vizsgálható) inaktív petefészkek és jól involvált méhek diagnosztizálása esetén indokolt a beavatkozás.

Véleményünk szerint az üszők esetében feltétlenül hasznos lehet a Targeted Breeding módszer alkalmazása, míg a tehenek esetében az ellés utáni 60–75 nap között a PMSG kezelés, azt követően pedig az Ovsynch protokoll alkalmazása látszik célszerűnek. Az irodalmi adatok alapján az Ovsynch módszer hatékonysága a termékenyítés időpontjának változtatásával nem javítható, de — korábbi endokrinológiai vizsgálati eredményeink birtokában — nem tartjuk kizártnak, viszont, hogy a GnRH intravénás alkalmazása (a némileg gyorsabban kialakuló LH csúcs miatt) esetleg javíthatna a vemhesülési eredményeken.

Provsynch protokoll: A PROVSYNCH módszer lényege, hogy az ellést követő 35. nap körül (14 nap különbséggel) 2 prosztoglandin kezelést kell végezni (0. és 14. nap), majd a szokásos OVSYNCH protokollt kell alkalmazni (GnRH a 26. napon, prosztoglandin a 33. napon, ismét GnRH a 35. napon, és termékenyítés a 36. napon, *Moreira és mtsai*, 2000). Folyamatos ivarzás megfigyelés esetén, ha bármelyik kezelt állat a kezelés során ivarzási tüneteket mutat, akkor sem termékenyíthető, ha az ivarzás elbírálása pozitív. Ez a módszer több okból előnyös lenne:

1. Az eredeti OVSYNCH protokoll ugyanis csak az ellést követő 75. nap után eredményes (ez kb. 30% vemhesülést jelent), míg a PROVSYNCH protokoll esetében a 71–72. napon már a termékenyítés is megtörténik.

2. A korai laktációs anösztruszos esetek száma eredményesen csökkenthető, ill. a szubklinikai metritiszes esetek hamarabb felderíthetők és eredményesen kezelhetők.

Eddigi saját vizsgálataink eredményei a 2. táblázatban láthatók.

2. táblázat

A Provsynch módszer eredményessége

	<i>Thatcher és mtsai</i> (2001)	Saját vizsgálatok (2001–2002)(1)
Termékenyített tehen(2)	462	164
Vemhes tehen(3)	233	62
Vemhesülés, %(4)	50,4	37,8

Table 2: Efficiency of the Provsynch protocol experiments(1), No. of AI cows(2), No. of pregnant cows(3), pregnancy rate(4)

Nagyon lényeges azonban, hogy minden kezelés eredményessége a kezelésre kerülő állatok kiválogatásán múlik. A rektálisan tapintható (vagy ultrahanggal vizsgálható) inaktív petefészkek (PMSG az 50. nap után vagy a *Provsynch* a 35. naptól) ill. aktív petefészkek és jól involvált méh diagnosztizálása esetén (*Ovsynch* a 75. nap után) indokolt a beavatkozás. Az irodalmi adatok alapján ugyanakkor az *Ovsynch* módszer hatékonysága a termékenyítés időpontjának változtatásával nem javítható, ezért kipróbálása nem indokolt, az utolsó méhkezelést követő 16–24 órán belül el kell végezni.

Korai vemhességvizsgálat: A két ellés közötti idő csökkentésére jelenleg a különböző szinkronizálási eljárásokon kívül a korai (a termékenyítés utáni 26–32 nap) vemhességvizsgálati módszerek alkalmasak. Ezek történhetnek:

— **Ultrahanggal:** Az ultrahang vizsgálatok legfőbb előnye az, hogy az üres tehenek kiválogatásával egy időben a petefészkek vizsgálata is megtörténik, és a diagnózis felállítása után azonnali oktani kezeléssel a tehenek vemhesítésre történő előkészítése megtörténik. Hátránya azonban a készülékek relatíve magas ára és az azok üzemeltetéséhez szükséges szakértelem megszerzésének hosszú ideje. Általánosságban elmondható, hogy csak hosszú távon megtérülő (és akkor sem olcsó) befektetésnek tekinthető.

— **Vemhességi fehérje (VSPB) kimutatásával vérmintából:** Vemhesség-specifikus protein B (VSPB) a vemhes kőrődő állatok vérérumában található fehérje, aminek létezéséről először a idahoi egyetem kutatói számoltak be. Radioimmun diffúziós módszerrel megállapították, hogy különbözik az α -feto-proteintól a fetuintól és a szarvasmarha placentális laktogéntól. Egy dupla antitest radioimmunoassay (RIA) módszert fejlesztettek ki egy közel tiszta VSPB ellen termeltetett nyúl antiszérummal (*Ruder és mtsai, 1988*). Ezt az assay-t használták a VSPB szérum szintjének meghatározására vemhes tehenekben és így fejlesztettek ki egy pontos, korai szerológiai tesztet a vemhesség megállapítására. A későbbiek során fejlesztettek ki egy ELISA tesztet, amelyet mi is alkalmazunk.

A korai vemhességvizsgálat a két ellés közötti időt jelentősen csökkentheti. A jelenlegi gyakorlat 45–90 nap közötti rektális vizsgálatot jelent az üzemekben. Egy általunk 2002-ben elvégzett vizsgálatban 5200 termékenyítést ellenőriztünk le az ELISA teszt segítségével és megállapítottuk, hogy a magyar fertilitási adatokat figyelembe véve a VSBP teszt alkalmazása minimum 6 (de átlagosan legalább 15) nappal csökkenthetné a két ellés közötti időt, ami mintegy 18–45 USD költség megtakarítását tenné lehetővé, a maximum 6 USD-ba kerülő teszt segítségével (*3. táblázat*).

3. táblázat

A vemhességspecifikus teszt (VSPB) eredményei

	2001.	2002.	2002/2.
Tehenek, n(1)	69	5200	168
Pontos diagnózis(2)	69	4010	164
Fals pozitív	0	1040	4
Fals negatív	0	150	0

Table 3.: Results of the BPSPB test
No. of cows(1), correct diagnosis(2)

IRODALOM

Burke, J.M. – De La Sota, R.L. – Risco, C.A. – Staples, C.R. – Schmitt, E.J.-P. – Thatcher, W.W.(1996): Evaluation of timed insemination using a GnRH agonist in lactating dairy cows. J. Dairy Sci., 79. 1385–1393.

- Coulter, G.H. – Baily, D.R.C.(1988): Effects of ultrasonography on the bovine testis and semen quality. *Theriogenology*, 30. 4. 743–749.
- Coulter, G.H. – Senger, P.L. – Baily, D.R.C.(1988): Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. *J. Reprod. Fert.*, 84. 417–423.
- Farrel, P.B. – Presicce, G.A. – Brockett, C.C. – Foote, R.H.(1998): Quantification of bull sperm characteristics by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) and the relationship to the fertility. *Theriogenology*, 49. 871–879.
- Gábor, Gy. – Holzmann, A. – Györkös, I. – Sarlós, P.(2000): Prediction of the semen production by morphological measures of the testis (scrotal circumference, testicular echotexture and tonometry) in Holstein-Friesian bulls. *Biology of Reproduction* 62 (Supplement 1):331–332.
- Gábor, Gy. – Kastelic, J.P. – Cook, R.B. – Sasser, R.G. – Brito, L.F.C. – Völgyi Csík, J. – Coulter, G.H. – Györkös, I.(2001): Effects of GnRH Treatment on Scrotal Surface Temperatures in Bulls. *Can. J. Vet. Res.*, 65. 60–63.
- Gábor, Gy. – Kastelic, J.P. – Pintér, S. – Szász, F. – Szigeti E. – Solymosi N.(2002): Improving reproductive performance in lactating dairy cows by synchronising ovulation or inducing oestrus. *Acta Vet. Hung.*, 50. 2. 231–234.
- Gábor, Gy. – Mézes, M. – Tózsér, J. – Bozó, S. – Szűcs, E. – Bárány, I.(1995): Relationship among testosterone response to GnRH administration, testes size and sperm parameters in Holstein-friesian bulls. *Theriogenology*, 43. 1317–1324.
- Gábor, Gy. – Nagy, S. – Szász, F. – Szigeti, E. – Solymosi, N.(2002): Comparative semen motion analysis by two computer assisted methods in AI bulls. *Biology of Reproduction* 66 (Supplement 1) 289.
- Gábor, Gy. – Sasser, R.G. – Falkay, Gy. – Bozó, S. – Völgyi Csík, J. – Bárány, I. – Boros, G.(1997): Comparative testicular echotexture and the sperm production of young and older Holstein-Friesian bulls. *J. Anim. Sci.*, 75. (Suppl.) 118.
- Gábor, Gy. – Sasser, R.G. – Kastelic, J.P. – Coulter, G.H. – Falkay, Gy. – Mézes, M. – Bozó, S. – Völgyi Csík, J. – Bárány, I. – Szász, F. Jr.(1998): Scrotal and testicular characteristics and serum concentrations of LH and testosterone for prediction of sperm production in Holstein-Friesian breeding bulls. *Theriogenology*, 50. 2. 177-183.
- Gábor, Gy. – Sasser, R.G. – Kastelic, J.P. – Coulter, G.H. – Falkay, Gy. – Mézes, M. – Bozó, S. – Völgyi Csík, J. – Bárány, I. – Szász F.(1998): Morphologic, endocrine and thermographic measurements of testicles in comparison with semen characteristics in mature Holstein-Friesian breeding bulls. *Anim. Repr. Sci.*, 51. 215–224.
- Gábor, Gy. – Sasser, R.G. – Mézes, M. – Falkay, Gy. – Bozó, S. – Völgyi Csík, J. – Bárány, I. – Hidas, A. – Szász F. Jr., – Boros, G.(1998): Possibilities of using computer analyzed video and ultrasonic images for the evaluation of testis of bulls. *Theriogenology*, 50. 2. 223–228.
- Gábor, Gy. – Szász, F. Jr.(1999): Comparative study of the testicular echotexture (ET) and tonometry (TM) with the semen production and the non-return rate (NRR) in bulls. *Biology of Reproduction* 60 (Supplement 1) 264.
- Leidl, W.(1987): Computergesteuerte Videomikrographie-Auswertung zur Bestimmung der Spermienmotilität am Modell des Bullen. *Dtsch. Tiertz. Wochenschr.*, 94. 461–464.
- Moreira, F. – Orlandi, C. – Risco, C. – Lopes, F. – Mattos, R. – Thatcher, W.W.(2000): Pregnancy rates to a timed insemination in lactating dairy cows pre-synchronized and treated with bovine somatotropin; cyclic versus anestrus cows. *J. Anim. Sci.*, 78. Suppl. 1. 134.
- Nebel, R.L.(2000): Maximizing fertility in the dairy herd. *Advances in Dairy Technology*, 12. 165–176.
- Post, T.B. – Christensen, H.R. – Seifert, G.W.(1987): Reproductive performance, and productive traits of beef bulls selected for different levels of testosterone response to GnRH. *Theriogenology*, 27. 2. 317–328.
- Pursley, J.R. – Kosorok, M.R. – Wiltbank, M.C.(1997): Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J. Dairy Sci.*, 80. 301–306.
- Risco, C.A. – Drost, M. – Archbald, L. – Moreira, F. – de la Sota, R.L. – Burke, J. – Thatcher, W.(1998): Timed artificial insemination in dairy cattle – Part I. *Compend Contin. Educ. Pract. Vet.* 20. 1284–1289.
- Ruder, C.A. – Sasser, R.G. – Ivani, K.A. – Panlasigui, P.M. – Dahmen, J.J. – Stellflug, J.N.(1988): *Theriogenology*, 30. 4. 743–749.
- Senger, P.L.(1994): The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. *J. Dairy Sci.*, 77. 27–45.

Thatcher, W.W. – Moreira, F. – Santos, J.E.P. – Mattos, R.C. – Lopes, F.L. – Pancarci, S.M. – Risco, C.A.(2001): Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 55. 75–89.

Szerző címe: Gábor, Gy.: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutató Intézet
Authors' address: Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés u. 1.
Szász, F.: Androvet Kft.
H-1237 Budapest, Szt. László u. 175

NYÚLSPERMA MÉLYHÜTÉSÉNEK ÉRTÉKELÉSE MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATTAL ÉS MESTERSÉGES TERMÉKENYÍTÉSSEL *

BARANYAI BENCE — VIRÁG GYÖRGYI — POLGÁR ZSUZSANNA —
BODÓ SZILÁRD — KOVÁCS ANDRÁS — GÓCZA ELEN

ÖSSZEFOGLALÁS

A kísérletekben a mélyhűtésnek a nyúlpermára kifejtett hatását vizsgálták. Húsz tenyészbak ondóját vizsgálták *in vitro* módszerekkel és mesterséges termékenyítéssel fagyasztás előtt és után. A visszanyert sejtek aránya a friss ondóhoz viszonyítva annál nagyobb, minél kisebb az eredeti koncentráció. A fagyasztás jelentősen megváltoztatta az élő/holt sejtek arányát. Ezek az eredmények viszont nem tükröződnek a termékenységi mutatókban: nem találtak különbséget a fagyasztott-felolvasztott és a friss ondó termékenyítőképesége között. Fagyasztás hatására az élő, ép akroszómájú sejtek aránya jelentősen csökken. Az ondónak fagyasztással szemben mutatott érzékenységét bizonyíthatóan genetikai tényezők is befolyásolják: $h^2=0,6$ örökletességi együttható becsülhető meg. A tapintott vemhesülés nagyobb volt annál, mint a tényleges fialás. Ennek hátterében állhat, hogy a termékenyítő ondósejtek genetikai anyagát is károsíthatta a fagyasztás, ami embrióelhalást eredményezhetett.

SUMMARY

Baranyai, B. – Virág, Gy.Ms. – Polgár, Zs.Ms. – Bodó, Sz. – Gócza, E.Ms.: EVALUATION OF RABBIT SEMEN CRYOPRESERVATION WITH MORPHOLOGY ASSESSMENT AND ARTIFICIAL INSEMINATION

The effect of cryopreservation on rabbit spermatozoa was evaluated. The semen of twenty breeding bucks was evaluated with *in vitro* methods and AI. The recovery rate of cells was higher when original concentration was lower. Cryopreservation decreased the ratio of living cells significantly, but it was not proved in AI results: there was no difference between the fertilisation ability of fresh and frozen semen. Cryopreservation significantly reduces the live spermatozoa with intact acrosome. Presumably there are genetic factors that affect the sensitivity of the spermatozoa to cryopreservation, since the heritability (h^2) was estimated to be 0.6. Palpated pregnancies were found to be higher than that of Borns. It can be explained by the early death of the embryo due to possible genetic damage of the fertilising spermatozoa caused by cryopreservation.

* A vizsgálatokat az FVM 56805/2001 pályázat támogatta

BEVEZETÉS

A mesterséges termékenyítés alkalmazása az elmúlt évtizedben a nyúltenyésztő telepeken is általánossá vált. A tetszőleges időpontban és helyen történő termékenyítéssel a tenyésztői munka ütemezhető, egyszerűbb és olcsóbb. Egyben ellenőrizhető és fontos tényező lett a bakok ondótermelése, és lehetővé tette a hím állatok termékenységeinek közvetlen, *in vitro* értékelését.

Az egy időben termékenyített anyalétszám emelkedésével, különösen akkor, ha több csoportban termékenyítik azokat, egyre nagyobb igény mutatkozik a valamilyen formában tartósított ondó felhasználására. Ennek oka a saját bakok használata esetében például az, hogy egyes kevésbé eredményes termékenyítések után nagyszámú visszaforgó anya adódik hozzá a következő csoporthoz, vagyis a csoportok létszáma ingadozik. Ebben az esetben a baklétszámot az elképzelhető legnagyobb anyalétszámhoz kell igazítani, ami azonban egyes esetekben felesleges mennyiségű, máskor pedig csak szűkösen elég ondóellátást biztosít.

A nyúl ondójának mélyhűtéses tárolására már több közlemény jelent meg, de a gyakorlatban az eljárást nem használják. Az okok között szerepelhet, hogy a friss, ill. hűtve tárolt sperma értékeléséről, a különböző védőanyagok toxicitásáról, valamint a tárolt sperma használatáról (legkisebb szükséges spermaszám/dózis) eltérő adatok láttak napvilágot (*Alvariño, 2000*). Az ondómélyhűtés sikeres alkalmazását befolyásolja, hogy az egyes bakok ondójának fagyaszthatósága különböző lehet, amint az a szakirodalomban eddig közzétett eredmények (*Chen és mtsai, 1989*) alapján feltételezhető.

Kísérleteinkben a mélyhűtésnek a nyúlspermára kifejtett hatását vizsgáltuk. Munkánk célja volt a hosszú távú tárolhatóságot meghatározó tulajdonságok genetikai és környezeti hatásokra létrejövő variabilitásának megismerése is. Az első szakaszban a KÁTKI újzélandi fehér nyúl törzsbak állományának nem rokon egyedei spermájának jellemzőit vizsgáltuk meg. Ebből a célból bakonként négy spermamintát gyűjtöttünk és értékeltünk. A megfelelő motilitású mintákat fagyasztottuk, majd felolvasztás után ismét megvizsgáltuk. A második szakaszban a mélyhűtött/felolvasztott ondóval termékenyítettünk, kontrollként az ugyanattól a baktól levett nyers ondót használva. A harmadik szakaszban bakok és fiú utódaik spermájának tulajdonságait, fagyaszthatóságát és termékenyítőképességét hasonlítottuk össze.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokat a gödöllői Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet kísérleti telepén, fajtatiszta új-zélandi fehér hímeektől műhüvely segítségével vett ondóval végeztük. Az állatok a KÁTKI nyúl törzstenyészetének termékenyítő bakjai, amelyeket azonban a súlygyarapodásuk alapján választottak ki, az ondóminőség eddig nem szerepelt szelekciós célként. Az ondót a törzs termékenyítése utáni első hét végén, vagyis egy héttel a megelőző használat után gyűjtöttük.

A bakok külön teremben (16 világos 8 sötét megvilágítás, mesterséges szellőztetés), egyszintes ponthegeesztett rácsketrecekben voltak elhelyezve. Vi-

zet szopókás önitátoról, takarmányt önetetőkből *ad libitum* fogyasztottak. Takarmányozásukra kereskedelmi forgalomban kapható hízónyúl tápot használtunk.

Az összes, a kísérletben használt vegyszer a Sigma Chemical Co. (Saint Louis, USA), „cell tested” vagy „embryo tested” minőségű terméke volt.

Az ondó mennyiségi és minőségi tulajdonságainak értékelése

Vizsgált paraméterek:

Térfogat (ml): Az egy ugratás során leadott ondó mennyisége a kocsonyás rész eltávolítása után.

Átlagos térfogat (ml): A négy mintavétel alkalmával kapott sperma mennyiség átlaga.

Termékenyítési %: *In vivo* termékenyítéssel kapott utódok száma alapján számolt termékenyítési százalék.

Becsült motilitás (%): Az egyes mintavételkor gyűjtött spermamintákban kapott becsült szubjektív motilitás százalékban.

Koncentráció (*10⁶ db/ml): A négy mintában számolt sperma koncentrációértékek átlaga. Meghatározását Makler-kamra segítségével végeztük. A számoláshoz az ondóból kivett mintát formaldehid tartalmú PBS oldatban hígítottuk.

Élő/holt sejtek aránya (%): A Kovács-Foote féle festés után, az egyes mintákban számolt élő spermiumok arányának átlaga.

Az akroszóma állapota: ép, sérült, hiányzó (Kovács-Foote festés)

A spermiumok életképességének meghatározásához a szarvasmarha mellett a nyúlondóra is eredményesen alkalmazható Kovács-Foote féle festést (Kovács és Foote, 1992) használtuk. A festéshez a hígítást 0,9%-os NaCl oldattal végeztük. A módszer Trypan-kéket és Giemsa oldatot két lépésben alkalmazó egyszerű festési módszer. Az alkalmazott festési eljárással az élő és elhalt sejtek megkülönböztetéséhez a fej hátulso része és a fark, az akroszóma állapotának elbírálásához a fej elülső része nyújt információt. Az élő spermiumok akroszóma mögötti része világos a holtaké sötét. Az ép akroszóma színe bíbor, a fellazulté ugyancsak bíbor (ívelt határvonallal), a sérülté világos levendula, míg az akroszóma hiányát fehér (szürke) szín jelzi. A festődött fark színe fekete. Az akroszóma állapota alapján az élő és a holt spermiumok között három-három csoport könnyen megkülönböztethető: az ép, a fellazult/sérült akroszómájú, valamint az akroszóma nélküli spermiumok csoportja. Az élő és ép akroszómájú spermiumokon belül még egy festődő farkú csoportot is megkülönböztetünk: ezek, bár élnek, de mozgásra nem képesek. Ezzel az élő és ép akroszómájú, az élő, de károsodott akroszómájú, a holt, de ép akroszómájú és a holt, károsodott akroszómájú sejtek arányának gyors meghatározása mellett a más festési eljárással élőnek látszó, de valójában sérült farkú, termékenyítésre nem alkalmas spermiumok is kimutathatók és arányuk is meghatározható (Nagy és mtsai, 1999). E módszer használata elsősorban nem a frissen felhasznált, hanem a felhasználás előtt fagyasztva tárolt ondó minősítésénél hasznos.

A bakok közötti és a fagyasztás-felolvasztás hatására létrejött különbségek jelentőségének összehasonlítására a *GeneStat6* szoftver Chi² eljárását hasz-

náltuk. A mennyiségi mutatókat *GeneStat6* szoftver variancia és kovariancia analízis eljárásával értékeltük.

Az ondó tulajdonságainak jellemzése in vivo

A fagyasztott majd felolvasztott ondóval 16 hetes korú, szűz újjélandi fehér fajtájú, $3,5 \pm 0,21$ kg testsúlyú nőivarú nyulakat termékenyítettünk. A kontroll csoport azonos jellemzőkkel rendelkező ($3,33 \pm 0,78$ kg) anyanyulainak termékenyítéséhez azonos bakoktól frissen vett, minősített és azonos koncentrációra hígított ondót használtunk. A termékenyítéssel egy időben adott 25 NE GnRH analóggal (Ovurelin inj. AUV, Reanal Finomvegyeszergyár) idéztük elő a peteleválást. A termékenyítés steril üveg katéterrel végeztük. Egy termékenyítő adag mintegy félmilliliternyi hígított ondót tartalmazott. A hígító nyers ondó esetében kereskedelmi forgalomban kapható készítmény (Spermicum, Anivet) volt, fagyasztott ondó esetében a védőanyagot tartalmazó hígító volt. A spermakonzentráció 20 millió/ml volt, így egy inszemináláskor kb. 10 millió hímivarsejt került a női nemi utakba.

A vemhesülést a 12. napon tapintással ellenőriztük, az anyák a termékenyítést követő 31–33. napon fialtak, amikor ellenőriztük az alomlétszámot. Feljegyzésre került a fialási százalék, az élve és halva született alomlétszám és bakonként is értékeltük a szaporasági mutatókat.

A hosszú távú tárolhatóság vizsgálatára alkalmazott módszerek

A mélyhűtési folyamatok során igen lényeges az a sebesség, amivel a sejt víztartalmának leadására képes. A gyakorlat a programozható hűtőgéppel végzett hagyományos (lassú) és az általában a közvetlenül folyékony nitrogénben (N_2) vagy előtte annak gőzében végzett gyors hűtést (vitifikációt) egyaránt ismeri. Az ún. vitifikálódáskor a jégkristály-képződésből eredő károsodásokkal nem kell számolni, ugyanis a magas védőanyag-koncentrációnak és a gyors lehűtésnek köszönhetően egy amorf, szilárd, kristályszerkezet nélküli halmazállapot alakul ki. A magas koncentráció miatt azonban fokozott lehet a védőanyag toxicitása. Az utóbbi években a vitifikáció gyakorlatilag elérte a programozott hűtés hatásfokát.

Előkísérleteink során a hosszú távú tárolhatóság (mélyhűtés) vizsgálatára két, az irodalmi adatok szerint jó túlélési eredményeket mutató vitifikációs módszert próbáltunk ki (*Besenfelder*, szóbeli közlés; *Vicente és Viudes-de-Castro*, 1996). E módszerek az alkalmazott védőanyagok ill. azok koncentrációja tekintetében különböznek egymástól. Olyan módszert kerestünk, ami a tenyésztői gyakorlatban is viszonylag könnyen és jól használható. A kísérletek alapján (*Baranyai és mtsai*, 2001) a Besenfelder-féle módszer tűnt hatékonyabbnak, ezért jelen kísérletünkben ezt használtuk. E módszer további előnye, hogy anyag- és eszközigénye viszonylag csekély, a mélyhűtéshez szükséges hőmérsékleti lépcsők könnyen reprodukálhatók.

Az eljárás során a szobahőmérsékletű ondót kétszeres mennyiségű, 9 v/v% Me_2SO -t és 15 v/v% tojássárgáját tartalmazó, Tris-citrát alapú védőanyaggal kevertük össze (csepegtetve), majd 90 percre háztartási hűtőgép 5 °C-os hűtőterébe tettük. A szükséges eszközöket (csövek, pipetták) és anya-

gokat előzőleg ugyancsak erre a hőmérsékletre hűtöttük le. Ezután az ondó eredeti térfogatával megegyező mennyiségű lehűtött (5 °C) 4 v/v% glicerint és 15 v/v% tojássárgáját tartalmazó tris-citrát alapú védőanyagot adtunk hozzá, majd óvatosan összekevertük. A keveréket 0,5 ml-es műszalmákba (IMV, France) töltöttük, azokat polyvinyl-alkohol porba mártottuk, ami nedvesség hatására megkeményedve a szalmát lezárta. A szalmákat a hűtőbe (5 °C) tettük. 30 perc elteltével a folyékony nitrogén gőzébe helyeztük őket 20 percre, majd a nitrogénbe merítettük. A felolvasztás 39 °C-os vízfürdőbe történő, 10–12 mp-ig tartó merítéssel történt.

A vizsgálatok során 16 bak spermamintáinak teljes körű feldolgozása történt meg.

EREDMÉNYEK

In vitro vizsgálati eredmények

A fagyasztás során a sejtek egy része oly módon károsodik, hogy sejtként a felolvasztás után már nem azonosítható. Így a fagyasztás alatti sérülések első hatékony mutatója a visszanyert sejteknek az eredeti sejtszámhoz viszonyított aránya. A visszanyert sejtek számát elsősorban a nyers minta koncentrációja befolyásolja ($P < 0,001$, $R^2 = 0,17$, $b = +0,7$), és ebben a tekintetben a bakok teljesen egyformák. A visszanyert sejtek aránya viszont a friss ondóhoz viszonyítva annál nagyobb, minél kisebb az eredeti koncentráció ($P = 0,06$, $R^2 = 0,04$, $b = -0,6$) és itt sem figyelhető meg egyedek között jelentős különbség. A kapott alacsony R^2 értékek ráadásul arra figyelmeztetnek, hogy számos egyéb tényező is befolyásolhatja az eredményeket.

Fagyasztott sejtek esetében a módszer sikerességének egyik legfontosabb fokmérője az élő/holt sejtek aránya. Ezt vizsgáltuk a friss és a felolvasztott mintákban és értékeltük a bakok közötti különbségeket is. Az eredményeket az 1. ábra mutatja.

Jól látható, hogy a fagyasztás jelentősen befolyásolta az élő/holt sejt arányt, az élő sejtek aránya alacsonyabb volt a felolvasztott mintákban (Pearson-féle χ^2 érték 12 szf-al 521,43, ami $P < 0,001$ szignifikáns hatást mutat, ezen belül a bakok közötti jelentős eltérésekkel). A 1027 és 28396 számú bakok kiemelkedően jó minőségű ondót termelnek, szemben a 28815-ös állattal, melynek már a friss ondójában is magas a holt sejtek aránya. A 1027-es állat ugyanakkor a legtöbb holt sejtet tartalmazza a felolvasztás után, tehát sejtjei igen érzékenyek a fagyasztásra. A 28815-ös állat a felolvasztott ondó tekintetében is a legrosszabbak között van. Viszont a 28284-es bak spermiumsejtjeit az átlagnál kevésbé érinti a fagyasztás. Ezek az eredmények viszont — a jelenlegi adatok alapján — nem tükröződnek a termékenységi mutatókban.

Az élő/holt arány azonban nem ad felvilágosítást a sejt funkcionális állapotáról. Ezt spermium esetében a termékenyítés folyamatában kulcsszerepet játszó akroszóma állapota mutatja. Termékenyítésre csak élő, ép akroszómájú spermium képes.

1. ábra: Az élő-holt arány a fagyasztás előtti mintákban, valamint a felolvasztás után

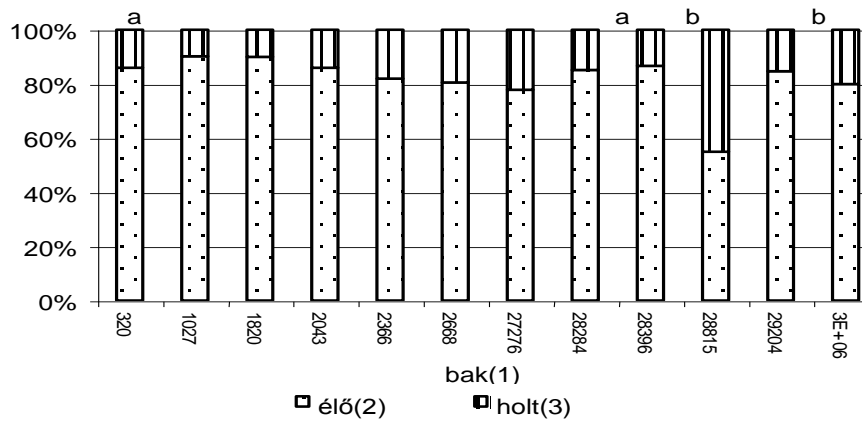


Fig. 1.: Live:dead ratio of spermatozoa in samples before and after cry preservation
buck(1), live(2), dead(3)

Fagyasztás hatására az élő, ép akroszómájú sejtek aránya jelentősen csökken. A fagyasztás komoly sérüléseket okoz, így a termékenyítésre képes frakció kárára nő az élő, de sérült akroszómájú sejtek, az ép, de holt sejtek, valamint a holt és sérült sejtek aránya (2. ábra).

2. ábra: Kovács-Foote festéssel elkülöníthető sejtek aránya fagyasztás előtt és után

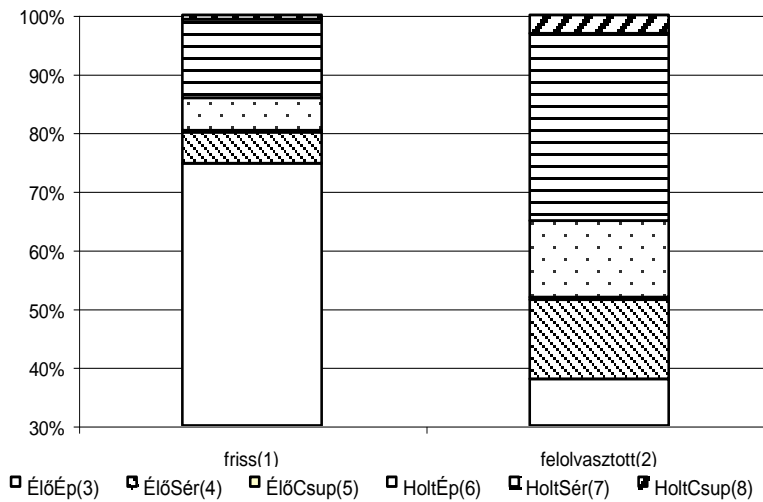


Fig. 2.: Spermatozoa fractions in fresh and frozen-thawed samples identified by Kovács-Foote staining
fresh(1), thawed(2), live, intact(3), live, damaged(4), live, detached(5), dead, intact(6), dead, damaged(7), dead, detached(8)

Az élő, ép sejtek arányát az ondóban a bak valamint az ondó állapota egyaránt szignifikánsan befolyásolja (3. ábra). A fagyasztás-felolvasztás során ez az érték a felére csökken.

3. ábra: Az élő, ép akroszómájú sejtek aránya az egyes bakok ondójának friss és fagyasztott mintáiban

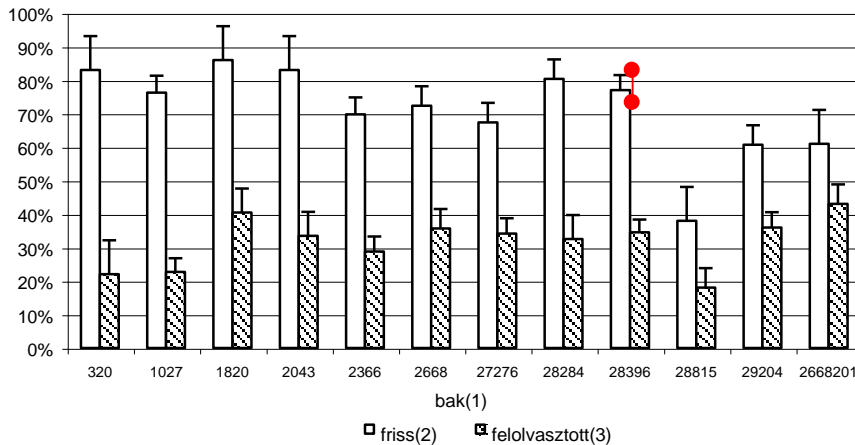


Fig. 3.: The ratio of living spermatozoa with intact acrosome in fresh and cryopreserved semen samples of bucks
buck(1), fresh(2), thawed(3)

Az apának az utód értékeire kifejtett hatása $P < 0,001$ szinten igazolt, és a teljes variancia jelentős részéért ($R^2 = 0,73$) felelős. Ugyanakkor a variancia okai között szerepel a fagyasztás-felolvasztás folyamata is ($P < 0,001$), aminek eredményeként az élő és ép sejtek arányának átlaga 35%-kal lett alacsonyabb. Az apa és fiú értékek között erősebb a kapcsolat a felolvasztás után, vagyis ez a kapcsolat kölcsönhatásban van az ondó állapotával. A felolvasztás utáni ondóban 1 érték emelkedés az apa esetében 0,3 érték emelkedést jelent az utódoknál, amiből $h^2 = 0,6$ örökletességi együttható becsülhető meg. Tehát az ondónak a fagyasztással szemben mutatott érzékenységét bizonyíthatóan genetikai tényezők is befolyásolják.

Termékenyítési eredmények

Két alkalommal összesen 67 termékenyítés történt júniusban és októberben. A friss ondóval termékenyített 32 anyából nyolc fialt le (25%), míg a fagyasztott ondóval termékenyített 35 anyából tíz fialt (29%).

Az októberben végzett termékenyítés lényegesen jobb eredményt hozott; ugyanez az arány 38, ill. 41% volt (5/13 ill. 7/17). Tehát nem találtunk különbséget a fagyasztott-felolvasztott és a friss ondó termékenyítőképessége között az *in vivo* vizsgálatok során, holott az *in vitro* értékelések bebizonyították a fagyasztás elkerülhetetlen káros hatását. Azonban az eredmények a friss ondóval termékenyített csoportban is az elvártól sokkal rosszabbak lettek. A júniusi

rosszabb vemhesülési és fialási adatok okaként elsősorban az igen kedvezőtlen nagy meleg jelölhető meg. Az októberi adatok sem túl jók azonban, még a frissen gyűjtött ondó esetében sem. Erre az adhat magyarázatot, hogy a termékenyítő adagok sejtszámát, a bakok közötti különbségek megtalálása érdekében szándékosan igen alacsony értékre (10×10^6 db/0,5 ml) állítottuk be. Meg kell azonban jegyezni azt is, hogy ez a sikeres termékenyítés elfogadott alsó küszöbszintje. A tapintott vemhesülés magasabb volt annál, mint ami fialás megtörtént. Ennek hátterében állhat, hogy a termékenyítő ondósejtek genetikai anyagát is károsíthatta a fagyasztás, ami embrióelhalást is eredményezhetett.

Az átlagos alomlétszámot a fagyasztás ($3,72 \pm 0,6$ illetve $7,32 \pm 1,2$, $P < 0,02$) ténye befolyásolta elsősorban. Erre az évszak (meleg) nem volt hatással és a bakok között sem voltak igazolhatók a különbségek.

KÖVETKEZTETÉSEK

A nyúlondó hosszú távú eltarthatóságára irányuló kísérleteink, mind az életképességet (élő/holt arány), mind a funkcionalitást (élő, ép akroszómájú sejtek aránya, termékenyítési adatok: vemhesülési százalék) tekintve, az irodalmi adatokkal összevethetők. A vemhesülési százalék abszolút értékének alacsony volta a natív spermával történt termékenyítéskor a rossz klimatikus viszonyokkal, ill. annak az anyákra kifejtett kedvezőtlen hatásával magyarázható.

Az ondó életképességének *in vitro* vizsgálatokor alkalmazott eljárások között a Kovács-Foote festés az élő és termékenyítőképes sejtek számának/arányának meghatározására különösen a fagyasztás okozta károsodások értékelése esetében volt eredményes. Kiértékelése a jelenlegi technológiával munka és időigényes. Mivel az élő és mozgásképes sejtek egymástól jól meghatározhatóan elkülönülnek, ezért a jövőben érdemes lenne erre a célra számítógépes képanalizáló módszert is kidolgozni.

Sajnos, az *in vivo* termékenyítési eredményekkel az *in vitro* ondóértékelés (Kovács-Foote szerinti élő és termékenyítőképes ivarsejtek) eredményei nem mutattak korrelációt. Ráadásul a használt módszer (anyák mesterséges termékenyítése és fialtatása) igen hosszadalmas, számos egyéb külső hatás befolyásolja és a szükséges nagyobb számú termékenyítés (különösen rossz eredmények esetében) igen drága is. Ezért a jövőben jobb lenne ezeket a vizsgálatokat *in vitro* termékenyítési tesztekkel vagy az anyáknak a termékenyítés után 96 órával végzett laparoszkópos vizsgálatával végezni. Ez esetben a sárgatestek és az embriók is igen pontosan megszámlálhatók, miáltal a késői embrióelhalás és a magzatelhalás okozta veszteségek kiszűrhetők.

A továbbiakban érdemes lenne vizsgálni, hogy a fagyasztás a sejtmorfológia károsítása mellett miként befolyásolja az ondósejt genetikai anyagát, így a létrejött embriók életképességét.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetet mondanak Gódor Katalinnak (KÁTKI) és Molnár Erikának (KÁTKI) a mintavételben, a termékenyítésben és a kiértékelésben nyújtott segítségükért.

IRODALOM

- Alvariño, J.M.R.*(2000): Reproductive performance of male rabbits. *Wrlld. Rabbit Sci.*, 8. Suppl. 1. 13–36.
- Baranyai, B. – Somfai, T. – Virág, Gy. – Laczkó, L. – Ri Hak, Chol – Polgár, Zs. – Gócza, E.*(2001): Nyúlsperma hosszútávú tárolási lehetőségének vizsgálata nyúlban. 13. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 47–54.
- Chen, Y. – Li, J. – Simkin, M.E. – Yang, X. – Foote, R.H.*(1989): Fertility of fresh and frozen rabbit semen inseminated at different times is indicative of male differences in capacitation time. *Biol. Reprod.*, 41. 5. 848–853.
- Kovács, A. – Foote, R.H.*(1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech Histochem.*, 67. 3. 119–124.
- Nagy, S. – Háza, G. – Papp, A.B. – Iváncsics, J. – Szász, F. – Szász, F.Jr. – Kovács, A. – Foote, R.H.*(1999): Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology*, 52. 7. 1153–1159.
- Vicente, J.S. – Viudes-de-Castro, M.P.*(1996): A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36. 485–492.

Szerző címe: Baranyai, B. – Bodó, Sz. – Gócza, E.: Mezőgazdasági Biotech. Kutatóközpont
Authors' address: Agricultural Biotechnology Center
H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi A. u. 4.; benbar@abc.hu
Virág, Gy.: Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Institute for Small Animal Research
H-2100 Gödöllő, Pf. 417.
Polgár, Zs.: Szent István Egyetem
Szent István University
H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi A. u.1.
Kovács, A.: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.

EXAMINATION OF DIFFERENT BOAR'S SEMEN DURING SHORT STORAGE

MAKKOSNÉ PETZ, BRIGITTA Ms.— DEÁK, EDIT Ms.—
BALI PAPP, ÁGNES Ms.— IVÁNCICS, JÁNOS†

SUMMARY

Artificial insemination is a common and frequently used method in animal breeding. The semen of boars of high genetic value can be used in a wider range using this method and, moreover, it makes swine meat production more efficient by ensuring a higher reproduction rate. The different staining processes elucidate the rate of living/dead cells, and the integrity of acrosomes. Most recently, fluorescent microscopy became one of the fundamental techniques of plasma membrane integrity examinations. Its advantage is its rapidity, less subjective, thus less dependent from technical routine.

During the examinations, we applied the trypan blue-Giemasa stain (*Kovács and Foote*, 1992 stain), and the modified *Harrison and Vickers* (1990) fluorescent stain method. The aim of the experiment is the daily calculation of living/dead sperm and to trace the acrosome changes during the 7 day-long storage experiment. Samples were taken from the diluted sperm stored at 17 °C each day during the 7 days of the examination; smashes were prepared, and stained with both methods. 200 sperm were examined by each smash with 400 times magnification and classified afterwards. We experienced by examining the five boars' semen that the moving sperm rate is 80% in the ejaculate. The quality of the semen proved to be higher by applying the *Kovács and Foote* (1992) staining method, compared to the fluorescent method. This tendency remained throughout the 7 days. Both staining methods showed that the quality of the semen declined day by day during the examination. The rate of living sperm with sound acrosome by *Kovács and Foote* (1992) stain is above 82% during the first 5 days, however, the same type of sperm is only above 75% during the first 4 days by fluorescent stain. By *Kovács and Foote* (1992) the last 2 days, still above 80%, meanwhile with the fluorescent stain value is only 45%. The number of dead cells grew in the highest quantity at the cost of the living cells, but what most significantly grew within this category is the rate of the damaged acrosome sperm.

ÖSSZEFOGLALÁS

Makkosné Petz B. – Deák E. – Bali Papp Á. – Iváncsics J.†: KÜLÖNBÖZŐ KANOK TERMÉKENYÍTŐ ANYAGÁNAK VIZSGÁLATA RÖVID IDEJŰ TÁROLÁS SORÁN

A mesterséges termékenyítés ma már széles körben elterjedt és használt módszer az állattenyésztésben. A nagy genetikai értéket képviselő apaállatok termékenyítő anyaga szélesebb körben felhasználható a módszer segítségével, és többek között eredményesebbé teszi a sertés-hústermelést a magasabb szaporulat biztosításával. A különböző festési eljárásokkal fény derül az élő/elhalt sejtek arányára és az akroszóma integritására is. Újabban a fluoreszcens mikroszkópia az alapvető technikák egyike lett a plazmamembrán integritásának vizsgálatában. Előnye, hogy gyors, kevésbé szubjektív, ezért kevésbé függ a technikai jártasságtól.

Vizsgálataink során a *Kovács és Foote* (1992) féle festést, és a módosított *Harrison és Vickers* (1990) fluoreszcens festést is alkalmaztuk. A kísérlet célja, hogy *in vitro* körülmények között naponta megbecsüljük az élő/elhalt spermiumok számát, valamint az akroszóma változásokat is nyomon követhessük a 17 °C-on végzett hét napos tárolási kísérlet során.

A 17 °C-on tartott hígított spermából a vizsgálat hét napja alatt minden nap mintát vettünk, keneteket készítettünk, majd mindkét módszerrel megfestettük és minden kenetnél kétszáz spermiumot vizsgáltunk meg négyszázszoros nagyítással és osztályoztuk a spermiumokat.

Az öt kan termékenyítő anyagának vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy az ejakulátumban lévő mozgó spermiumok aránya 80%-ra tehető. A *Kovács és Foote* (1992) féle eljárást használva a termékenyítő anyag minősége valamivel magasabbnak mutatkozott, mint a fluoreszcens festést

alkalmazva. Ez a tendencia végig megmaradt a hét nap során. A vizsgálat során mindkét festési eljárás azt mutatta ki, hogy a termékenyítő anyag minősége napról napra romlik. A Kovács és Foote (1992) féle festésnél az élő, ép akroszómával rendelkező spermiumok száma az első öt napon 82% fölötti, míg ugyanezen típusú spermium a fluoreszcens festésnél az első négy napon 75% feletti, az utolsó két napon ez a típus az első festéssel még mindig 80% feletti de a fluoreszcens festéssel csak 45%-os értéket mutatott. A tárolás során a legnagyobb mennyiségben az elhalt sejtek száma növekedett meg az élő sejtek számának rovására, ezen kategórián belül is a sérült akroszómájú spermiumok aránya növekedett legjelentősebben.

INTRODUCTION

Artificial insemination is a common and frequently used method in animal breeding. The semen of boars of high genetic value can be used in a wider range using this method and, moreover, it makes swine meat production more efficient by ensuring a higher reproduction rate. The different staining processes elucidate the rate of living/dead cells, and the integrity of acrosomes. Most recently, fluorescent microscopy became one of the fundamental techniques of plasma membrane integrity examinations. Its advantage is its rapidity, less subjective and, therefore, less dependent on a technical routine.

During the examinations, we applied the *Kovács and Foote (1992)* stain, and the modified Harrison and Vickers fluorescent stain method. The aim of the experiment is the daily calculation of living/dead sperm and to trace the acrosome changes during the 7 day-long storage experiment. Samples were taken from the diluted sperm stored at 17 °C each day during the 7 days of the examination.

MATERIALS AND METHODS

The essence of the simple and accurate *Kovács and Foote (1992)* is the following:

To demonstrate the living/dead sperm, we used a 0,25% concentrated Trypan blue (Sigma T 6164) stain in a 0,81% concentrated NaCl – solution. The rear part of the living sperm will develop a light colour, such as white or light pink, and the same part of the dead sperm will turn black, grey or dark violet.

The stain of the acrosome is a 5–7,5% concentrated Giemsa solution in distilled water. Sperm with intact acrosome turn dark purple and sperm with damaged acrosomes will turn light lavender. The front part of the head of the living sperm without acrosomes is white or light pink, and it is white or light grey at the same part of the dead sperm without acrosomes, and the postacrosome ring is red. We took ejaculate from ten boars that we diluted for a five times amount. We took a sample of the diluted sperm every day of the week, which was kept at 17 °C. The sampling was performed using a pipette. We dropped onto the slide one drop of the sperm and one of the stains, and mixed using another slide, then making a smear right away. The smear was dried at 21 °C, placed in a vertical position. After drying, the smears were put into a fixing bath for two minutes, then washed with drinking water and distilled water. They were dried

again and put into a Giemsa for 24 hours. Next, they were washed with distilled water and dried again. We examined 200 sperm from each smear under a 400 times magnifying Zeiss microscope. Then, the counted sperms were categorised:

1. Living sperms with intact acrosome.
2. Living sperms with damaged acrosome.
3. Living sperms without acrosome.
4. Dead sperms with intact acrosome.
5. Dead sperms with damaged acrosome.
6. Dead sperms without acrosome.

The fluorescent stains can be divided into two main groups: according to their colour, they are either living or dead cells. The stains which colour the living cells are the substrates of those enzymes which are active only in the living cells or they are those kinds of stains which fluoresce only in the living cells because their fluorescence depends on exist of the operating ion-pump. The Ca-acethyl-methyl-aester (CAM) and the 6-charboxy-fluorescein-diacetat percolates through the membrane of the living cell as it hardens, causing an enzymatic split that will make it fluoresce in green colour.

The stains, which colour the dead cells cannot percolate through the membrane of the living cell, but the damaged membrane and the membrane of the dead cell. The fluorescence of these stains is low but their fluorescent linkage to the DNA shows very high value. The stains of the living and death cells are used together.

The essence of the fluorescent staining that we used is the following:

The intracellular esterase in the living cells transform the permeable charboxyfluorescein-diacetat into non-permeable carboxifluorescein and, in this way, the acrosome, the mitochondrion and the cytoplasm of the living cell fluoresce in green colour. The non-permeable propidium-iodide can accumulate only where the charboxyfluorescein did not accumulate (death cells). We took samples from examined matter every day and we stained them and then we counted out 200 sperm under a 200 times magnifying fluorescent microscope. Adopting the fluorescent staining, we could rank the sperms into four different classes:

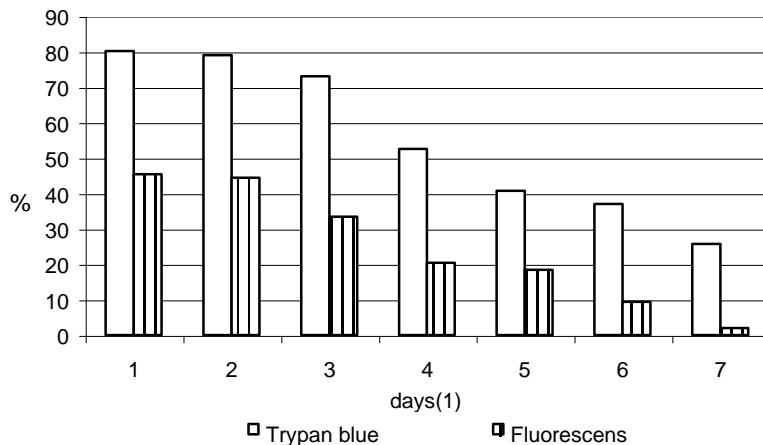
1. Cells that fluoresce in green.
2. Most of the cell stained red, but the front part of its head fluoresces in green.
3. The postacrosomal ring fluoresces in green and the rest of the cell is stained red.
4. The whole cell is stained red.

RESULTS

The examination of the five boars' semen showed that the rate of the moving sperms in the ejaculate is about 80%. The quality of the semen proved to be higher by applying the *Kovacs and Foote* staining method compared to the fluorescent staining method. This tendency remained through out the 7 days. Both staining method showed that the quality of the semen declining day by day dur-

ing the examination. The rate of the living sperms with intact acrosome by *Kovács and Foote* (1992) stain is above 82% during the first five days, however the same type of sperm is only above 75% during the first 4 days by fluorescent stain. By *Kovács and Foote* (1992) the last 2 days still above 80% meanwhile with the fluorescent stain value is only 45%. The number of dead cells grew in the highest quantity at the cost of the living cells, but what most significantly grew within this category is the rate of the damaged acrosome sperms.

Fig. 1.: The change of the number of the living sperms with intact acrosome during the 7 days storage



1. ábra: Az ép akroszómájú élő spermiumok számának alakulása a 7 napos tárolás során napok(1)

The season when the insemination happened cannot be left out of consideration. It is proved by this examination. Studying the semen of the same boar, the quality of the ejaculate that was taken in March was much better than the one was taken at the end of June or at the beginning of July.

THE ASSESMENT OF THE STATISTICAL RESULTS

The number of the sperms with intact acrosome reduced during storage by both methods. Wondered if the tendencies of the quality decompose is the same in both staining method. So we made an F-test. I took into consideration at the statistical assessment the average results of the four boars then I compared them to each other.

The chart above shows that the value "F" is lower than the critical F-value, so these two methods proved that there is no different between the variance of the quality variation's tendency range.

Table 1.

The basic data of the statistical sample, day/%

Groups(1)	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Trypan blue	80.125	79	73	52.5	40.75	37	25.75
Fluorescens	45.375	44.375	33.375	20.375	18.375	9.375	2

1. táblázat: A statisztikai minta alapadatai, nap/% csoport(1)

Table 2.

The variance of the two samples F-test

	Trypan blue	Fluorescens
Expected value(1)	55.44643	24.75
Variancy(2)	486.4576	283.1094
Observations(3)	7	7
Df	6	6
F value(4)	1.718267	
P	0.263567	
F	4.283862	

2. táblázat: A kétmintás F-próba variáciája várt érték(1), variancia(2), megfigyelések(3), F-érték(4)

Table 3.

The two-sample t-test at equal variance

	Trypan blue	Fluoreszcens
Expected value(1)	55,44643	24,75
Variancy(2)	486,4576	283,1094
Observations(3)	7	7
Weighted variancy(4)	384,7835	
Df	12	
t value	2,927613	
P(T<=t)	0,00633	
t critical	1,782287	
P(T<=t)	0,01266	
t	2,178813	

3. táblázat: A kétmintás t-próba eredményei egyenlő szórások esetén várt érték(1), variancia(2), megfigyelések(3), súlyozott variancia(4)

Afterwards we made a two-sample t-test with the data of the examination which test can be used at equal variance.

The counted t-value is higher than the critical t-value, which means that there is a significant difference between the trypan blue-Giemsa staining method and the fluorescent staining method.

CONCLUSION

The above-mentioned results proved that the two different methods were used in the same time during the examination lead to different change in the tendency of the quality. This difference might have many reasons. The fluorescent method is not that widely used, meanwhile the *Kovács-Foote* stain method has been used for a long time. The difficulty of the sperm-ranging and the fact that I am inexperienced could lead to some mistakes. I think the Kovacs-Foote stain method is much more true because the data of my experiment mesh the data of others experiment.

Both staining method is easy to carry out, the fluorescent staining is quicker because it can be reviewed in an hour. The *Kovacs-Foote* staining method shows the rate of the living and dead sperms and also the integrity of the acrosome, which can help at the selection of the breeding animals. Although the fluorescent staining is more expensive it is still easier and faster method. Both methods are good to select the boars, which give the best quality of semen.

To raise the level of fertility, to provide more progeny we are not supposed to forget about the macroclimatic conditions.

REFERENCES

- Didion, B.A. – Dobrinszky, J.R. – Giles, J.R. – Graves C.N.*(1989): Staining procedure to detect viability and true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gam. Res.*, 22. 51–57.
- Ericksson, B. – Rodriguez-Martinez, H.*(1998): Effect of a prolonged holding time during cooling on post-thaw motility and viability of frozen boar spermatozoa. 14th Int. Congr. Anim. Reprod.
- Harrison, R.A P. – Vickers, S.E.*(1990): Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 88. 343–352.
- Juonala, T. – Salonen, E. – Nurtilla, T. – Andersson, M.*(1999): Three Fluorescens methods for Assessing Boar Sperm Viability. *Reprod. Dom. Anim.*, 34. 83–87.
- Kovács, A. – Foote, R.H.*(1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech. Histochem.*, 67. 119–124.
- Ortman, K. – Rodriguez-Martinez, H.*(1994): Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. *J. Vet. Med.*, A 41. 37–47.

Szerzők címe: Makkosné Petz, B.: Kossuth L. Gimnázium, Secondary School Kossuth L.
Authors' address: H-9200 Mosonmagyaróvár, Gorkij u. 1.
Bali Papp, Á. – Deák, E.: Nyugat-Magyarországi Egyetem
University of West Hungary
H-9200 Mosonmagyaróvár, Vár u. 2.

MÉNSPERMIUMOK ÉLŐ/ELHALT ÉS AKROSZÓMA FESTÉSE

KÚTVÖLGYI GABRIELLA — NAGY SZABOLCS — CZIMBER GYULA —
BALOGH ATTILA — STEFLER JÓZSEF — KOVÁCS ANDRÁS

SUMMARY

Kútvölgyi, G.Ms. – Nagy, Sz. – Czimber, Gy. – Balogh, A. – Stefler, J. – Kovács, A.: VIABILITY AND ACROSOMA STAINING OF STALLION SPERMATOZOA

A trypan blue-neutral red-Giemsa combined staining method was applied for simultaneous evaluation of the integrity of acrosome, sperm head and tail membrane and the morphology of stallion spermatozoa. The staining technique is simple and the slides can be evaluated by light microscopy. The standard (overnight) method is described and A trypan blue-neutral red-Giemsa combined staining method was applied for simultaneous evaluation of the integrity of acrosome, sperm head and tail membrane and the morphology of stallion spermatozoa. Different types of cells, morphological characteristics and abnormalities of stallion spermatozoa are shown on microscopical pictures.

BEVEZETÉS

Méneknél, a bikákkal ellentétben nem történt spermatermelésre, laboratóriumi minőségre, mélyhűthetőségre és fertilitásra generációk óta folytatott szelekció. Ezzel magyarázható, hogy az egyes lovak spermájának e jellemzői igen változatosak, magas arányban nem megfelelőek. A fagyasztott ménsperma minősége, ill. fertilitása jóval elmarad a friss spermától, ami jelenleg alkalmazását korlátozza. A hagyományos spermabírálat erősen szubjektív, a vizsgáló szakember tapasztalatán alapul, főleg a sperma sűrűségére és a sejtek motilitására (ill. progresszív motilitására) irányul. A mozgási képesség jó előrejelzője a sejtek életképességének, de nem minden esetben nyújt kielégítő adatot önmagában a sperma minőségének megítélésében. *Katila* (2001), számos különböző laboratóriumban végzett — spermaminőségre, minőség és fertilitás közötti összefüggésre irányuló — kísérletet áttekintve rámutat arra, hogy nagyon kevés tanulmányban találtak korrelációt az adott laboratóriumi teszt és a fertilitás között. Ennek egyik oka, hogy nehéz és költséges megfelelő számú kancát termékenyíteni és a kísérletbe bevonni, másrészt az egyes laboratóriumi metodikák általában a spermiumok életképességének és termékenyítőképességének csak egyes kiragadott jellemzőit vizsgálják. A tudomány mai állása szerint több teszt kombinációja szükséges a ménsperma fertilitásának előrejelzéséhez, ez különösen igaz fagyasztott sperma esetén. Megbízható *in vitro* sperma-értékelési módszer az előfeltétele a mélyhűtési technológiák fejlesztésének.

Számos laboratóriumi módszer ismert a sperma minőségének vizsgálatára. Ezek egy része valamilyen festési technikán alapul, amelyek többsége fluoreszcens eljárás. E helyen egy egyszerű, fénymikroszkópos technikát ismertetünk.

A tripánkék-Giemsza kombinációjával végzett élő/elhalt és akroszóma festés — első alkalmazása (Kovács és Foote, 1992) óta — számos állatfajon kipróbálásra került, a ménsperma festésének bemutatása 2000-ben történt (Kovács és mtsai, 2000). A festés minden eddig próbált háziemlősön (szarvasmarha, sertés, nyúl, juh, kecske, kutya, ló, jak, gímszarvas, dámszarvas, bivaly, egér) eredményesen alkalmazható volt.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Számos vizsgálati módszer használatos a spermiumok morfológiájának tanulmányozására. A leggyakrabban használt festési eljárás az eosin-nigrosin festés (Dott és Foster, 1972), az eosin-anilinkék (Van der Schaaf, 1952) és a Giemsa (Hancock, 1952; Graham, 1996). Az egyszerű fénymikroszkóppal értékelhető kombinált élő/elhalt + akroszóma festést Talbot és Chacon (1981), Didion és mtsai (1989), Dudenhausen és Talbot (1982), Kusunoki és mtsai (1984, 1987, 1988), Varner és mtsai (1987) írták le. Az elhalt sejtek tripánkékkal, az akroszóma, a kombinációtól függően rose Bengal-lal vagy Giemsa-val festődött. A spermát a tripánkékkal 10–15 percig inkubálták, majd mosták a kenetkészítés előtt. Ez az eljárás túl bonyolult volt a rutin vizsgálatokhoz, sok műterméket eredményezett, a sejttípusok nehezen voltak differenciálhatóak a tripánkék elhalványodása és a Giemsa hasonló színe miatt (Cross és Meizel, 1989; McBride és mtsai, 1990; Kovács és Foote, 1992). Rose Bengal használatával szükségessé vált egy „triple-stain” technika kidolgozása, amelynek során Bismarck barnát használtak harmadik festékként a Rose Bengál, sejtek hátsó feléből történő kiszorítására (Talbot és Chacon, 1981; Dudenhausen és Talbot, 1982; Kusunoki és mtsai, 1984, 1987). Aalseth és Saacke (1986) „fast green-eosin”-t használt komplex festékként. Bamba (1988) eosin-t kombinált interferencia kontraszttal a sejtek élő/elhalt és akroszóma státuszának értékeléséhez. Kovács és Foote 1992-ben tripánkék, neutrálvörös és Giemsa kombinációjával egy egyszerű, élő/elhalt és akroszóma-festést dolgozott ki. A festési eljárással az ondósejtek farokmembránjának festékpermeabilitása (élő/elhalt volta) is elbírálható (Nagy és mtsai, 1999; Kovács és mtsai, 2000; Domes és Stolla, 2001). A festődő farkú sejtek nem mozognak, így a vizsgálat szoros korrelációt mutat a sejtek életképességével (Nagy és mtsai, 2000).

ANYAG ÉS MÓDSZER

A festési módszer egy kombinált eljárás, amely lehetővé teszi, hogy az ondósejtek élő/elhalt státuszán kívül az akroszóma épségét és a spermiumok morfológiáját is elbíráljuk. Az eljárás előnye, hogy nem igényel speciális felszereltséget, a kenetek egyszerű fénymikroszkóppal 40x, vagy 100x immerziós objektívvel vizsgálhatók. Hátránya viszont, hogy az utolsó festési mozzanat (Giemsa festés) hosszadalmas, több órás eljárás, amit szeretnénk a módszer egyes fázisainak és anyagainak kisebb változtatásával lerövidíteni, hogy a festés a rutin spermabírálat során is használhatóvá váljon.

Festési eljárás, felhasznált anyagok: A standard festési eljárás során élő/elhalt festésre 0,27% tripánkék oldatot (Sigma T-8154 / pufferolt NaCl 2:1), fixálóként 0,2% neutrálvöröst (Sigma N-2880) és 5% formalint tartalmazó 1N HCL oldatot, az akroszóma festésére 7,5% Giemsa törzsoldatot (Sigma GS-500) használunk:

— A friss, vagy mélyhűtött/felolvasztott spermát festés előtt *pufferolt NaCl oldattal* (0,06% K₂HPO₄ anhidrátot és 0,825% NaCl-ot tartalmazó oldat) hígítjuk. A hígítás mértéke: 5–10x.

— A tárgylemez közepére egy *csepp tripánkéket*, majd arra *egy csepp spermát* teszünk, összekeverjük és a párhuzamosan elhúzott lemezekkel két *kenetet* készítünk.

— Légszárítás közel függőleges helyzetben.

— Két perc fixálás.

— Öblítés csap-, majd desztillált vízzel.

— Giemsa-festés 3,5–24 óráig (egy éjszakán át), minimum szobahő!! (20 °C alatt az akroszóma nem festődik)

— Öblítés csapvízzel, 2' differenciálás desztillált vízben.

— Légszárítás után lefedés Entellán-nal (Merck), vagy DPX-szel (BHD), majd mikroszkópos vizsgálat 100x immerziós objektívvel. Értékelés, számlálás counterrel, vagy papíron.

A kenetek fénymikroszkópos vizsgálatánál sárga fényzűrőt (~500 nm) alkalmazva az egyes színárnyalatok sokkal jobban elkülöníthetőek, így jobban differenciálhatóvá válnak az egyes sejttípusok.

EREDMÉNYEK

Értékelés, sejttípusok: A különböző sejttípusok eltérően festődnek, így könnyen megkülönböztethetőek. A neutrálvörös fekete/ibolyaszínű csapadékot alkot a tripánkékekkel, így az elhalt sejtek feje ill. farki része sötétre festődik, az élő sejtek fejének hátulso része festetlen marad, ill. lónál sok esetben halványkék árnyalatú. A fej elülső részét borító akroszóma bíborszínű lesz, ha ép, a sérültek sötét levendulaszínűre festődnek, a levált akroszómájú sejtek fejének elülső része szürkésfehér színű. Az eljárás külön előnye, hogy a sejtek farki részének membránintegritása is értékelhető. Az ondósejtek farka rózsaszínre festődik és általában hullámos lefutású, ha intakt; sötétkék/fekete és egyenes, ha elhalt. Azok az ondósejtek, amelyek farki membránja sérült, nem képesek mozgásra, így termékenyítésre sem. A különböző sejttípusokat az 1., 2. és 3. ábra mutatja.

MEGBESZÉLÉS

A festési módszer nehézségei és ezek kiküszöbölése ménsperma esetén: Ménspermánál az ondóplazma festődése időnként erős háttérrel eredményez, ugyanez érvényes a fagyasztó spermahígítóban lévő tojássárgájára is. Ezért a friss és mélyhűtött spermát minimálisan 5–10x-re hígítani kell. A friss és fagyasztott/felolvasztott ménspermában lévő ondósejtek egyaránt érzékenyek a környezeti hatásokra (hígító hőmérséklete, pH-ja, ozmolalítása). Főleg a hirte-

len, nagyfokú környezeti változások (hidegsokk, hyper/hypo-ozmózis stb.) okozhatnak tömeges sejtpusztulást, a valószínűleg rosszabb spermaminősítést eredményezve. Ezért a spermát festés előtt hasonló hőmérsékletű, foszfát puffert tartalmazó fiziológiás oldatban hígítjuk, így stabilizáljuk a pH-t, ezzel állandóbb környezetet alakítunk ki az ondósejtek számára. Formalint tartalmazó pufferoldatok hígítóként történő alkalmazása is kipróbálás alatt áll. Előnye, hogy fixálja a sejtmembránt, tehát a sejteket a festődés szempontjából eredeti állapotukban (élő/elhalt) tartja, így a további környezeti hatások kiiktathatók. Eddigi kísérleteinkben hátrányként tapasztaltuk, hogy a fixáló csökkentette az elhalt sejtek tripánkéék festődését és fokozta a háttérét.

Ménspermiumoknál esetenként nemcsak az akroszóma, de kisebb mértékben a posztakroszómális régió is festődik Giemsa-val, ami az egész sejtnél sötétebb árnyalatot kölcsönöz és zavarhatja az értékelést. Egészen friss felismerésünk szerint ez leginkább a későbbi időpontban fixált keneteken fordult elő. Ezért ménsperma esetében javasolt a tripánkéékkel történt festés után minél hamarabb lefixálni a kenetet.

Szintén utóbbi megfigyelés, hogy a Giemsa-festést elengedhetetlen minimálisan szobahőn végezni, mivel alacsony hőmérsékleten (20 °C alatt) az akroszóma nem festődött, valószínűleg a kémiai reakciónak alsó hőmérséklet-küszöbe van.

Kísérletek a festés gyorsítására: Gyors, rövid időn belül értékelhető eredményt szolgáltató festési eljárás kialakításán dolgozunk a standard festési módszerből kiindulva. Ez nagyban megkönnyítené a rutin spermabírálatot. A ménspermium akroszómája meglehetősen gyorsan festődik Giemsa-val, ami lehetővé teszi, hogy 2 óra alatt értékelhető mintát kapjunk (4. ábra). Eddigi vizsgálataink alapján úgy látjuk, hogy töményebb tripánkéék oldat és hosszabb fixálási idő (3–4 perc) szükséges a biztonságos elbíráláshoz. Az optimális paraméterek meghatározása folyamatban van.

Morfológia: Az eddig vizsgált 15 mén ejakulátumainak élő/elhalt+akroszóma festése és morfológiai bírálata során azt tapasztaltuk, hogy nagy arányban fordulnak elő Retzius-féle plazmacseppet hordozó sejtek mind az élő, mind az elhalt spermiumok között (más vizsgált állatfajok ejakulátumaiban ez nem jellemző). Az ilyen ondósejtek egyaránt megfigyelhetők a gyakran ugratott (túl-ugratott) és a ritkábban használt mének spermájánál is. Gyakrabban disztális (a plazmacseppes sejtek 50–80%-a), ritkábban proximális plazmacseppet találunk (5. ábra). A disztális plazmacseppel rendelkező sejtek egy részének farokrésze visszahajlik és ún. violinkulcsot alkot (6. ábra). Motilitásvizsgálat során ezek a sejtek retrográd irányban úsznak. A plazmacseppes sejtek fiatal, még az érési folyamatban lévő sejtek. A tapasztalat szerint a disztális plazmacseppet könnyen elhagyják (ezzel lezárul az érési folyamat), a proximális plazmacseppel rendelkezők viszont általában nem vesznek részt a termékenyítésben. Ezért fontos ezeknek a sejteknek a felismerése a friss és mélyhűtött sperma értékelésénél egyaránt, mivel nagyarányú előfordulásuk csökkentheti a sperma fertilitását. Eltartási próba során (10 óra, szobahőmérsékleten, pufferolt fiziológiás sóoldatban) azt tapasztaltuk, hogy a kedvezőtlen környezetet a fiatal plazmacseppes sejtek jobban tolerálták, a spermiumok nagy része elhalt, a szórányosan előfor-

duló élők mindegyike disztális plazmacseppes vagy azt éppen elhagyó ondósejt volt (7. ábra). A vizsgált mének között egy egyednél Dag-defektushoz hasonló morfológiai rendellenességet észleltünk. Másik két mén mélyhűtött spermamin-táinak vizsgálatakor kettős fejű, illetve kettős fejű és microcephal ondósejteket is találtunk (8. ábra), melyek a vizsgált méneknél közel 5%-ban voltak jelen.

A standard és a „gyors” festés egyaránt alkalmazható a spermaminőséget meghatározó paraméterek vizsgálatára, így meghatározhatjuk a sűrűséget, az élő/elhalt sejtek arányát, a sejtek akroszómájának állapotát, a morfológiailag hibás sejteket. Ez lehetővé teszi a folyékony tárolás, a mélyhűtés, felolvasztás és hőtűrő próba során bekövetkező károsodások részletes elemzését is.

1. ábra: Élő, ép ondósejt proximális plazmacseppel (a); elhalt, sérült akroszómájú sejt, disztális plazmacseppel (b)

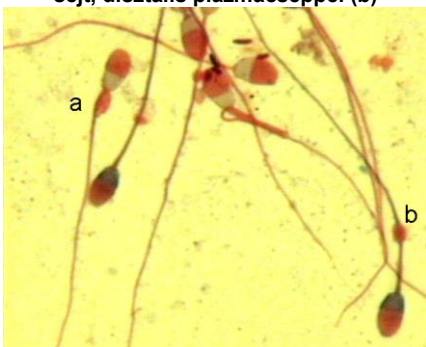


Fig. 1.: Live spermatozoon with intact acrosome and proximal cytoplasmic droplet (a); dead spermatozoon with damaged acrosome and distal cytoplasmic droplet (b)

2. ábra: Élő, ép akroszómájú spermiumok (a); elhalt, levált akroszómájú spermium, disztális plazmacseppel (b)

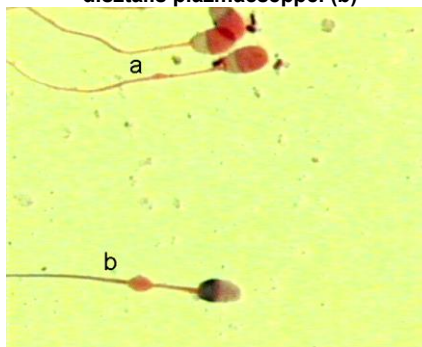


Fig. 2.: Live, intact spermatozoa (a); dead spermatozoon with lost acrosome and distal cytoplasmic droplet (b)

3. ábra: Élő, ép akroszómájú sejt, disztális plazmacseppel (a); élőfejű, elhalt farkrészű spermium (b); elhalt, levált akroszómájú sejt (c)

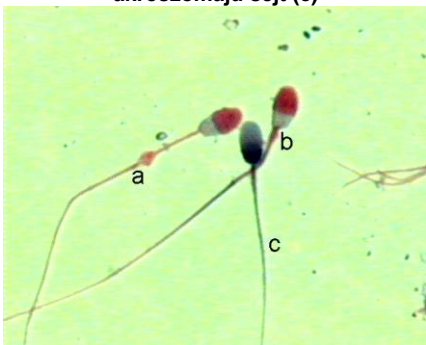


Fig. 3.: Live, intact cell with distal cytoplasmic droplet (a); spermatozoon with live head and dead tail (b); dead cell with lost acrosome (c)

4. ábra: Ép sejtek (a); élőfejű, elhalt farkú sejt (b); elhalt, levált akroszómájú sejt (c)



Fig. 4.: Intact cells (a); live head, dead tail of spermatozoon (b); dead spermatozoon with lost acrosome (c)

5. ábra: Élő, ép akroszómájú, disztális plazmacseppel rendelkező sejtek

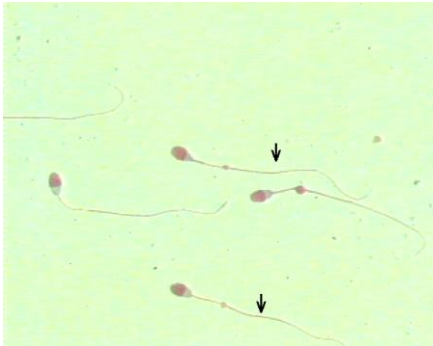


Fig. 5.: Live spermatozoa with intact acrosome and distal cytoplasmic droplet

7. ábra: Eltartási próba során plazmacseppet éppen elhagyó „túlélő” ondósejt az elhalt sejtek tömegében



Fig. 7.: Losing cytoplasmic droplet of survivor spermatozoon in the crowd of dead cells after 10 hours storage in room temperature

6. ábra: Élő, visszahajlott (violinkulcsos) farkú sejt

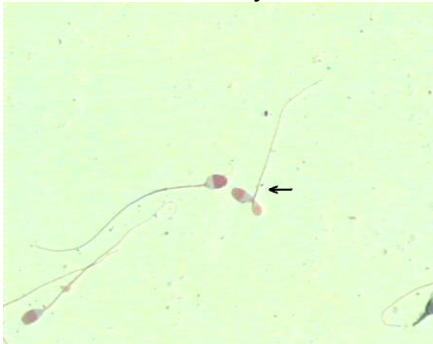


Fig. 6. Live cell with hairpin curved tail

8. ábra: Kettős fejű sejt

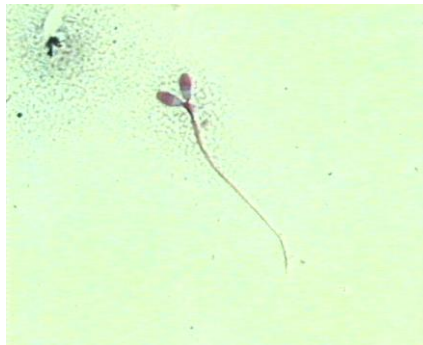


Fig. 8. Double-dead defect

IRODALOM

- Aalseth, E.A. – Saacke, R.G.(1986): Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. Gamete Res., 15. 73–81.
- Bamba, K.(1988): Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. Theriogenology, 29. 1245–1250.
- Cross, N.L. – Meizel, S.(1989): Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. Biol. Reprod., 1. 635–641.
- Didion, B.A. – Dobrinsky, J.R. – Giles, J.R. – Graves, C.N.(1989): Staining procedure to detect viability and true acrosome reaction in spermatozoa of various species. Gamete Res., 22. 51–57.
- Domes U. – Stolla R.(2001): Staining of stallion spermatozoa with damaged tail membrane after freezing/thawing. Anim. Repr. Sci., 68. 329–330.
- Dott, H.M. – Foster, G.C.(1972): A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'live/dead' stain. J. Reprod. Fertil., 29. 443–445.
- Dudenhausen, E. – Talbot, P.(1982): Detection and kinetics of the normal acrosome reaction of mouse sperm. Gamete Res., 6. 257–265.

- Graham, J.K.*(1996) Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 12. 119–130.
- Hancock, J.L.*(1952): The morphology of bull spermatozoa. *J. Exp. Biol.*, 29. 445–453.
- Katila, T.*(2001): *In vitro* evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review. *Acta Vet. Scand.*, 42. 199–217.
- Kovács, A. – Foote, R.H.*(1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech. Histochem.*, 67. 119–124.
- Kovács, A. – Foote, R.H. – Nagy, Sz. – Boersma, A. – Leidl, W. – Stolla, R. – Domes, U.*(2000): Live/dead and acrosoma staining of stallion spermatozoa. 14th Int. Cong. Anim. Reprod., Stockholm, 82.
- Kusunoki, H. – Yasui, T. – Kato, S. – Kanda, S.*(1984): Identification of acrosome-reacted goat spermatozoa by a simplified triple-stain technique. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 55. 832–837.
- Kusunoki, H. – Sakaue, M. – Kato, S. – Kanda, S.*(1987): Identification of acrosome-reacted boar spermatozoa by a triple stain technique. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 33. 123–127.
- Kusunoki, H. – Sakaue, M. – Harayama, H. – Kato, S. – Kanda, S.*(1988): Identification of acrosome-reacted goat spermatozoa by a trypan blue-Giemsa method. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 59. 235–240.
- McBride, C.E. – Fayrer-Hosken, R.A. – Shrivastava, P.N. – Brackett, B.G.*(1990): Evaluation of rabbit sperm acrosomal integrity and freezing ability by use of vital stains. *Mol. Reprod. Devel.*, 26. 30–39.
- Nagy, Sz. – Házás, G. – Bali Papp, Á. – Iváncsics, J. – Szász, F. – Szász, F. Jr. – Kovács, A. – Foote, R.H.*(1999): Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology*, 52. 1153–1159.
- Nagy, Sz. – Merész, L. – Várszegi, J. – Szász, F. – Iváncsics, J. – Kovács, A.*(2000): Relationship between sperm membrane integrity and motility. *Theriogenology*, 53. 204.
- Talbot, P. – Chacon, R.S.*(1981): A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm. *J. Exp. Zool.*, 215. 201–208.
- Van Der Schaaf, A.*(1952): Vitalkleuring van stieren-sperma met een onplossing van anilineblauw en eosine. *Tijdschr. Diergeneeskunde*, 77. 815.
- Varner, D.D. – Ward, C.R. – Storey, B.T. – Kenney, R.M.*(1987): Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *Am. J. Vet Res.*, 48. 1383–1389.

Szerző címe: Kútvölgyi, G. – Stefler, J.: Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar
Authors' address: University of Kaposvár, Faculty of Animal Science
 H-7400 Kaposvár, Guba Sándor u 40.
Nagy, Sz. – Kovács, A.: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
 Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
 H-2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.
Czímber, Gy.: Bio-Czinov Kft.
 Bio-Czinov Ltd.
 H-9200 Mosonmagyaróvár
Balogh, J.: Nemzeti Lovarda
 National Riding School
 H-1087 Budapest, Kerepesi út 7.

X0 SZINDRÓMA KANCÁKBAN

IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ ÉS ELŐZETES ESETISMERTETÉS

BOZSAKY ÉVA — CZIMBER GYULA — KOVÁCS ANDRÁS

SUMMARY

Bozsaky, É.Ms. – Czimber, Gy. – Kovács, A.: X0 SYNDROME IN THE MARE. LITERARY BACKGROUND AND A CASE REPORT

Chromosomal abnormalities, especially of the sex chromosomes, have been associated with infertility in horses. Earlier reports pointed out that about half of breeding age mares with primary infertility and gonadal hypoplasia had detectable chromosomal abnormality. To determine the exact chromosomal change in addition to clinical examinations (behavioral observations, physical examination, palpation of the ovary per rectum, ultrasonography of the ovary per rectum, hormone analysis, ovarian biopsy), the cytogenetic analysis (karyotyping) is required. Types of chromosomal aberrations that can be visualized in karyotypes include changes in chromosome number (aneuploidy) and structure.

— The most commonly observed and reported karyotypic abnormality of the mares with primary infertility is 63,X0 (or 63,X) – X-monosomy, in which only a single sex chromosome is present. The condition may occur when the sex chromosome pair fails to separate during meiosis (nondisjunction), producing one gamete without a sex chromosome and another with two sex chromosomes. This karyotype — probably first reported in 1968 in mares — is analogous to Turner's syndrome in humans. Affected horses are often small in size for their age and breed, have small ovaries lacking follicular development and underdeveloped uterus. X0 mares may exhibit anestrus or irregular estrous behavior and occasionally stand to be mated. True X0 mares are considered to be sterile.

— Among mares with detectable X-monosomy and gonadal dysgenesis were estimated that about 15-30% demonstrated a second cell line with structurally normal sex chromosomes, 63,X0/64,XX, probably the result of chromosome loss during mitosis. Mares with this mosaic or chimeric karyotype are not always small in stature and some have been reported to produce a foal.

— The second most commonly observed karyotypic abnormality in the infertile mares is 64,XY sex reversal syndrome for which phenotypic sex does not match chromosomal sex. The syndrome is manifested by both genotypic and phenotypic heterogeneity. Characteristics are similar to 63,X0 gonadal dysgenesis, but the phenotypic spectrum ranges from the feminine mare with a reproductive tract that is within normal limits to the greatly masculinized mare. Pedigree analyses suggest that the most probable mode of inheritance is X-linked recessive transmitted through the female.

Numerous other chromosomal abnormalities have also been reported – 65,XXX (X-trisomy), 64,XX/64,XY and 63,X0/64,XY, trisomy of autosomes No. 23, 26, 27, 28 and 30 and different structural changes of gonosomes or autosomes – however, the incidence of these is quite low.

A 6-years-old Hungarian halfbred mare was clinically examined because of anestrus and infertility despite of treatment for induced oestrus and ovulation. The ultrasonography showed underdeveloped ovaries and uterus. Supposing the genetical cause of this phenotype the cytogenetic investigation was carried out on peripheral lymphocytes cultured *in vitro*. Microscopical evaluation of Giemsa stained slides showed the abnormal chromosome count 63 suggesting the probable 63,X0 syndrome. To specify the exact chromosomal abnormality type the further banding procedures are required.

The above-mentioned literary data emphasize that chromosome analysis is an important technique for the diagnosis of some forms of equine infertility. Cytogenetic screening of young animals would provide for early detection and avoid the expense and disappointment of continuous breeding attempts. Just as importantly, it would aid in the reduction and the possible elimination of this genetic condition from breeding herds. With regard to our preliminary case study, it would be serve as the first step in cytogenetic screening of mares with primary infertility in Hungary. To our knowledge, it is the first cytogenetically examined such case in our country.

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A kancáknál előforduló elsődleges meddőségnek (primer infertilitás) az esetek felében kimutatható kromoszóma-rendellenesség az oka (*Bowling és mtsai*, 1987), amely leggyakrabban az ivari kromoszómákat érinti. Az ivari kromoszómák aberrációja a megfigyelések szerint a kancák kevesebb, mint 3%-ában fordul elő (*Nie és mtsai*, 1993). A meddőséget és/vagy ivarszervi fejlődési rendellenességeket előidéző aberrációk különféle eredetűek lehetnek. Ezért célszerű az ilyen esetekben a szokásos klinikai kivizsgálásokon (viselkedés megfigyelése, ivarszervek fizikális vizsgálata, a petefészkek és a méh tapintása és ultrahang-diagnosztikai vizsgálata per rectum, hormon analízis és citológiai, szövettani mintavétel stb.) túl citogenetikai módszerekkel is vizsgálni a meddőség okát.

— Az elsődleges meddőségek hátterében leggyakrabban az X-kromoszóma monoszómiája áll, amikor a szervezet minden sejtjében az ivari kromoszómapárból csak egy X található, a másik ivari kromoszóma hiányzik. Az ilyen kancák kariotípusa: 63,X0 (vagy 63,X). Erről az aneuploidiaról — amely a humán Turner-szindrómával analóg — lovaknál a nemzetközi szakirodalom már 1968-ban említést tesz (*Payne és mtsai*, 1968), majd később több szerző is további anatómiai, élettani megfigyelésekkel és részletesebb citogenetikai vizsgálatokkal pontosítja e rendellenesség leírását (*Chandley és mtsai*, 1975; *Hughes és Kennedy*, 1975; *Trommershausen-Smith és mtsai*, 1979; *Mäkinen és mtsai*, 1986; *Bowling és mtsai*, 1987).

A fajra jellemző kromoszómaszám megváltozása (aneuploidia) általában rendellenes sejtosztódás következménye. Oogenézis vagy spermatogenezis során az ivarsejtek meiotikus osztódásakor előfordulhat, hogy az ivari kromoszómapár tagjai nem válnak el egymástól (non-diszjunkció). Ilyenkor az egyik ivarsejtbe két ivari kromoszóma kerül, míg a másik gonoszóma nélkül marad. Az ilyen, ivari kromoszóma nélküli ivarsejtnek normális ivarsejttel történő egyesüléséből csak egy ivari kromoszómát tartalmazó zigóta jön létre, amely a további mitotikus osztódások során valamennyi utódsejtnek ezt a „hibás” genetikai információt adja át. Az aneuploidia egy másik fajtájának kialakulásához vezet a két ivari kromoszómával rendelkező ivarsejt egyesülése normális ivarsejttel, melynek következményeként három ivari kromoszómával rendelkező utódsejt jön létre. Kancáknál az X-kromoszóma triszómiája — 65,XXX — ismert (*Chandley és mtsai*, 1975; *Trommershausen-Smith és mtsai*, 1979; *Mäkinen és mtsai*, 1999), de ugyanígy alakul ki a humán Klinefelter-szindróma (47,XXY) is.

A 63,X0 genotípusú kancák általában az átlagosnál alacsonyabb termékek, fejlődésben visszamaradottak és jellemző rájuk a gonadális hypoplázia. Kancának megfelelő külső nemi szervekkel találkozhatunk, de a clitoris kisebb méretű. Az ilyen kancákra általában jellemző az anoestrus vagy a rendszertelen ivarzási tünet. A valódi X0 kancák sterilnek tekinthetők (*McCue*, 2000).

— Sok esetben a 63,X0 kromoszómakészletű sejtek csak mozaikosan fordulnak elő, vagyis a szervezet sejtjei genetikai szempontból nem teljesen egyneműek: a 63,X0-ás sejtek mellett normális diploid 64,XX-es sejtek is jelen vannak. *Hughes és mtsai* (1975a) a 64,XX és 63,X0 sejtek különböző előfordulási

arányáról számolnak be, miközben minden általuk ismertett esetben a 64,XX kariotípusú sejtek voltak többségben.

Az ilyen mozaicizmus a testi sejtek mitózisa során, gonoszóma non-diszjunkció következményeként alakulhat ki. Amíg az ivarsejtek rendellenes osztódásából származó hibásodás az utód valamennyi sejtjébe átadódik, a testi sejtek mutációi (a kromoszómaszám eltérések is) csak sejtvonalsan, a mutált sejt további mitózisaival adódnak tovább.

A 63,X0/64,XX mozaicizmust a gonadális dysgenézist mutató kancák 15–30%-ában találtak (*Zhang és mtsai*, 1992). Nem feltétlenül kisebb termetűek az átlagosnál és nem feltétlenül infertilisek (gyakran utódokkal).

Dunn és mtsai (1981) két hermafrodita lónál (fejletlen penisszel, bilaterális ovotestis-szel) a 64,XX/64,XY ill. a 63,X0/64,XY kromoszóma-szerelvény egyik valószínű kialakulási okaként a blasztociszta-fúziót említik.

— A meddő kancák másik nagyobb csoportját a 64,XY kariotípusú, hím ivari kromoszóma-készlettel rendelkező kancák alkotják (*Chandley és mtsai*, 1975; *Power*, 1986; *Bowling és mtsai*, 1987; *Long*, 1988; *Pailhoux és mtsai*, 1995). Ebben az esetben a fenotípusos ivar nem egyezik a kromoszómális ivarral, „XY sex reversal” szindrómáról vagy tesztikuláris feminizációról beszélünk.

Kent és mtsai (1986) családfaelemzéseik alapján e rendellenesség kétféle lehetséges öröklődési modelljét javasolják:

1. X-kromoszómához kapcsolt recesszív öröklődésment, amikor az X-kromoszóma mutációja anyai ágon öröklődik, tehát egy mutáns X-kromoszómát hordozó kanca XY-os utódainak az 50%-a kanca (mutáns), 50%-a pedig mén („normális”) lesz.

2. Y-kromoszómához kapcsolt öröklődésment: molekuláris biológiai vizsgálatok kimutatták, hogy az Y-kromoszómán található, hím ivari jelleg kialakulásáért felelős Sry gén (sex-determining region in Y-chromosome) deléciója vagy mutáció okozta inaktiválása lehet a genetikai oka e rendellenesség kialakulásának (*Pailhoux és mtsai*, 1995). Az Y-kromoszóma ilyen spontán mutációja nem öröklődhet tovább.

A fenotípus jellemzői hasonlóak, mint az X0 szindróma esetében, azzal a különbséggel, hogy itt — mivel a genetikai háttér is változatos — a megnyilvánulási formák széles skálájával találkozhatunk. Szintén *Kent és mtsai* (1988) „XY sex reversal” szindrómás kancák 38 tagú csoportjának kivizsgálása alapján, 4 csoportba sorolta annak megnyilvánulási formáit:

1. közel normális nőivarú fenotípus, ezek közül néhány termékeny is lehet,
2. gonadális dysgenézis a Müller-cső normális fejlődésével,
3. intersexualitás, gonadális dysgenézissel, a Müller-cső rendellenes fejlődése, megnagyobbodott clitoris,
4. virilizációs intersexualitás jellemzően magas tesztoszteron-szinttel.

E szindróma fordított változatát — 64,XX genotípusú, de mén — *Constant és mtsai* (1994) írták le. A nőivarra jellemző kromoszómakészlettel rendelkező ménnél rejtettheréjűséget (inguinális elhelyezkedés), a járulékos nemi szervek hypopláziáját, valamint enyhén kifejlődött tejmirigyeket figyeltek meg. Öröklődés menete eddig ismeretlen, más fajoknál általában autoszomális recesszív.

A felsorolt három leggyakoribb rendellenességen kívül további kromoszóma-aberrációkat is leírtak lovaknál, azok előfordulási aránya azonban csekély. Az említett ivari kromoszómák numerikus aberrációin kívül a testi kromoszómák

(autoszómák) aneuploidiáit is megfigyelték, mint pl. a 28-as (Power, 1987; Power és mtsai, 1992), a 23-as (Klunder és mtsai, 1989), a 26-os és 30-as (Crowe és Swerczak, 1985; Bowling és Millon, 1990), valamint a 27-es (Buen és mtsai, 1997) kromoszómák triszómiája. Lovaknál hasonlóképpen — amint az a humángenetikában már jól ismert — összefüggést találtak az autoszómák nondiszjunkciója következtében kialakuló triszómiák és a szülők kora között.

A meddőségek genetikai hátterében állhatnak továbbá az ivari vagy testi kromoszómák bizonyos struktúrmutációi is (Bowling és mtsai, 1987; Power, 1987; Bowling és Millon, 1990).

A fenti irodalmi összefoglaló jól szemlélteti a lovak elsődleges meddőségért felelős, lehetséges genetikai eltérések sokrétűségét, változatosságát, és utal a citogenetikai vizsgálatok fontosságára az indokolt esetekben:

— elsősorban fontos a kromoszómaszám megállapítása,

— amennyiben számbeli eltérést tapasztalunk, a hiányzó (monoszómia) vagy a fajra jellemző szám feletti kromoszóma (triszmia) pontos identifikálása céljából a következő lépés a kariotípus összeállítása (a kromoszómák besorolása a nemzetközileg elfogadott nomenklatúra szerint, Bowling és mtsai, 1997) és egyéb sávozási (a kromoszómák szerkezetén és nukleotid szekvenciáján alapuló speciális festési módszerek) eljárások. A rendelkezésre álló technikák közül (G-, C-, R-, NOR-sávozás) az X-kromoszóma azonosítása szempontjából a C-sávozás a legcélszerűbb, mivel ez a sávozási eljárás egyedül az X-kromoszómán sötét sávot mutat a centromérán kívüli a centroméra alatti régióban is.

— kiegészítésként a fajra jellemző kromoszómaszám megváltozásának igazolására az áramlásos citométerrel mérhető DNS-tartalomtól meghatározható az ún. DNS-index (Kenney és mtsai, 1991),

— amennyiben nincs számbeli eltérés, különböző molekuláris biológiai és molekuláris citogenetikai eljárások segítségével tudjuk meghatározni az adott kromoszóma-rendellenességet.

SAJÁT ESETISMERTETÉS

Kezdő lótartó kért fel bennünket kancája termékenyítésére. A kanca (Lady, 6 éves, ~150 cm-es marmagasságú magyar félvér) sárlását nem tapasztalta, ill. elmondása szerint csak szakkönyvekből ismerte a jellegzetes tüneteket. A tenyészszezonban rutinszerűen alkalmazott első prosztoglandin $F_{2\alpha}$ (375 μ g cloprostenol-Estrumate inj.) kezelést követően sem észlelték sárlást. A 2 hét után megismételt beavatkozást követő 3 nap múlva klinikai vizsgálatot végeztünk. Az állat nem mutatott ivarzási tüneteket. A rectálisan végzett kézi, illetve ultrahang-diagnosztikai (Echoscan, 5,5 MHz-es lineáris vizsgálófej) vizsgálat során kezdetben egyáltalán nem, később, nyugodtabb körülmények között is csak alig érezhető és észlelhető petefészkeket és méhszarvakat sikerült találni. Hüvelytükörrel egy nem sárló kancára jellemző, a hüvelybe beemelkedő, kóros eltéréstől mentes külső méhszáj volt látható. A clitoris szemrevételezése során feltűnt annak a szokásosnál kisebb mérete. A gonadális dysgenezisre (hypopláziára) jellemző kép miatt citogenetikai vizsgálatot végeztünk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A terület alkoholos fertőtlenítése után a v. jugularisból vérmintát vettünk 2000 NE/ml koncentrációra desztillált vízzel hígított heparinnal (heparin-Na, Heparin inj.) átöblített műanyag vércsőbe. A limfocita sejttenyészetek elkészítéséhez MEM-E (Eagle's Minimum Essential Medium) tápoldatot használtunk, 20% savóval, mitogénnel (pokeweed mitogen, 5 µg/ml), L-glutaminnal (294,1 µg/ml), streptomycinnel (100 µg/ml) és kanamycinnel (80 µg/ml) dúsítva. A tenyésztőedényekben 0,5 ml teljes vér és 4,5 ml tápoldat keverékét CO₂ termosztátban (5% CO₂ + 95% levegő) 37 °C-on 72 órán át kultiváltuk, és a tenyésztés befejezése előtt 2,5 órával kolhicint adtunk hozzájuk (0,75 µg/ml).

A kariológiai preparátumokat a hagyományos módszerrel készítettük. A sejttenyészetek centrifugálása és a felülúszó eltávolítása után 0,075M KCl oldattal 12 perces hipotóniás kezelést, majd metanol és jéget 3:1 arányú keverékével fixálást végeztünk (a fixálást szükség szerint 2–3-szor ismételtük). Végül a megfelelő arányban felhígított szuszpenziót zsírtalanított tárgylemezre csepegtettük, és szobahőn száradni hagytuk. A kromoszómaszám meghatározása céljából a preparátumok egy részét 2%-os Giemsa oldatban 8 percig festettük, majd fénymikroszkóppal értékeltük.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A klinikai és előzetes citogenetikai vizsgálatok eredménye arra enged következtetni, hogy az általunk vizsgált meddő kancánál az infertilitás elsődleges. A tapasztalt anatómiai és élettani eltérések hasonlóak a más szerzők által korábban közölt, erre a szindrómára jellemző tünetekhez. Az elsődlegesen meddő kanca citogenetikai vizsgálata során valamennyi limfocita osztódásban 63 kromoszómát számoltunk (1. ábra), így a 63,X0 szindróma első magyarországi esetét diagnosztizáltuk. A hiányzó kromoszóma azonosítását C-sávozási eljárás segítségével tervezzük a közeljövőben.

1. ábra: Meddő kanca citogenetikai vizsgálata

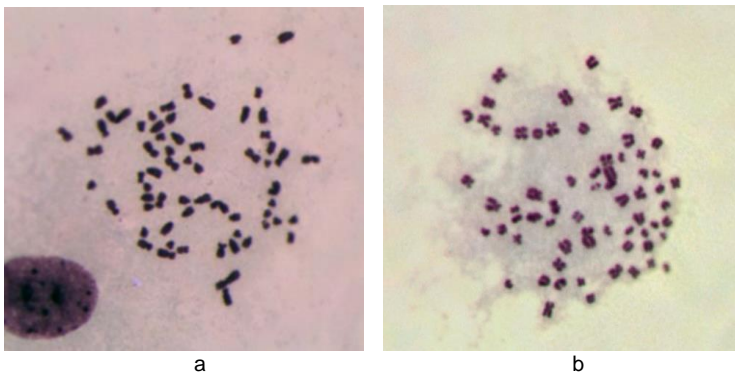


Fig. 1.: Cytogenetic creeming of mares with primary infertility

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetet mondanak *Dr. Ivan Chalupának és Livia Šebovának* a Szlovák Tudományos Akadémia Rákkutató Intézete (Pozsony) tudományos munkatársának ill. asszisztensének a munkájuk során nyújtott szakmai és technikai segítségért.

IRODALOM

- Bowling, A.T. – Breen, M. – Chowdhary, B.P. – Hirota, K. – Lear, T. – Millon, L.V. – Ponce de Leon, F.A. – Raudsepp, T. – Stranzinger, G.(1997): International systems for cytogenetic nomenclature of the domestic horse. Report of the Third International Committee for the Standardization of the domestic horse karyotype, Davis, CA, USA, 1996. Chromosome Res., 7. 433–443.
- Bowling, A.T. – Millon, L.V.(1990): Two autosomal trisomies in the horse: 64,XX,-26,+t(26q26q) and 64,XX,+30. Genome, 33. 679–682.
- Bowling, A.T. – Millon, L. – Hughes, J.P.(1987): An update of chromosomal abnormalities in mares. J. Reprod. Fertil. Suppl., 35. 149–155.
- Buoen, L.C. – Zhang, T.Q. – Weber, A.F. – Turner, T. – Bellamy, J. – Ruth, G.R.(1997): Arthrogyposis in the goat and its possible relation to autosomal trisomy. Equine Vet. J., 29. 60–62.
- Chandley, A.C. – Fletcher, J. – Rosedale, P.D. – Peace, C.K. – Ricketts, S.W. – McEneaney, R.J. – Thorne, J.P. – Short, R.V. – Allen, W.R.(1975): Chromosome abnormalities as a cause of infertility in mares. J. Reprod. Fertil. Suppl., 23. 377–383.
- Constant, S.B. – Larsen, R.E. – Asbury, A.C. – Buoen, L.C. – Mayo, M.(1994): XX male syndrome in a cryptorchid stallion. J. Am. Vet. Med. Assoc., 205. 83–85.
- Crowe, M.W. – Swerczak, T.W.(1985): Equine congenital defects. Am. J. Vet. Res., 46. 353–358.
- Dunn, H.O. – Smiley, D. – Duncan, J.R. – McEntee, K.(1981): Two equine true hermaphrodites with 64,XX/64,XY and 63,X0/64,XY chimerism. Cornell Vet., 71. 123–135.
- Hughes, J.P. – Benirschke, K. – Kennedy, P.C. – Trommershausen-Smith, A.(1975a): Gonadal dysgenesis in the mare. J. Reprod. Fertil. Suppl., 23. 385–390.
- Hughes, J.P. – Kennedy, P.C.(1975b): X0-gonadal dysgenesis in the mare (report of two cases). Equine Vet. J., 7. 109–112.
- Kenney, R.M. – Kent, M.G. – Garcia, M.C. – Hurtgen, J.P.(1991): The use of DNA index and karyotype analyses as adjuncts to the estimation of fertility in stallions. J. Reprod. Fertil. Suppl., 44. 69–75.
- Kent, M.G. – Shoffner, R.N. – Buoen, L. – Weber, A.F.(1986): XY sex-reversal syndrome in the domestic horse. Cytogenet. Cell Genet., 42. 8–18.
- Kent, M.G. – Shoffner, R.N. – Hunter, A. – Elliston, K.O. – Schroder, W. – Tolley, E. – Wachtel, S.S.(1988): XY sex reversal syndrome in the mare: clinical and behavioral studies, H-Y phenotype. Hum. Genet., 79. 321–328.
- Klunder, L.R. – McFeely, R.A. – Beech, J. – McClune, W.(1989): Autosomal trisomy in a standardbred colt. Equine Vet. J., 21. 69–70.
- Long, S.E.(1988): Chromosome anomalies and infertility in the mare. Equine Vet. J., 20. 89–93.
- Mäkinen, A. – Katila, T. – Kuokkanen, M.T.(1986): X0 syndrome in the mare. Nord. Vet. Med., 38. 16–21.
- Mäkinen, A. – Hasegawa, T. – Mäkilä, M. – Katila, T.(1999): Infertility in two mares with XY and XXX sex chromosomes. Equine Vet. J., 31. 346–349.
- McCue, P.(2000): Diagnosis of Ovarian Abnormalities. In Recent Advances in Equine Reproduction edited by B.A.Ball, published by Ithaca, New York, USA
- Nie, G.J. – Momont, H.W. – Buoen, L.(1993): A survey of sex chromosome abnormalities in 204 mares selected for breeding. J. Eq. Vet. Sci., 13. 456–459.
- Payne, H.W. – Ellsworth, K. – DeGroot, A.(1968): Aneuploidy in an infertile mare. J. Am. Vet. Med. Assoc., 158. 1293–1299.
- Pailhoux, E. – Cribiu, E.P. – Parma, P. – Cotinot, C.(1995): Molecular analysis of an mare with gonadal dysgenesis. Hereditas, 122. 109–112.
- Power, M.M.(1986): XY sex reversal in a mare. Equine Vet. J., 18. 233–236.
- Power, M.M.(1987): Equine half sibs with an unbalanced X; 15 translocation or trisomy 28. Cytogenet. Cell Genet., 45. 163–168.
- Power, M.M. – Gustavsson, I. – Switonski, M. – Plöen, L.(1992): Synaptonemal complex analysis of an autosomal trisomy in the horse. Cytogenet. Cell Genet., 61. 202–207.

- Trommershausen-Smith, A. – Hughes, J.P. – Neely, D.P.*(1979): Cytogenetic and clinical findings in mares with gonadal dysgenesis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 27. 271–276.
- Zhang, T.Q. – Buoen, L.C. – Weber, A.F.*(1992): Variety of cytogenetic anomalies diagnosed in 240 infertile equine. In: *Proceedings of the 12th Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem.*, 1939–1941.

Szerző címe: *Bozsaky, É.:* Pharmagene-Farm Kft.

Authors' address: Pharmagene-Farm Ltd.
H-9200 Mosonmagyaróvár

Czímber, Gy.E.: Bio-Czinov Kft.
Bio-Czinov Ltd.

H-9200 Mosonmagyaróvár

Kovács, A.: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés u. 1.

OUT-OF-SEASON INDUCED OESTRUS IN EWE LAMBS

SZABADOS, TAMÁS — GERGÁTZ, ELEMÉR —
VITINGER, EMŐKE — GYÖKÉR, ERZSÉBET — CZIMBER, GYULA

ÖSSZEFOGLALÁS

Szabados, T. – Gergátz, E. – Vítinger, E.Ms. – Gyökér, E.Ms. – Czímber, Gy.: IVARZÁS INDUKÁLÁS JERKÉKNÉL ASZEZONBAN

A szerzők kísérletük beállítása során arra keresték a választ, hogy a Franciaországból importált lacaune fajta jerekéi milyen ivarzás indukálási módszert alkalmazva, milyen eredményességgel vemhesíthetők májusban, a szezonban. A kérdésfelvetést indokolta, hogy e módszer alkalmazásával jerekéiket a szokásos vemhesítési periódus előtt korábban vehették tenyésztésbe, megcélozva ezzel a karácsonyi keresleti piacot a vágóbárányok értékesítésekor. A kettős hasznú fajta laktációs idejét is megpróbálták megnyújtani, s ezáltal az értékesített tej mennyiségét növelni.

INTRODUCTION

Oestrus is varied and sometimes it contains extremity in the various species of sheep. This variety is resulted from the facts that manifestation of oestrus is influenced by lots of factors. The up-to-date, intensive rearing demands the regulation of reproductive fitness in the productive livestock. The most frequent biotechnical interventions for increasing the progeny are induced oestrus and oestrus synchronization. Materials used for induced oestrus and synchronization in sheep breeding are progesterone and the so-called progestagen compounds i.e. prostaglandines and their analogues; gonadotropines effected the function of the ovary FSH (Follicle Stimulating Hormone), LH (Luteinizing Hormone), PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin), HCG (Human Chorion Gonadotropin) and Gn-RH (Gonadotropin Releasing Hormone) which regulates the formation of gonadotropin hormones.

Wallace (1955) injected progesterone for some days. But other authors emphasized the difficulties of the repeated progesterone injections in the respect of the practical adaption (Howell and Woolfitt, 1964). These difficulties were solved by administering subcutaneous implants (Ainsworth and Wolynetz, 1982) or intravaginal implants (Dsiuk and Bellows, 1983; Godfrey et al., 1997). Das et al. (2000) examined the effect of two different doses of progesterone on oestrus. It was found that oestrus was distinct at the higher progesterone dose as it developed later at lower doses. On the contrary, Simonetti et al. (2000) did not find difference in the number, beginning time and rate of pregnancy when they treated ewes with different doses (40, 50, 60 mg) of medroxyprogesterone-acetate. Langford (1982) pointed out the influence of PMSG on the required fertility results of progesterone-treated sheep in out-of-season period. A number of authors examined the different ways and effectiveness of PMSG treatment in progesterone-treated ewes (Becze and Látits, 1975; Rommel et al., 1982; Langford et al., 1983; Donrov et al., 1998). Prostaglandins and prostaglandin ana-

lognes cause a luteolytic effect on the corpus luteum. After administering prostaglandin or prostaglandin analogue to ewes, the functioning corpus luteum ceases up its activity and the next oestrus follows in 2 or 3 days (*Actritopoulou et al.*, 1982). *McLeod et al.* (1982) treated seasonally anoestrous ewes with continuous infusion of low doses of Gn-RH to induce oestrus. It was pointed out that the continuous Gn-RH infusion caused the increasing of LH content which induced out-of season oestrus in ewes.

MATERIALS AND METHODS

Examinations have been done at Pharmagene Farm Ltd, Biotechnical Research Station in Mosonmagyaróvár from the middle of May, 2001 with 114 lacaune and lacaune cross-breed ewe lambs aged 13 to 15 months. On 14th May, 2001 ewe lambs were treated with 0,3g progestagen by EAZI Breed CIDR (Controlled Intravaginal Drug Release) "G" intravaginal implant. Implants were removed from the experimental animals after 13 to 16 days. For further treatments three groups (signed A, B and C) were formed from the experimental ewe lambs. There were 47-47 animals in-group A and group B and 20 animals in group C. The experimental ewe lambs got PMSG treatment at the time of the implant-removing. Animals were treated with 500 IU PMSG (Werfaser, 2 cm³ intramuscularly) in-group A, 750 IU PMSG (Werfaser, 3 cm³ intramuscularly) in-group B and 500 IU PMSG (Gonadophyl, 2,5 cm³ subcutaneously) in group C. In all groups 48 hours after PMSG treatment oestrus was checked by vasectomized teaser rams. Apart from the symptoms of oestrus all the ewe lambs were inseminated with diluted, 2 to 4 °C cooled semen 48 or 53 hours after implant removing. After the artificial insemination ewe lambs were tupped by vasectomized teaser rams. The judgement of pregnancy occurred 56 to 58 days after the insemination by ultrasonic examination. When all the lambing had happened results were evaluated statistically by G-test.

RESULTS

Authors have pointed out that the best results ($P=0,005$) were determined in group B. All the examined data can be found in *Table 1*.

Authors surveyed the quantity of profit making comparison between selling lambs in December or selling them in the traditional period in March (*Fig. 1*).

In group B the profit reaches the sum of 1,500 to 4,500 Ft a lamb.

As the experimental animals were double purpose sheep, the authors examined the effect of fertilization in May to the lactation. It was pointed out that the lactation period was extended by the fertilization in May so the quantity of sold milk per ewe could be raised considerably (*Table 2*).

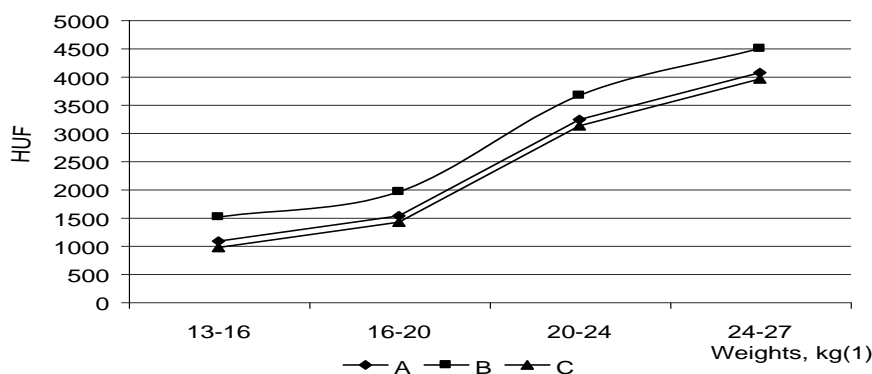
Table 1.

Oestrus, pregnancy, lambing, litter size and progeny rate in the treated groups

	Group "A"(1)		Group "B"(1)		Group "C"(1)	
	n	%	n	%	n	%
Number of animals(2)	47	100	47	100	20	100
Observed oestrus(3)	35	74.5	43	91.5	15	75
Pregnancy silent oestrus(4)	4	8.5	2	4.3	2	10.0
Observed oestrus total(5)	n=93; 81.6%					
Pregnant ewes(6)	18	38.3	23	48.9	9	45.0
Total pregnant ewes(7)	n=50; 43.9%					
Lambd ewes(8)	17	36.2	23	48.9	8	40.0
Total lambed ewes(9)	n=48; 42.1%					
Number of lambs(10)	25		36		11	
Total of lambs(11)	n=72					
Average litter size(12)	1.47		1.57		1.38	
Progeny rate(13)	53.2		76.7		55.0	

1. táblázat: Ösztusz, vemhesség, ellés, alomszám és szaporulati százalék a kezelt csoportban csoport(1), állatlétszám(2), regisztrált ösztusz(3), csendes ivarzású(4), összes regisztrált ivarzás(5), vemhes anya(6), összes vemhes anyag(7), ellett anya(8), összes ellett anya(9), bárányok száma(10), összes bárány(11), átlagos alomszám(12), szaporulati %(13)

Fig. 1.: Sum of the income after subtracted the cost of the treatment in the three treated groups in case of selling lambs in December



1. ábra: A bevétel összege a költségek levonása és a bárányok decemberi eladása után a három kísérleti csoportban súly, kg(1)

Table 2.

Comparison of the lactation of the experimental and the control groups

	Experimental group(1)	Control group(2)	Difference(3)
Number of animals(4)	37	39	—
Lactation days(5)	224	137	87
Milk quantity(6)	203.8	124.2	79.6
Daily milk quantity(7)	0.9	0.9	0

2. táblázat: A kísérleti és kontroll csoport laktációjának összehasonlítása kísérleti csoport(1), kontroll csoport(2), különbség(3), állatlétszám(4), laktációs napok száma(5), tejmenység(6), napi tejmenység(7)

DISCUSSION

The authors could prove the sufficient result of the artificial insemination in May in lacaune ewe lambs. Among the three examined methods the usage of Eazi Breed CDR "G" for 12 days at least has been found the most suitable. At the time of the implant removing 750 IU PMSG were administered. 48–53 hours later cervico-uterine insemination was carried out then ewe lambs were topped by vasectomized teaser rams. This treatment could guarantee the ovulation at the 96 per cent of the ewe lambs and approximately 50 per cent of them lambed. Because of the higher PMSG dose the average litter size increased from 1.45 to 1.57. The progeny rate was 76.7 per cent in-group B, exceeded with 20 per cent the average of the other two groups. Purchase prices are 250–260 Ft/kg higher in December than in March. After subtracted the cost of the hormone treatment the sum of the extraprofit was 1,500–4,500 Ft for each lamb. As the lactation period was longer, milk marketing could bring 11,542 Ft extra profit for each ewe. This treatment is offered for farmers who have adequate breeding and feeding conditions and can try successful artificial insemination in May in lacaune and lacaune cross-breed ewe lambs.

REFERENCES

- Actritopoulou-Fourcroy, S. – Pappas, V. – Peclaris, G. – Zervas, N.*(1982): Synchronization of oestrus in ewes with Provera sponges/PMSG, prostaglandin F2 alpha or the prostaglandin analogue, ICI 80996, and fertility following natural mating or artificial insemination. *Reprod. Nutr. Dev.*, 22. 2. 345–354.
- Ainsworth, L. – Wolinetz, N.*(1982): Synchronization of oestrus and reproductive performance of ewes treated with synthetic progestagens administered by subcutaneous ear implant or by intravaginal sponge pessary. *J. Anim. Sci.*, 54. 6. 1120–1127.
- Becze, J. – Látits, Gy.*(1975): Az Állattenyésztési Kutatóintézet Közleményei, Herceghalom, 2. 1. 217.
- Das, G.K. – Naqvi, S.M.K. – Gulyaani, R. – Pareek, S.R. – Mittal, J.P.*(2000): Effect of two doses of progesterone on estrus response and fertility in acyding crossbred brahat merino ewes in a semiarid tropical environment. *Small Rum. Res.*, 37. 1–2. 159–163.
- Donrov, T. – Batsaihan, D. – Ley, W.B.*(1998): Gonadotropin extraction from pregnant mares' serum and effect of PMSG preparation on the fertility of mongolian native ewes. *Small Rum. Res.*, 28. 61–66.
- Dsiuk, P.J. – Bellows, R.A.*(1983): Management of reproduction of beef cattle, sheep and pigs. *J. Anim. Sci.*, 57. 355–379.
- Godfrey, R.W. – Gray, M.L. – Collins, J.R.*(1997): A comparison of two methods of estrus synchronisation of hair sheep in the tropics. *Anim. Repr. Sci.*, 47. 99–106.
- Howell, W.E. – Woolfitt, W.C.*(1964): Hormonal control of oestrus and its effect on fertility in cycling ewes. *Can. J. Anim. Sci.*, 44. 195–199.
- Langford, G.A.*(1982): Influence of PMSG and time of artificial insemination on fertility of progesterone-treated sheep in confinement. *J. Anim. Sci.*, 54. 6. 1205–1211.
- Langford, G.A. – Marcus, G.J. – Batra, T.R.*(1983): Seasonal effects of PMSG and number of inseminations on fertility of progesterone-treated sheep. *J. Anim. Sci.*, 57. 2. 307–312.
- McLeod, B.J. – Haresign, W. – Lamming, G.E.*(1982): Induction of ovulation in seasonally anoestrous ewes by continuous infusion of low doses of Gn-RH. *J. Repr. Fert.*, 65. 1. 223–230.
- Rommel, W. – Rummer, H.J. – Brier, H. – Leistner, E.*(1982): Versuche über die Wirksamkeit eines Progesteron-PMSG Behandlungsregimes zur Brunstinduktion beim Schaf. *Arch. Exp. Vetmed.*, 36. 141–149.

Simonetti, L. – Blanco, M.R. – Gardón, J.C.(2000): Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxyprogesterone-acetate. *Small Rum.t Res.*, 38. 3. 243–247.

Wallace, F.C.(1955): Superovulatory responses of sheep. *J. Agric. Sci.*, 34. 1–15.

Szerző címe: Szabados, T. – Gyökér, E.: Pharmagene-Farm Kft.

Authors' address: Pharmagene-Farm Ltd.

H-9200, Mosonmagyaróvár, Mosonszentjánosi u. 4.

Gergátz, E. – Vittinger, E.: Nyugat-Magyarországi Egyetem,

Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar

University of West Hungary, Faculty of Agricultural and Food Sciences

Czímber, Gy.: Bio-Chinov Kft.

Bio-Chinov Ltd.

H-9200 Mosonmagyaróvár

ÚJ IRÁNYOK A HÁZINYÚL SZAPORÍTÁSÁBAN

NEMZETKÖZI KUTATÁSI EGYÜTTMŰKÖDÉS (COST 848) A KÁTKI NYÚLTENYÉSZTÉSI OSZTÁLYÁNAK RÉSZVÉTELÉVEL

VIRÁG GYÖRGYI — EIBEN CSILLA

SUMMARY

Virág, Gy.Ms. — Eiben, Cs.Ms.: NEW METHODS IN THE REPRODUCTION OF MEAT RABBIT. INTERNATIONAL RESEARCH COOPERATION AND MAIN RESULTS ACHIEVED BY THE DEPT. OF RABBIT BREEDING AND GENETICS IN KÁTKI

New breeding methods arised an emergence of new questions to be solved. Considering the complexity of these processes the need for international cooperation was explained. In the frame of IRRG more European research groups decided to work together based on protocol guide constructed by joint and public discussion. This cooperation is now supported in the frame of the EU COST (Action 848 WG1).

Institute for Small Animal Research has joined to this work ever since. Their participation brought results on the topic of doe-bio-stimulation and buck management, as well.

A vállalkozói telepek nagy létszámú állományainak szaporítása új eljárásokat követel.

A nyúltenyésztés gyakorlata napjainkra jelentősen átalakult. A mesterséges termékenyítés elterjedését követő legnagyobb változást a házinyúl szaporításában a ciklikus termelésre való áttérés hozta. A munkaszervezésben (adminisztráció csökkenése, munkafolyamatok elkülönülése) és az értékesítés ütemességében így elérhető előnyök akkor a legjelentősebbek, ha a 42. napos ritmusú szaporítást alkalmazzák. Ebben az esetben a szoptató anyanyulakat a fialás utáni 10. napon termékenyítik újra ugyanaz az anyacsoport hat hét múlva kerül ismét sorra. A folyamatos termelés fenntartása érdekében az anyákat 1, 2, 3 vagy 6 turnusban szaporítják, ami 6, 3, 2 vagy 1 hetente végzett termékenyítést jelent. Ez a rendszer könnyen átlátható és nagyon rugalmasan alakítható a mindenkori igényeknek megfelelően.

A módszer elterjedése kapcsán számos új, megoldásra váró kérdés merült fel. A szoptató anyák ivari fogékonysága és termékenysége ugyanis kevésbé jó, mint a szűz tenyésznövendékeké, illetve a nem szoptató anyáké. Emiatt általában nagyobb arányuk marad üresen a termékenyítés után. Ha az üresen maradt anyák saját turnusukban maradnak, az a legjobb esetben is a két fialás közötti időszak hosszának a megduplázódását eredményezi. Ez felesleges kiadásokkal jár (a sikertelen termékenyítéshez felhasznált anyagok és munkaerő, az anyák eredmény nélküli etetése legalább 30 napon át, amennyiben a szoptatás alatti időszakot nem számítjuk ide).

Lehetséges azonban az anyák áthelyezése egy másik turnusba, amelyet 4 héttel, azaz 28 nappal a sikertelen termékenyítés után inszeminálnak. Ezzel a két fialás közötti időszak hossza csökkenthető, azonban így az egyes csoport-

tokban az alkalmanként inszeminált anyák száma igen változó lesz. Ez nemcsak a végtermék kibocsátás ingadozását idézi elő, de problémát jelent a termékenyítéshez használt ondó előállítás szempontjából is, amennyiben erre a célra saját bakokat tartanak. A baknyulak ugyanis a ciklizált szaporítási rendszerben legjobb esetben is csak hetente vannak ugratva, sokszor ennél is ritkábban. Így kapacitásukat csak mintegy fele részben, vagy annál is kisebb mértékben hasznosítják. Ezért a bakok létszámát igyekeznek a lehetséges minimumra szorítani, ami esetenként még is így is túl magas, máskor viszont elégtelen lesz.

Jól látható, hogy az új szisztéma alkalmazása során két jelentős, megoldásra váró probléma merült fel, éspedig: A szoptató anyáknál az ivarzők arányának növelését és az ivarzásnak a termékenyítés napjára történő időzítését szolgáló eljárások kidolgozása, elméleti háttérük tisztázása és gyakorlati alkalmazhatóságuk meghatározása a jó termékenyítőképességű, genetikailag magas értékű és egészségügyi szempontból biztonságosan felhasználható ondóval való ellátottság biztosítása a legkisebb ráfordítással.

Nemzetközi együttműködés szükségessége az összetett feladatok megoldásához: Mindkét felvetett kérdés esetében igen sok egyidejűleg ható tényező befolyásolhatja az eredményt, emiatt a gyakorlati paraméterek (fialási arány, születés kori alomlétszám) alapján történő értékeléshez nagyszámú megfigyelés elvégzésére volna szükség. Ennek megvalósítása egyes kísérletek során, kiemelt elrendezésben gyakorlatilag lehetetlen. A megoldás lehetőségét a nemzetközi együttműködés kínálja, ami kiterjed a módszertani előírások közös megfogalmazására, érzékenyebb módszerek kidolgozására és a kísérletek több ismétlésben történő elvégzésére (több helyen, több időpontban, azonos protokoll alapján).

A nyúl szaporítással foglalkozó kutatók tehát elhatározták, hogy elszigetelt kutatások helyett a továbbiakban közösen dolgoznak a felmerült kérdések megoldásán. 1996-ban nemzetközi munkacsoportba tömörültek (Boiti, 1998), hogy kidolgozzanak egy javaslatot az anyanyulakon végzett kísérleti módszerekre vonatkozóan, és a referencia módszer figyelembe vételével végezzenek ezután már összehasonlítható, vagy akár összevontan elemezhető kísérleteket. Az együttműködés első eredményeit értékelve az EC COST előirányzata 2000. évtől anyagi forrásokkal támogatja a további találkozók (COST Action 848 WG1). A KÁTKI Nyúltenyésztési Osztályának kutatói az IRRG megalakulásától kezdve részt vesznek ebben a munkában. A COST akció munkájához további hazai kutatócsoportok — Kaposvári Egyetem ÁTK kar, Debreceni Egyetem, SZIE MGT és ÁTK kar, ELTE TTK kar, MBK Állatbiológiai Intézet — is csatlakoztak.

Bio-stimulálási módszerek a szoptató anyanyulak termékenységének javítására: Az ivarzás hormonális serkentése és időzítése eredményes a fialási arány javításában, a PMSG ismételt alkalmazása azonban jelentősen növeli az embrió elhalást, és ezáltal csökkenti a születés kori alomlétszámot. A kezelések költségéhez viszonyítva a kapott javulás csekély, emellett figyelembe kell venni a hormonkezelések csökkentésére irányuló törekvéseket Új módszerként számításba jöttek olyan természetes eljárások, mint a szoptatás módjának, az

anyák-bakok elkülönült elhelyezésének, a takarmányozási szintnek a megváltoztatása.

A szoptatás módjának megváltoztatása: Jól ismert, hogy a szoptatás hátrányosan befolyásolja az ivarzást. Az anya és az alom átmeneti elkülönítése a jelenlegi tartástechnológiában a fialóláda bejáratának elzárásával könnyen megvalósítható. A fialóládanak a naponkénti kinyitását és bezárását a szoptatás különböző időszakában rutinszerűen alkalmazzák a termelő telepeken a szoptatás ellenőrzésére. Ebből adódott az elképzelés, hogy az inszeminálás körüli időszakban vizsgáljuk a fialóláda nyitás-zárás megváltoztatásának hatását az ivarzásra és a termékenyülésre.

Saját kísérleteinkben kétféle kezelést értékeltük:

— Egyszeri szoptatás megakadályozása az anya és az alom ilyen módon történő átmeneti (48 órás) elkülönítésével;

— A fialóláda nyitás-zárásának megváltoztatása a fialás utáni 7. napon.

A 48 órás átmeneti elkülönítés a KÁTKI-ban végzett kísérletek során a fialási arányt átlagosan 20%-kal növelte a folyamatosan nyitott fialódánál szoptató anyákéhoz képest (*Virág és mtsai*, 1999). A hatás különösen kiemelkedő volt az egyszer fialt, fiatal anyák esetében (40%) és ezzel azonos eredményt találtak más vizsgálatokban is (*Theau-Clément*, 2000). Az élve született alomlétszámot a legtöbb esetben a kezelés nem befolyásolta. Kivétel ez alól *Szendrő és mtsai* (1999) kísérlete, amikor közvetlenül a szoptatás után termékenyítették az anyákat és 0,9-del több volt az élve születés, mint ha két órával a fialóláda nyitása (vagyis szoptatás) előtt vagy után tették ugyanezt. A fialási utáni második napon 8-ra történő alomkiegyenlítést követően a szoptatás kimaradása miatt a 10. és 21. napos korban mért alomsúly lényegesen kisebb volt (*Virág és mtsai*, 1999). A szoptatás kimaradásának nem volt hosszú távú hatása az anyaállomány teljesítményére, vagyis sem nem javította, sem nem rontotta az anyák termékenységet, amikor átmenetileg nem szoptató állapotban lévő (előző termékenyítésből üresen maradt) anyákat termékenyítettek (*Virág*, 2003, nyomtatásban).

A közösen tervezett kísérletek sorában, *Szendrő és mtsai* (1999) is 48 órás elkülönítést alkalmaztak, de egyébként állandóan ellenőrzött (tehát naponta nyitott és szoptatás után zárt) fialóláda mellett. Ebben az esetben a termékenyülés javulása nem következett be, viszont az alomgyarapodás csökkenése hasonló mértékű volt. Tehát a kezelés csak állandóan nyitott fialóláda mellett volt képes a termékenységet befolyásolni.

További kísérletekben, több kutatócsoport vizsgálta a 24, 36, és 40 órás elkülönítés hatását is. Egyértelműen jelentős és kísérleteken keresztül ismétlődő hatást csak azok az időtartamok eredményeztek, amelyek esetében egy szoptatás elmaradt. Az eredményeket, a csoport munkáját összehangoló *Theau-Clément* (2000) összegezte.

Eiben és mtsai (2002) a szoptatás módjának a termékenyítés (11. nap *post partum*) előtt két nappal végzett megváltoztatásának hatását vizsgálták. Az egy termékenyítésre jutó születési és 21. napos fiókák száma a mindvégig szabadon szoptató anyákhoz viszonyítva (3,21 és 2,77) a 0–7. napon szabadon, utána pedig naponta egyszer szoptató nyulaknál volt a legnagyobb (4,50 és 4,20), de a 0–7. napig egyszer, utána pedig szabadon szoptató csoportban (3,77 és

3,38) és a mindvégig napi egyszer szoptató csoportban (3,24 és 3,02) is kedvezőbb eredményt kaptak.

Látás és szagigerek hatásának értékelése: Kistermelők között szokásos és eredményesnek tartott eljárás volt a nem ivarzó anyának néhány napra a bak ketrecében való elhelyezése. Erre alapulva végeztek kísérletet *Eiben és mtsai* (2001), akik a bakokat az anyák között található ketrecekben tartották az inszeminálást megelőző negyedik naptól. Azt vizsgálták, hogy az anyának a baktól való távolsága befolyásolja-e az ivarzást és ezen keresztül a termelési mutatókat. A legmagasabb (65%) fialási arányt a baktól számított 6. ketrecben lévő anyáknál találták, de a különbség a közelebb vagy távolabb elhelyezett anyák között nem volt jelentős. A születéskori alomlétszám viszont a közvetlenül a bak melletti illetve a 4. ketrecben elhelyezett anyáknál volt a legnagyobb (8,7 kisnyúl/fialás), ám ezek a különbségek nem voltak szignifikánsak. Ilyen jellegű vizsgálatot tudományos igénygel korábban még nem végeztek, pedig az nagyon valószínű, hogy a bakkal való közvetlen kontaktus (látás, szag és fizikai ingerek) a nyúl szaporaságában fontos szerepet játszanak.

A nőivarú növendékek felnevelés alatti visszafogott takarmányozásának hatása: A gyors növekedésű nyúlfajták az ivarérésük időpontjára gyakran elzsírosodnak *ad libitum* takarmányozáskor. Ennek következménye, hogy az első fialás után gyakrabban fordul elő közöttük gyors leromlást okozó anyagcserezavar. Feltételezhető tehát, hogy a felnevelés alatti korlátozott takarmányozással ezek a veszteségek elkerülhetőek lennének.

A kísérletben (*Eiben és mtsai*, 1999) a nőivarú növendékek takarmányfelvételét 10. hetes koruktól kezdve adagolással vagy a takarmány felvétel idejének csökkentésével korlátozták. Ez a korlátozás egészen a tenyésztésbevitelhez szükséges testsúly (3,4–3,5 kg) eléréséig tartott. Utána *ad libitum* takarmányfogyasztás volt.

A napi 130 grammos adagra korlátozott csoportban érték el az állatok a leglassabban (19,5 hetes életkorra) a tenyésztésbe vételi súlyt, az 1–3 fialás során pedig ugyanez az anyacsoport tartotta a legmagasabb szinten a testsúlyát. Ebben a csoportban volt a legmagasabb (71%) a fialási arány, de ez nem különbözött szignifikánsan az *ad libitum* takarmányozott kontroll csoportéhoz (62%) viszonyítva. Az alomlétszámban és az alomsúlyban sem volt jelentős a különbség. Tekintettel arra, hogy a takarmányozási szint biztosan befolyásolja a szaporasági funkciókat, ennek a kérdéskörnek további tanulmányozása látszik szükségesnek.

Az inszemináláshoz szükséges ondó biztosítása a megfelelő időpontban — a baknyulak tesztoszteron szintjét befolyásoló néhány tényező: Az ondó jellemzőit a fajta, a takarmányozás (szintje és összetétele), az egészségi állapot és a felnevelési körülmények, valamint a gyűjtés időpontja és módszere egyaránt befolyásolja, ezért nem meglepő hogy az igen nagy változékonyságot mutat. A környezeti hatások megismerése segít az optimális termelés környezeti feltételeinek megteremtésében. Az ondó hígítása és tárolása során fellépő hatások megismerése pedig szükséges a hosszú távú tárolást, így minden esetben biztonságos ellátást lehetővé tevő eljárások kidolgozásában.

A magas környezeti hőmérséklet és a korlátozott takarmányfelvétel hatása a baknyúl endokrin funkciójára

A nyári időszak hőmérsékleti maximum értékei az utóbbi években még Magyarországon is olyan magasak, hogy a párologtató hűtőrendszerrel ellátott istállóban is jóval meghaladja a hőmérséklet a termoneutrális értéket. Ez negatívan érinti a bakok ondó termelését, de kevés részletes információval rendelkezünk ebben a vonatkozásban.

A KÁTKI és a SZIE kutatói görög együttműködőkkel speciális kísérletekben próbálták meg a meleg és a magas hőmérséklet által okozott takarmány felvétel csökkenés hatását különválasztani. A kísérleteket Görögországban természetes körülmények között, Magyarországon pedig klímakamrában végezték. A görögországi kísérletben azt találták, hogy az ivarérett bakok plazma tesztoszteron alapszintje hétszer ismételt mérés átlagában nem különbözött jelentősen 25 °C hőmérsékleten ad libitum vagy korlátozottan tartott csoportban, de még a 32 °C hőmérsékleten tartottaknál sem. A GnRH indukció után viszont lényegesen magasabb értékeket kaptak (10,6, 15,1 illetve 8,8 ng/ml) a hőmérséklet miatt vagy a takarmányadagolással korlátozott (de 25 °C hőmérsékleten tartott) bakok esetében. Nem volt viszont különbség a csoportok között a kontroll időszakban, amikor ugyanazokat a bakokat már egységes környezetben helyezték el (*Xyloury és mtsai*, 1999). A GnRH indukálta tesztoszteron szint mérése ennek alapján elég érzékeny módszernek tűnik a környezeti hatások értékelésére. Ugyanakkor az is kiderült, hogy a takarmányfelvétel csökkenése emeli a tesztoszteron szintet, így a csökkent ivari teljesítmény valószínűleg nem írható a tesztoszteron termelődés csökkenésének rovására.

A kutatásokhoz szükséges együttműködés kiadásait a Tét GR-24/96 és a COST Action 848 által nyújtott támogatás fedezte. A bemutatott kutatásokat FVM alaptevékenység keretében, illetve FM KF-28/4/98 kutatási szerződés által biztosított támogatásból végeztük.

IRODALOM

- Boiti, C.*(1998): International collaboration in rabbit reproduction research: Presentation of the IRRG group. *Wld. Rabbit Sci.*, 6. 1. 175–178.
- Eiben, Cs. – Kustos, K. – Gódor, S. – Theau-Clément, M. – Szendrő, Zs.*(2002): Influence of nursing method on the performance of rabbit does. *Proc. 2nd Rabbit Congress of the Americas (AB-WRSA)*, Habana, Cuba, 277–281.
- Eiben, Cs. – Kustos, K. – Kenessey, A. – Virág, Gy. – Szendrő, Z.*(1999): Effect of different feed restrictions during rearing on reproduction performance in rabbit does. *Wld. Rabbit Sci.*, 9. 1. 9–14.
- Eiben, Cs. – Kustos, K. – Szendrő, Zs. – Theau-Clément, M. – Gódor, S-né*(2001): Effect of male presence before artificial insemination on receptivity and prolificacy in lactating rabbit does. *12th Symposium on Housing and Diseases of Rabbits, Furbearing and Pet Animals*, Celle, Germany, 1–6.
- Theau-Clément, M.*(2000): Advances in biostimulation methods applied to rabbit reproduction. *Wld. Rabbit Sci.*, 8. Suppl. N°1, Vol. A, 61–79.
- Szendrő, Zs. – Jovanczai, Zs. – Theau-Clément, M. – Radnai, I. – Bíró-Németh, E. – Milisits, G.* (1999): The effect of doe-litter separation on production performance in rabbit does and their kits. *Wld. Rabbit Sci.*, 7. 3. 165–169.

- Virág, Gy.*(2003): A biostimulálás egy fajtájának hosszútávú átfogó hatása az anyanyulak termelésére. állattenyésztés és Takarmányozás, 52. 2. 162–166.
- Virág, Gy. – Kustos, K. – Szabó, L.*(1999) : Effect of a 48 hours doe-litter separation on rabbit doe's reproductive performance and offspring's growth. *Wild. Rabbit Sci.*, 7. 3. 155–159
- Xyloury, E.F. – Virág, Gy. – Papantonakis, C.*(1999): A nyári hőterhelés hatása baknyulak szaporására. 11. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 57–60.

Szerző címe: Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Authors' address: Institute for Small Animal Research
H-2100 Gödöllő, Pf.417.

A BIOSTIMULÁLÁS EGY FAJTÁJÁNAK HOSSZÚTÁVÚ, ÁTFOGÓ HATÁSA AZ ANYANYULAK TERMELÉSÉRE

VIRÁG GYÖRGYI

SUMMARY

Virág, Gy.Ms.: LONG TERM EFFECT OF BIOSTIMULATION ON GLOBAL PRODUCTIVITY OF RABBIT DOES

Oestrus and fertility of rabbit does at day 10 PP is severely impaired. Still females are preferably inseminated on this day because of the other advantages of 42 days cycled propagation. Temporary disruption of suckling before AI was shown to improve kindling rate of lactating does. However overall effects of long term repeated application of this treatment was rarely analysed.

Total effect of disrupted suckling applied on the same doe population did not influence other parameters than which were recorded at the does inseminated in lactating stage. The kindling rate was improved by 16%, but the litter weight at 21 days age was significantly decreased. More doe loss was found resulting from this treatment.

Better kindling rate, longer period between two kindling and more culling of re-inseminated does was similar at each of the disrupted and free suckling groups. According to these results, total mass per female produced for 21 days of lactation summed across whole productive period (max. 1 year) was 6.3 v 7.6 kg in disrupted and free lactating group.

BEVEZETÉS

A nyúltenyésztésben túlnyomórészt félintenzív szaporítási ütemet követnek, ami azt jelenti, hogy az anyákat a fialás utáni 9–10. napon termékenyítik, vagyis a szoptatás alatt. Ilyenkor az anyák ivari fogékonysága és termékenysége kevésbé jó, mint a szűz tenyészőnővendékeké illetve az előző termékenyítésből üresen maradt, nem szoptató anyáké. Az alacsonyabb fialási arány pedig csökkenti a termelés hatékonyságát.

A szoptató anyák ivarzását a tenyésztők különböző módszerekkel igyekeznek javítani és a termékenyítés időpontjára időzíteni. A különböző biostimulációs eljárásokkal a drága hormonkezeléseket próbálják meg helyettesíteni. A szoptató anyanyúl és a szopósok 48 órás elválasztása, ami egy szopás elmaradását jelenti, az egyik használható módszer. Korábbi munkánkban beszámoltunk arról, hogy a szoptatás rövid távú megszakítása miként befolyásolja a szoptatás 9–10. napján termékenyített anyanyulak termékenységét és szaporaságát, valamint nevelési eredményeit az 1–7. laktációban (*Virág és mtsai, 1999*). A szaporító állományokban azonban termékenyítésre kerülnek nem szoptató anyák is, azok, amelyek üresen maradtak, valamint amelyeket az elhullottak és selejtezettek pótlására állítanak be.

Jelen elemzés célja, hogy kiderüljön a szoptatás megszakítás hosszú távú alkalmazásának hatása. Megállapításra kerüljön, hogy a szoptató anyák esetében jelentkező előnyök és hátrányok hogyan befolyásolják összességében az anyaállomány termelési mutatóit.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokat Újzélandi fehér fajtájú nőivarú nyulakon végeztük. A kísérlet kezdetén 200, 16 hetes korú nyulat véletlenszerűen két csoportra osztottunk (100-100 állat).

A nyulakat egyszintes, önetetővel, önitatóval felszerelt és fialóládával kiegészíthető ketrecekben, egyesével helyeztük el. Kereskedelmi nyúltápot és ivóvíz minőségű vizet ad libitum fogyaszthattak.

A csoportok egyikében az elkövetkező évben a szoptatás termékenyítés előtti 48 órás megszakítása mellett (R), a másokban pedig szabadon szoptatva (F) 42 napos szaporítási ritmust alkalmaztunk és 3 tételben, összesen 26 alkalommal termékenyítettük az anyákat. A termékenyítéshez frissen gyűjtött, minősített és hígított heterospermát használtunk. Az inszeminálást steril üveg katéterekkel végezték, a peteleválást pedig ezzel egy időben izomba adagolt 25 NE GnRH-val idézték elő.

A 3 egymást követő alkalommal üresen maradt, valamint betegség tüneteit mutató állatokat selejteztük.

Az almokat, a születést követő napon a szopósok csoporton belüli áthelyezésével 8-ra kiegyenlítettük.

A termékenyítések alkalmával feljegyeztük az anyák pillanatnyi élettani állapotát a következő meghatározások szerint: szűz, szoptató, nem szoptató üres, illetve teljes alompusztulás miatt nem szoptató és megmértük a testsúlyukat (dkg). Fialáskor feljegyeztük a születéskori teljes és élő alomlétszámot, majd megmértük az alomsúlyt (dkg) a szoptatás 8. és 10. valamint 21. napján a szoptatás után. Rögzítettük a selejtezés vagy elhullás időpontját.

A szoptatás megszakításának valamint az élettani állapotnak a mennyiségi mutatókra kifejtett hatását és kölcsönhatását GENSTAT v6 szoftver GLM eljárásával, a minőségi mutatóké pedig Chi2 eljárással értékeltük.

EREDMÉNYEK

Az anyanyulak termékenysége és szaporasága: Összesen 1045 termékenyítés történt. A két csoportban azonos számú (99 R, illetve 101 F) szűz anyát termékenyítettünk. A továbbiakban szabadon szoptató csoportban kisebb volt a szoptatás alatti termékenyítések száma, mint a megszakítottban (191 F, illetve 221 R), ugyanez fordítva történt a nem szoptató üres anyák termékenyítése esetében (215 F, illetve 182 R). A teljes alompusztulás után termékenyített anyák száma mindkét csoportban alacsony volt. Az eltérések azonban statisztikailag nem voltak szignifikánsak ($\text{Chi}^2=6,56$, $P=0,087$).

A fialási eredményességet a csoport és az élettani állapot egyaránt jelentősen befolyásolta ($\text{Chi}^2=31,3$, $P<0,001$). A legjobb fialást a szűz nyulak termékenyítése eredményezte és ebben, amint az várható volt, a csoportok között nem volt jelentős különbség (63% R, illetve 71% F). A nem szoptató üres anyanyulak termékenyítése mindkét csoportban azonos, de az előbbinél kisebb arányú (49%) fialást eredményezett. Jelentősen kevesebb termékenyítéskor, szoptató anyanyúl fialt le a szabadon szoptató csoportban (41%), mint a megszakí-

tottban (57%). Tehát a szopás korlátozása ebben a csoportban 16%-kal javította a fialási arányt.

A fialásonként élveszületett darabot a szoptatás megszakítása egyik élettani állapotban sem befolyásolta, viszont a szűz anyák esetében ez az érték szignifikánsan ($P < 0,04$) alacsonyabb volt (1. ábra).

1. ábra: Fialásonként élve született állatok száma a különböző élettani állapotban végzett termékenyítésekből

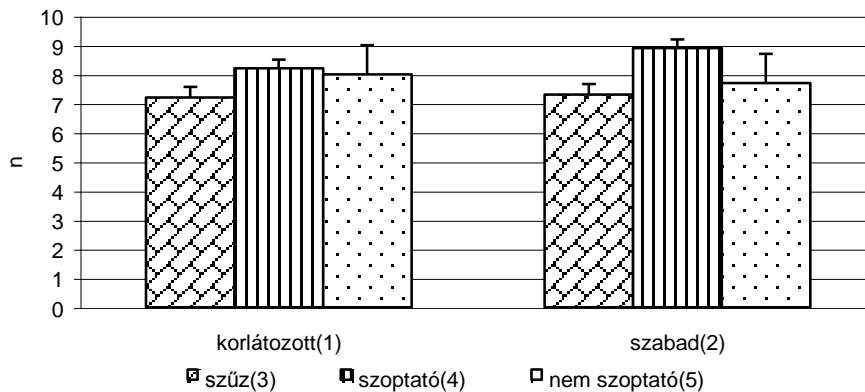


Fig. 1.: Litter size born alive as a result of inseminations performed at different physiological state of the doe disrupted(1), free(2), nulliparous(3), lactating(4) non lactating(5)

A fialás utáni napon 8-ra történt alomkiegyenlítés után a szoptatás 21. napján az alomlétszám átlaga $7,1 \pm 0,21$ volt, amit jelentősen nem befolyásolt a szoptatás megszakítása ($6,9 \pm 0,1$ az R ill. $7,2 \pm 0,1$ az F csoportban), vagyis a szopósok elhullásában nem mutatkozott meg a 48 órás éhezés hatása.

Az alom növekedése: Az alomsúly minden vizsgált életkorban a szűz anyáknál volt a legalacsonyabb ($P < 0,005$). Az almokat a megszakított csoportban az egyszeri szopás kimaradás egyformán negatívan érintette, függetlenül attól, hogy előzőleg is szoptató, vagy nem szoptató üres anya termékenyítéséből születtek ($P < 0,001$). A kihagyás előtti napon — 8 napos életkorban — és termékenyítéskor — 10 napos életkorban — az alomsúly szinte azonos volt ($135,8 \pm 27,8$ ill. $142,2 \pm 28,4$). Ezzel szemben a szabadon szoptató csoportban az almok erőteljesen gyarapodtak ezen időszakban is ($140,0 \pm 26,3$ ill. $163,2 \pm 29,9$). Az ekkor keletkezett különbség 21. napos korra is megmaradt (2. ábra).

Az anya állapota: Az anyák termékenyítéskori testsúlyát a szoptatás megszakítása nem, az élettani állapot viszont befolyásolta. A szűzek esetében volt a legalacsonyabb ($P < 0,001$) mindkét csoportban ($402,5 \pm 4,82$ R ill. $403,5 \pm 4,59$ F). Gyenge kölcsönhatás volt a kezelés és az élettani állapot között, mert az R csoportban a nem szoptató üres anyák testsúlya jelentősen magasabb volt,

mint a hasonló élettani állapotú anyáké az F csoportban ($505,5 \pm 26,4$ ill. $428,0 \pm 13,2$).

A két fialás közötti időtartam hosszabb volt a termékenyítéskor szoptató anyák esetében ($57,8 \pm 1,9$) mint a korlátozottan szoptató csoportban ($51,31 \pm 1,8$, $P < 0,02$). Ezzel szemben a termékenyítéskor nem szoptató üres anyák két fialása között átlag $78 \pm 1,5$ nap telt el, vagyis a sikertelen termékenyítés jelentősen növelte a két fialás közötti idő hosszát ($P < 0,001$).

Az egy év elteltével az induló állomány 81%-a kiesett. Nem volt különbség a megszakítás miatt a szűz és a nem szoptató üres anyák elhullás és selejtezés miatti kiesésében (4 és 7, illetve 53 és 59%), míg a szoptató anyákból valamivel nagyobb volt az elhullás a megszakítottan szoptató csoportban (19%) mint a szabadon szoptatóban (9%). Ez arra mutat, hogy hosszútávon a szoptatás megszakítás ismételt alkalmazásának lehet hátrányos hatása az anyák egészségi állapotára.

Összesített eredmény: Annak ellenére, hogy a 21. napos korban fialásonként mért alomsúlyt a kezelés bizonyítottan befolyásolta, az egy termékenyítésre eső ($85,79 \pm 6,10$ korl. ill. $100,52 \pm 6,44$) és anyánként a vizsgálati időszak alatt összesen termelt 21. napos alomsúly (627 ± 58 korl. ill. $766 \pm 61,3$ szab.) a két csoportban nem különbözött bizonyíthatóan ($P = 0,1$).

2. ábra: A termékenyítésenkénti, fialásonkénti és anyánként összesen termelt 21. napos alomsúly megszakított és szabad szoptatású csoportban

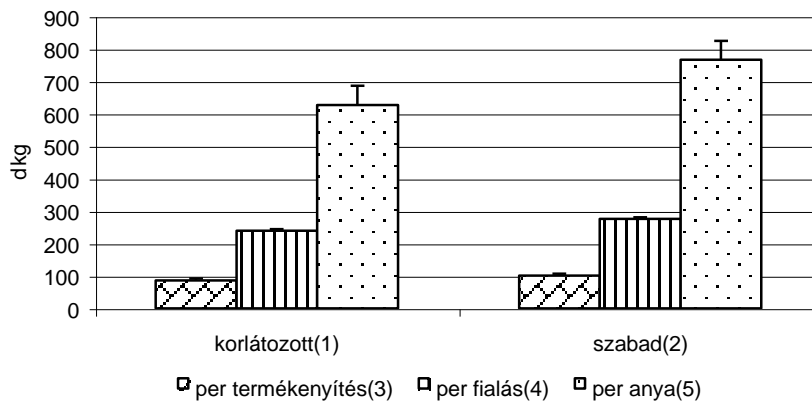


Fig. 2.: Litter weight at 21 days age per insemination, per kindling and total per doe in the disrupted and free suckling groups
disrupted(1), free(2), per insemination(3), per kindling(4), per doe(5)

Ezt elsősorban az alomsúly és a fialási arány kezelés hatására létrejött, csoportokon belül ellentétes irányú változása eredményezte. Továbbá a szeparálás nem befolyásolta az anya termelését, amikor üresen került termékenyítésre és a termékenyítések majdnem felét, valamint a fialások 35% (R) és 41%-át (F) ez tette ki. Mindennek összegzésképpen, annak ellenére, hogy a szoptató anyák fialási arányát javította a korlátozott szoptatás, e csoport anyái a

vizsgált időszak alatt összesen 364 kg 28. napos élősúlyt termeltek, míg a szabadon szoptató csoportban ennél többet, 398 kg-ot.

KÖVETKEZTETÉSEK

A szoptató anyák többször ismételt megszakítása a termékenyítés előtt a legtöbb tulajdonságban nem változtatja meg a korábbról ismert egyéb befolyásoló tényezők érvényesülését. Kizárólag a termékenyítéskor szoptató anyák mutatóit befolyásolja. A fialási arányt és így a termékenyítésre eső született darabot valamelyest javítja, ugyanakkor a szopósok gyarapodását súlyosan csökkenti. Emiatt a az össztermelés romlik a korlátozott csoportban, annak ellenére, hogy a termékenységet javító hatása igazoltnak mondható. A megszakítva szoptató anyacsoportból több állat esett ki a szoptatás alatt, és ez a negatív hatás is igazolt, valószínűleg, mert a tejmirigy egészségi állapotát a többször ismételt beavatkozás kedvezőtlenül befolyásolja. A nem szoptató üres anyák mindkét csoportban igen magas kiesési aránya ugyanakkor arra mutat, hogy egyformán sok a rosszul termékenyülő anya mindkét csoportban, amelyeket emiatt selejtezni kell. Az eredmények alapján az ismertetett eljárás gyakorlati előnye nem bizonyosodott be.

IRODALOM

Virág, Gy. – Kustos, K. – Szabó, L.(1999) : Effect of a 48 hours doe-litter separation on rabbit doe's reproductive performance and offspring's growth. *Wild. Rabbit Sci.*, 7. 3. 155–159.

Szerzők címe: Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Authors' address: Institute for Small Animal Research
H-2101 Gödöllő, Pf. 417.

SPERM ANALYSIS AND SEXUAL CHARACTERISTICS OF FRIZZLED HUNGARIAN GANDERS

PRELIMINARY STUDY

VARGA, ÁKOS — BARNA, JUDIT Ms.— ALMÁSI, ANITA Ms.

ÖSSZEFOGLALÁS

Varga, Á. – Barna, J. – Almási, A.: FODROSTOLLÚ MAGYAR GÚNARAK SPERMATOLÓGIAI VIZSGÁLATA ÉS IVARI JELLEGZETESSÉGEI

A gödöllői Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézetben folyó génmegőrzési program keretében spermológiai vizsgálatok kezdődtek a fodrostollú magyar gúnaroknál abból a célból, hogy felmérjék az ondómélyhűtés, mint *ex situ* génmegőrzés lehetőségét e parlagi fajtában.

A vizsgálatokhoz az állatokat a masszálásra adott válaszreakcióik, külső ivarszerveik nagysága és általános egészségi állapotuk alapján válogatták ki a törzsállományból.

Az egyedi ondómintákat mennyiségi (*térfogat*), és minőségi (makroszkóposan: *szín, konzisztencia, szennyezettség*, mikroszkópos vizsgálatok: *spermium-motilitás, koncentráció, élő-élettelen arány, morfológia*) vizsgálatoknak vetették alá. A kapott összesített eredményeket más lúdfajták irodalmi adataihoz hasonlították, amelyek alapján megállapíthatták, hogy a fodrostollú magyar gúnarok spermatermelése sok tekintetben elmarad a nemesített lúdfajtákétól (rövid tenyészszezon, viszonylag kisebb mennyiségű ondó, gyengébb motilitás), ennek ellenére a spermafagyasztási kísérleteket megkezdik a következő ivari ciklusban. A különböző spermium-anomáliák megoszlásainak aránya nem tér el az egyéb fajtáknál ismert értékektől (35% rendellenes spermium), de adataik megerősítéséhez további ondóminták elemzése szükséges.

INTRODUCTION

Artificial Insemination (AI) of birds is more difficult than that of the mammalian species, due to the stringent process of vaginal transport of spermatozoa and the necessity of surviving of them for several days or weeks within the oviducal sperm storage tubules. Around 98–99% of spermatozoa are lost in a few centimetres between the site of insemination and the sperm storage tubules at the uterovaginal junction (*Bakst et al.*, 1994). In spite of these facts AI has become indispensable in the turkey industry, and much effort has been devoted to develop the technique for cryopreservation of semen of fowl (*Watanabe and Terada*, 1980; *Lake et al.*, 1981; *Duplaix and Sexton*, 1983; *Tajima et al.*, 1989; *Seigneurin and Blesbois*, 1995), turkey (*Kurbatov et al.*, 1985; *Tur and Mavrodina*, 1987; *Schramm and Hübner*, 1988), drake (*Kasyanenko and Kurbatov* 1986; *Kurbatov et al.*, 1988; *Schramm and Hübner*, 1989) and from the non domesticated avian species (*Gee and Sexton*, 1983, 1990; *Gee et al.*, 1985, 1993; *Parkes et al.*, 1986; *Hartley et al.*, 1999).

Although AI is not widely used in goose breeding, there are attempts to initiate this new technology (*Bondarenko*, 1985; *Grunder and Pawluczuk*, 1991; *Chelmonska and Lukaszewicz*, 1995; *Malis*, 1998). A certain asynchrony of sexual cycles of males and females, the low fecundity and the risk of phallitis at

natural mating induce the broader application of AI in breeding practice. Experiments regarding freezing gander semen are not numerous (*Chelmonska et al.*, 1984; *Tsu et al.*, 1993; *Andreev et al.*, 1984), but some researcher managed to receive fertility more than 80% by inseminating frozen-thawed sperms (*Sakhat-sky et al.*, 1995; *Tselutin et al.*, 1995; *Lukaszewicz*, 2001). Effective freezing methods offer the possibility of protecting gene pools of rare native breeds as well.

A new gene conservation programme of frizzled Hungarian goose has been started recently by the Institute for Small Animal Research (ISR, Gödöllő), where a growing population of white, greyish and spotted individuals — collected from Transylvanian villages — are maintained (*Szalay*, 2002). Frizzled Hungarian goose is a unique variety of old Hungarian goose, which is considered now as a typical poultry breed for Hungary.

In behaviour, production and reproduction parameters this hardy, resistant breed is genetically close to its ancient form (low egg production, strong seasonality, short reproductive cycle, poor sexual dimorphism). As a part of *ex situ* gene conservation programme the need of sperm cryoconservation of this breed has raised. As a first step the monitoring of suitability for artificial sperm collection, of the characteristic signs of the phallus and of the sperm parameters was carried out in Gödöllő, in the spring sexual cycle of this year.

MATERIALS AND METHODS

Birds and husbandry: 14 two-year-old frizzled Hungarian ganders selected from 52 free ranged individuals from the poultry gene bank stock of ISR were used for the investigations. The birds involved in the study were housed individually in 2 m² separated cages under an artificial lighting programme of 10L/14D at the beginning of March, which was increased to 12L/12D to the end of the month. They were fed *ad libitum* by a commercial food for breeding geese (17% crude protein, 12 MJ/kg Metabolisable Energy). The selection and training were carried out from the middle of February to the beginning of March according to the following points of view: good health, steady temper, appropriate size of phallus (at least 50–55 mm), good and quick (10–15 sec) reaction ability for massage technique. During the experimental period the caged males had visual and sound contact with females.

Semen preparation and evaluation: Samples of semen were collected once a week by dorsal-abdominal massage (*Johnson*, 1954) by the same two persons into a single layer glass artificial vagina. In order to get clean ejaculates food was removed from the cages one day before sperm collection. Evaluation of samples was done at room temperature. The qualification of the semen was carried out macroscopically (volume, colour, consistency, uric, faecal or blood contamination) and microscopically (motility, concentration, morphology of spermatozoa, ratio of live/dead sperm).

The motility of spermatozoa was scored subjectively by the same operator under x 250 magnification from 0 to 3, where 0=immotile spermatozoa; 1=5–30%; 2=35–70%; 3>75% motile spermatozoa. From time to time the motili-

ty was checked objectively by a version of computer aided sperm analyser (CASPAR, Picktron Ltd., Hungary) as well. The evaluation of concentration was carried out by the use of a special chamber developed for sperm counting (Makler counting chamber, Sefi-Medical Instruments, Israel). For determine the morphological abnormalities and the ratios of live/ dead spermatozoa smears were stained by anilin-eosine and examined under oil immersion objective (x 1250 magnification). The proportions of abnormal spermatozoa were assessed subjectively out of at least 200 cells.

RESULTS AND DISCUSSION

According to *Kisné and Hargitai* (1995) usually 50–60% of Hungarian ganders are suitable for semen collection, however, in this case only 30% of frizzled Hungarian males gave good response to massage. The handling of the ganders was not easy due to their wilder temper.

The lengths of the phalluses are 40–50 mm during the reproductive cycle and 25–35 mm out of this period, which is shorter by 1–2 cm than that of the meat type breeds (*Csuka and Ledec*, 1984).

During the mentioned two months altogether 40 semen samples were collected, from which 28 ejaculates were appreciable for assessment. Some samples were contaminated by faeces and/or urates; the volumes of others were too small for the assessment. Two ganders did not produce any sperm during the cycle. The various sperm parameters can be seen in *Table 1 and 2*.

Table 1.

Mean values of semen of frizzled Hungarian ganders

Ganders(1)	Volume (µl)(2)	Motility (scores 0–3)(3)	Concentration (10 ⁶ sp/ µl)(4)	Ratio of live/dead sp, %(5)
1	130	3, 3	1.665	84/16
2	344	3, 2, 1	0.996	89/11
3	412	2	1.140	93/7
4	125	2	0.980	—
5	—	1	—	—
6	300	3, 3, 3	0.565	76/24
7	250	3, 3, 3	1.050	93/7
8	210	3, 3, 1, 1	1.375	84/16
9	133	1, 0	0.260	—
10	300	3, 1	—	—
11	—	—	—	—
12	293	2, 2, 2	0.811	86/14
13	261	2, 1	0.425	75/25
14	120	1	0.700	—
\bar{x}	258	2.071	0.900	84/16
Extreme values(6)	80–700	0–3	0.26–2.25	93/7–70/30

1. táblázat: *Fodrostollú magyar gúnarak ondómintavizsgálatai eredményei*
 gúnarak(1), térfogat(2), spermiumok motilitása(0–3-ig pontozva)(3), spermium koncentráció(4), élő/holt spermiumok aránya(5), szélső érték(6)

The main value of semen volume of frizzled Hungarian ganders was at the lowest level of the average range compared to the different breeds: White Italian (White Koluda): 160–230 μl (Lukaszewicz, 2001), Kubanskaya: 400–1300 μl (Kurbatov, 1976), Landes: 300 (Sellier *et al.*, 1995) and 720 μl (Nickolova and Guerzilov, 2000), Benkowsky White: 660 μl (Nickolova and Guerzilov, 2000).

There are not many data about gander sperm motility but the spermatozoa of frizzled ganders showed poorer motility (53%) than that of White Italian (White Koluda) ganders, which produced 60–70% positive movement (Lukaszewicz, 2001.).

Regarding to the concentration there were extreme deviations among the values (0,26–2,25 $\times 10^6$ sp/ μl) however the mean value was similar to be find in others breeds: White Italian (White Koluda): 0,320–0,980 $\times 10^6$ sp/ μl (Lukaszewicz, 2001), Landes: 0,500 $\times 10^6$ sp/ μl (Sellier *et al.*, 1995) and 0,268 $\times 10^6$ sp/ μl (Nickolova and Guerzilov, 2000), Benkowsky White: 0,300 $\times 10^6$ sp/ μl (Nickolova and Guerzilov, 2000).

The ratio of live/dead spermatozoa shows an acceptable value with 84% live cells though Lukaszewicz (2001) found better ratio in White Italian (White Koluda) gander semen: 93% live and 7% dead spermatozoa.

Table 2.

Ratios of the various morphological abnormalities in the frizzled Hungarian gander semen (%)

Gander (1)	Micro-head (2)	Big nuclei (3)	Bulb head (4)	Broken head (5)	Other head anomaly (6)	Acrosome anomaly (7)	Swollen midpiece (8)	Crooked neck (9)	Double tail (10)	Broken tail (11)	Bended tail (12)
1	0.5	11	15	4	2	8.5	1	7.5	0	1	0
2	0	9.3	5.5	3.3	2.5	11.3	1.2	5	0	1.7	1.5
3	0	8	7.5	3	4	13.5	2.5	9	0	1.5	2
6	0	7	3.5	3.2	4	10.7	0.2	5.4	0	2	1
7	0	11	3	1	0	15	0	1	Non examined(13)		
8	0	5	6	4	4	4.7	0.7	8.5	0	1.2	2
12	0.5	3.2	1.5	2.25	1.2	19.7	0.2	0.7	0	0.7	0.7
13	1	2.5	5.5	1	1	6.5	2.5	3	0	0.5	1.5
\bar{x}	0.2	7	5.3	3	2.5	11.4	0.9	5	0	1.3	1.3

2. táblázat: A különböző morfológiai rendellenességek aránya a fodrostollú magyar gúnarakl spermiumában (%)

gúnarak(1), kis fej(2), nagy fej(3), gömbfej(4), megtört fej(5), egyéb fej rendellenesség(6), akroszóma rendellenesség(7), duzzadt középdarab(8), megtört nyak(9), dupla farok(10), megtört farok(11), hajlott farok(12), nem vizsgált(13)

The ratio of morphologically abnormal spermatozoa was around 37%, which is lower than that of White Italian (White Koluda) semen with around 50% (Lukaszewicz, 2001). The most frequent anomalies are the different types of acrosome aberrations (11,4%) and — interestingly — the big nuclei spermatozoa (2,5—11%). This anomaly was shown to be frequent (10–40%) in Houbara bustard semen (Lindsay *et al.*, 1999) and in guinea fowl semen (Barna and Wishart, 2002) and these spermatozoa are presumed as diploid cells. The ratio of bulb heads — as immature forms — is high as well despite that the sperm collections were not too frequent (once a week).

As a conclusion, artificial sperm collection is difficult from this breed, the reproductive season is too short to get many semen samples and the sperm quality is a bit poorer than the average of commercial breeds. In spite of these difficulties the need of sperm freezing of this species justifies the resumption of such investigations.

REFERENCES

- Andreev, V.I. – Sakhatsky, N.I. – Ostashko, F.I.*(1984): Use of ethylen glycol and dimethylformamide as cryoprotectants for deep freezing of goose sperm, *Pticevodztvo*, Kijev, 37. 53–55.
- Bakst, M.R. – Wishart, G.J. – Brillard, J. – P.*(1994): Oviductal sperm selection, transport and storage in poultry. *Poult. Sci., Rew.*, 5. 117–143.
- Barna, J. – Wishart, G.*(2002): Diploid spermatozoa in guinea fowl, *Proc 9th Int. Symp. Spermatology*, Cape Town, South Africa, 41.
- Bondarenko, A.*(1985): Effective using of ganders in goose breeding. *Pticevodztvo*, 3. 19.
- Chelmonska, B. – Koch, E. – Chrazanowska, M.*(1984): Fertilizing ability of frozen gander semen depending upon the frequency of insemination. (in Polish), *Instytut Zootechniki, Wyniki prac Badawczych*, 10. 191–197.
- Chelmonska, B. – Lukaszewicz, E.*(1995): Current state and future of AI in waterfowl. In *10th Europ. Symp. Waterfowl.*, Halle, Germany, 225–239.
- Csuka, J. – Ledec, M.*(1984): The development and correlations of reproductive performance of ganders in the course of three years. *Ziv. Vyroba*, 29. 7. 635–640.
- Duplaix, M. – Sexton, T.J.*(1983): Effects of prefreeze treatment on the fertilizing capacity of unfrozen and frozen chicken semen: extender characteristics and dilution method. *Poult. Sci.*, 62. 2255–2260.
- Gee, G.F. – Bakst, M.R. – Sexton, T.J.*(1985): Cryogenic preservation of semen from the Greater Sandhill Crane. *J. Wildlife management*. 49. 480–484.
- Gee, G.F. – Morell, C.A. – Franson, J.C. – Pattee, O.H.*(1993): Cryopreservation of American kestrel semen with dimethylsulfoxide. *J. Raptor Res.*, 2. :21–25.
- Gee, G.F. – Sexton, T.J.*(1983): Seaside sparrow sperm preservation. In: *The Seaside Sparrow, its Biology and Management*. Raleigh, NC: North Carolina Biological Survey and North Carolina State Museum, 163–165.
- Gee, G.F. – Sexton, T.J.*(1990): Cryopreservation of semen from the Aleutian Canada Goose, *Zoo Biology*, 9. 361–371.
- Grunder, A.A. – Pawluczuk, B.*(1991): Comparison of Procedures for Collecting Semen from Ganders and Inseminating Geese. *Poult. Sci.*, 70. 1975–1980.
- Hartley, P.S. – Lindsay, C. – McCormick, P. – Wishart G.J.*(1999): Houbara bustard (*Chlamydotis undulata undulata*) produced from cryopreserved spermatozoa. *Zoo Biol.*, 18. 147–152.
- Johnson, A.S.*(1954): Artificial Insemination and duration of fertility of geese. *Poult. Sci.*, 33. 638–640.
- Kasyanenko, S.V. – Kurbatov, A.D.*(1986): Drake sperm cryopreservation. *Pticevodztvo*, Moscow, 6. 27–28.
- Kisné, X. – Hargitai, Cs.*(1995): A lúd mesterséges termékenyítésének gyakorlati tapasztalatai., *Magyar Állatorvosok Lapja*, 50. 321–324.
- Kurbatov, A.D. – Mavrodina, T. – Tur, B.*(1985): Artificial insemination of turkeys with frozen sperms. *Pticevodztvo*, Moscow, 2. 19–20.
- Kurbatov, A.D. – Platov, E.M. – Korban, N.V. – Moroz, L.G. – Nauk, V.A.*(1988): Cryopreservation of farm animal sperm. *Agropromizdat*, Leningrad, 195–245.
- Kurbatov, A.D. – Tsarenko, R.G. – Popov, I.I.*(1976): Improving of AI in geese. *8th Int Cong. Anim. Repr. Al. Krakow, Poland*, 4. 1009–1012.
- Lake, P. – Ravie, O. – McAdam, J.*(1981): Preservation of fowl semen in liquid nitrogen. *Br. Poult. Sci.*, 22. 71–77.
- Lindsay, C. – Staines, H. – McCormick, P. – McCallum, C. – Choulani, F. – Wishart, G.*(1999): Variability in size of the nucleus in spermatozoa from Houbara bustards. *J. Repr. Fertil.*, 117. 307–313.
- Lukaszewicz, E.*(2001): DMF effects on frozen gander semen. *Br. Poult. Sci.*, 42. 308–314.

- Malis, P.Z.*(1998): The optimal use of goose sperm for fertility. Proc. 10th Europ. Poult. Conf., Jerusalem, Israel, 820–824.
- Nickolova, M. – Guerzilov, V.*(2000): Sperm characteristics of Landes and Benkovsky White Ganders during the first and the second reproductive years. Int. Conf., Taiwan, 181–187.
- Parkes, J.E. – Heck, W.R. – Hadaswick, V.*(1986): Cryopreservation of peregrine falcon semen and postthaw dialysis to remove glycerol. Raptor Res., 20. 15–20.
- Sakhatsky, N.I. – Andreev, V.I. – Artemenko, A.B.*(1995): Technology of goose sperm low temperature conservation. 10th Europ. Symp. Waterfowl., Halle, Germany, 283–285.
- Schramm, G.P. – Hübner, R.*(1988): Effects of different cryoprotectives and deep freeze techniques on the reproductive potential of turkey sperm after prolonged storage. Mh. Vetmed, 43. 426–427.
- Schramm, G.P. – Hübner, R.*(1989): Konservierung von Geflügelsperma. Arch. Tierz. 32. 51–61.
- Seigneurin, F. – Blesbois, E.*(1995): Effects of the freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. Theriogenology, 43. 1351–1358.
- Sellier, N. – Rousselot-Pailley, D. – Reviere, M. – De Reviere, M.*(1995): Artificial insemination of Landes geese: current position and prospects. Productions-Animales. 8. 2. 127–133.
- Szalay, I.*(2002): Régi magyar baromfifajták (Old Hungarian Poultry). Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Tajima, A. – Graham, E.F. – Hawkins, D.M.*(1989): Estimation of the relative fertilizing ability of frozen chicken spermatozoa using a heterospermic competition method. J. Repr. Fert., 85:1–5.
- Tselutin, K. – Narubina, L. – Mavrodina, D. – Tur, B.*(1995): Cryopreservation of poultry semen. Br. Poult. Sci., 36. 805–811.
- Tsu, Y.C. – Wu, H.K. – Cheng, W.T.K. – Ma, R.C.S.*(1993): Cryopreservation of gander semen. Memoirs Colleg. Agric. National Taiwan Univ., 33. 3. 214–228.
- Tur, B. – Mavrodina, T.*(1987): Turkey sperm cryopreservation. Pticevodstvo, Moscow, 8. 28–29.
- Watanabe, M. – Terada, T.*(1980): Studies on the deep freezing of fowl semen in pellet form. Proc. 9th Int. Cong. Anim. Repr. AI, 5. 477–479.

Szerzők címe: Varga, Á. – Barna, J.: Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Authors' address: Institute for Small Animal Research
H-2101 Gödöllő, Pf.417.
Almási, A.: Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar
University Kaposvár, Faculty of Animal Science
H-7401 Kaposvár, Pf.16.

A MESTERSÉGES TERMÉKENYÍTÉS JELENTŐSÉGE ÉS MÓDSZERE A LÚDFAJBAN

ALMÁSI ANITA — BOGENFÜRST FERENC

SUMMARY

Almási, A.Ms. – Bogenfürst, F.: THE IMPORTANCE OF ARTIFICIAL INSEMINATION IN GOOSE: PRACTICAL APPROACH

Based on Hungarian experience the reason of the depression of fecundity originates from the low level of the fertility potential of ganders due to several factors e.g. the fusariotoxin (zearalenon) content of the feed, the phallus-disease, or the rapid decrease in the semen quality at the end of the laying period. These phenomena could be eliminated with artificial insemination (AI). In case of geese AI is usually used ad hoc however the low fecundity rate, the improper sex ratio and the risk of infections during mating indicate the need of routine application of AI as well. The aim was to develop a practical method of artificial insemination of geese, which could be applied also under field conditions. In our presentation the necessary conditions and essential equipment are demonstrated. The improving effect of insemination was examined in groups containing ganders and groups without ganders. The could be increased the fertility up to 95% and 92% respectively.

A baromfiágazat hatékonyságát nagymértékben befolyásolja a naposállatok előállításának költsége ezért fontos a szaporulati eredmények javítása. A lúdfaj esetében a szaporulatot túlnyomórészt tradicionálisan, extenzív tartásmódban, természetes párzási feltételek mellett állítják elő. A faj köztudottan gyenge szaporasági mutatói azonban az utóbbi években tovább romlottak. Ennek elsődleges okai között szerepel a fusariotoxinok jelenléte, valamint a phallusgyulladás. Ez utóbbi okai között elsősorban phalluscsipkedést kell keresnünk, melynek fő kiváltó tényezői a túlstimulálás és a zsúfolt tartás által okozott agresszivitás.

Tapasztalataink szerint a phallusgyulladás kellő időben történő felismerése és a gyulladt phallusú egyedek állományból való eltávolítása megoldás lehet a problémára. Nagyobb létszámú gúnár kivétele esetén azonban számolnunk kell azzal, hogy a pótlásként bekerülő új gúnarak beilleszkedése akár 2–3 hetet is igénybe vehet. Eközben a termékenység csökkenését fogjuk tapasztalni.

A termékenység szempontjából további problémát jelent, hogy míg a tojók folyamatosan, akár a 20 hetet is meghaladóan képesek tojástermelésre, addig a gúnarak spermatermelése — mennyiségét és minőségét tekintve — mindössze 10–15 hétig kielégítő. Ennek megfelelően a tojástermelési periódus utolsó harmadában a termékenység drasztikus csökkenésnek indulhat.

A zárt, intenzív tartástechnológia bevezetésével a termékenység általában gyengébb lett, hiszen a technológiák elsősorban a tojók igényeinek kielégítésére koncentrálnak, a gúnarakét még nem ismerjük kellő részletességgel. Megnyilvánul ez a takarmányozásban is, a tojótáp magas aminosav-, Ca és P-tartalma, valamint a zárt tartásban az alacsony fénytartam és -intenzitás kedvezőtlenül hat a spermatermelő képességre. A termelő állományból kiemelt gúnarak

vizsgálata figyelmeztet arra, hogy lúdállományainkban viszonylag nagy arányban találhatóak kevés, illetve rossz minőségű spermát adó gúnarak.

Mindezen problémák csökkentésére, illetve megszüntetésére a mesterséges termékenyítés bevezetése jelenthetne egyfajta alternatívát (Johnson, 1954). Bár ez a módszer nem tartozik a legelterjedtebb technológiák közé, mégis gyakorlati alkalmazása elháríthatna bizonyos magatartásbeli problémákat, amelyekkel a természetes párzás alkalmával találkozunk, és ez jelentősen javítaná a faj szaporóságát.

A gúnarak szaporodásbiológiai sajátosságai: Természetes fényviszonyok között a tavasszal — április közepe és május közepe között — keltetett hímivarú ludak posztembrionális fejlődésében a pubertás 18. hetes életkorban indul meg. Ekkor megjelennek az első spermaticiták, majd 24 hetes korban a spermaticiták. Érett hímivarsejtek először 30. hetes életkor körül várhatók. A gúnarak ivarérese a genotípustól, a környezeti feltételektől és a kelés időpontjától függően korábban is bekövetkezhet (Bogenfürts, 1992).

Anatómiai jellegzetességek. A gúnaraknak kitűrhető, mintegy 30–100 mm hosszú spirális alakú párzószerve, ún. phallus protrudense van. Ez nyugalmi állapotban a kloáka bal oldalán levő tasakban helyezkedik el, merevedett állapotban pedig spirálisan megcsavarodott alakot vesz fel. Mérete és jellege számottevő különbségeket mutat a termelési időszak, azaz a szezonális aktivitás és a nyugalmi időszak (nyár vagy az ősz vége) között. Az aktív, termelésre kész gúnár ivarszervének hossza elérheti a 60–70 mm-t, míg a nyári pihenő (ún. fotorefrakter) fázisban vagy decemberben ez csak 20–30 mm.

1. ábra: A gúnarak spermatermelésének alakulása a termelési hetek során

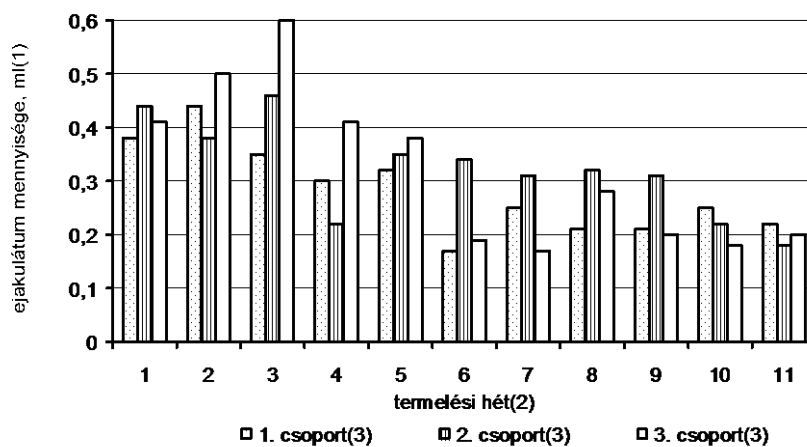


Fig. 1.: Individual differences in semen production of 3 different genotype average ejaculate volume, ml(1), weeks(2), group(3)

A többi baromfifajjal összehasonlítva a here testnagysághoz viszonyított aránya és az ivarsejtek mennyisége a gúnarak esetében lényegesen kisebb. A levehető ondó mennyiség jelentős genotípusos eltéréseket mutat, átlagosan

0,1–0,5 ml, koncentrációja 10–600 ezer spermium mm^3 -enként. A phallus fejlettsége és az ondótermelés intenzitása között kifejezett pozitív korreláció van ($r=0,57-0,76$). Az ábrán az egyedi eltéréseket láthatjuk 3, különböző genotípusú gúnárcsoport spermatermelésében.

A gúnarak ondótermelésében nagymértékű heterogenitás tapasztalható, emellett pedig csak részben alkalmasak mesterséges ondóvételre. Egyes megfigyelések szerint 20–30%-uk, mások szerint viszont a gúnarak 60%-a képes folyamatosan megfelelő mennyiségű, és minőségű ondó leadására. Az adatok arra utalnak, hogy a fajták között jelentős különbségek vannak a masszálásra adott pozitív reakció és a leadott ejakulátum mennyiségét tekintve.

Etológiai sajátosságok: A házilúd őse a nyári lúd monogám, párkapcsolatban él. Ezt a tulajdonságot a szelekció eltüntette ugyan, a tojókhoz való ragaszkodás azonban fennmaradt. A gúnarak rendszerint mindig ugyanazokkal a tojókkal párosodnak még akkor is, ha termékenyítő képességük valamilyen oknál fogva (pl. phallussérülés, illetve -gyulladás) korlátozott vagy megszűnt.

Az *udvarlási és párzási* rituálé a házilúd szaporodásának fontos mozzanata, amelyben a tojó aktív szerepet játszik. Az eredményes párzást udvarlási szakasz előzi meg. Ehhez nyugodt környezetre van szükség. Ennek hiányában a folyamat megszakadhat, az állatok idegesek lesznek, ami eredménytelen párzáshoz vezet. Végső soron hibás szexuális magatartásformák (egymás phallusának csipkedése, homoszexualitás stb.) alakulhatnak ki.

A termékenységet befolyásoló tényezők: A termékenység alakulása 85–95%-ban környezetfüggő. Ezért keresnek a kutatók jól öröklődő, a termékenységet befolyásoló értékmerő tulajdonságokat, amelyek segítségével közvetett úton javítani lehetne azt. Ilyen lehetne az ejakulátum mennyisége, koncentrációja és a spermiumok vitalitása. A jó spermatermelő egyedek azonban nem feltétlenül a legjobb termékenyítők is, mert párzási és ivari aktivitásuk is jelentős befolyásoló tényező. A spermatermelésre folytatott szelekció ezért csak a mesterséges termékenyítés használatával együtt lehet eredményes.

A termékenységet számos tényező befolyásolja, melyek közül a legfontosabbak a következők:

- a tenyészludak típusa és a tenyésztési módszer;
- az életkor és a termelésben eltöltött idő;
- a tartási körülmények (a hőmérséklet, a megvilágítás tartama, a tartási mód);
- a takarmányozás;
- az egészségi állapot.

Tenyésztési módszerek: A termékenység a kistestű, szaporaságra szelektált genotípusokban kedvezőbb, mint a nagytestű fajtáknál.

Az alapvető probléma a lúdfajra is jellemző tenyésztési eljárásból adódik, aminek következtében a gúnár a tojótól eltérő — esetenként jelentősen különböző — genotípusává válik. Minél inkább eltávolodik egymástól a két vonal, azaz minél sikeresebb a tenyésztői munka, annál nagyobb lesz a szülőpártojó és hímivar közötti különbség, amelyre a legszélsőségesebb példa a pulyka.

Az életkor és a termelésben eltöltött idő: A termékenység a gúnarak életkorával összefüggésben sajátosan változik (Csuka és Ledec, 1984). Az első év-

ben a legalacsonyabb, két-három éves korban éri el a csúcspontját, majd a harmadik év után számottevően hanyatlak (*Lukaszewicz és mtsai, 2000*).

A *klimatikus tényezők* termékenységre gyakorolt hatása viszonylag kevésbé ismert. A környezet hőmérséklete tekintetében megállapították, hogy a gúnarak párási aktivitása -2°C alatt és $+25^{\circ}\text{C}$ fölött észrevehetően visszaesik. A nagy melegben romlik a spermatermelő képesség is, ezért a nyári tojástermelés folyamán a kielégítő termékenység elérésének elengedhetetlen feltétele a hűtött istálló.

A *megvilágítással* szemben a gúnarak a tojókétól eltérő igényeket támasztanak. A termékenység szempontjából döntő fontosságú a megfelelő fénytartam és -intenzitás, mert a gúnarak által termelt ondó mennyiségét és minőségét, valamint párási aktivitásukat alapvetően befolyásolja (*Sellier és mtsai, 1995*).

A *tartásforma*: A szociális stresszre rendkívül érzékenyen reagáló lúd termékenységét a *csoporthagyomány* és az *állományűrűség* növelése egyértelműen kedvezőtlenül befolyásolja. A kis falkahagyomány (250–300) kialakítása és az összeszokott állatok keveredésének megakadályozása egyaránt fontos a jó termékenység elérése szempontjából (*Nitsan és mtsai, 1988*).

A *takarmányozás*: Alapvető fontosságú a termékenység színvonalának fenntartásában. *Mennyisége* nagy hatással van a tenyészkonfókóra. A takarmányok *minőségi* mutatói közül annak fehérje-, energia-, vitamin- és ásványianyag-tartalma a legjelentősebb. A vitaminok közül nagy fontosságú az E-vitamin, hiánya hereszövet-degenerációt okoz. Termékenységi probléma A-vitamin hiánya esetén is előadódhat. A termelési időszakban nyújtott rendszeres vitamin-kiegészítéssel a problémák megelőzhetők.

Teljes terméketlenséghez vezethet az ösztrogénhormon-hatású fusarioxin, a *zearalenon (F-2 toxin)* tartós felvétele. A gúnarak spermatermelése leáll, a herék elsovadnak.

A *betegségek* szintén okozhatnak termékenységromlást, különösen a phallusgyulladás (*Dobos-Kovács, 2000*). Az utóbbi években jelent meg az a kórokozó jelenlétére utaló elváltozás, amelynek a termékenység szempontjából legjelentősebb fejleménye a fibrines felrakódás a petevezető falán. Hatására a termékenység drámaian csökken és mesterséges termékenyítéssel sem javítható, feltehetően annak következtében, hogy a spermiumok nem képesek a tölcseréig felhatolni. Az esetenként jelentős elhullással járó betegség kóroki hátterét eddig nem sikerült megnyugtatóan tisztázni.

A *termékenységi problémák* jelentkezése esetén mindenképp a gúnarak phallusának vizsgálata szükséges. Phallusgyulladás, illetve -sérülés diagnosztizálása esetén a beteg gúnarakat emeljük ki. A zárt tartásban, nyáron termelő lúdállomány termékenysége az istálló hűtésével és a fényintenzitás emelésével jelentősen javítható. A tartástechnológiai beavatkozások sikertelensége készíthet a mesterséges termékenyítés bevezetésére.

A *mesterséges termékenyítés lépései*: A gúnarakat külön istállóban helyezük el. Fontos az istálló hőszigeteltsége és — főként a nyári ciklusú spermatermelésre használt állomány számára — az épület hűthetősége. Tapasztalataink szerint a gúnarak jól tűrik a téli hideget, a nyári forróságra azonban a spermatermelésük teljes megszűnésével is reagálhatnak.

A gúnarakat egyedi ketrecben helyeztük el, ugyanis így nagyobb mennyiségű és koncentráltabb ejakulátumot nyerhetünk tőlük. Az egyedi elhelyezés mellett a gúnarak a tojókkal mindvégig hang és vizuális kontaktusban voltak. Ezen tényező a spermatermelés elindulásához szükséges 4–5 hetet 1 héttel lerövidítette.

Megvilágítás: A gúnarak igénye a fény tartama és intenzitása tekintetében tojókétól eltér. A jó spermatermelés és termékenység optimális fénytartamát a vizsgálatok 10 és 13 óra közé helyezik (*Sellier és mtsai*, 1995), amely valamivel hosszabb, mint a tojástermelésé (9 óra). A gúnarak nagyobb fényintenzitást is kívánnak, ennek értéke genotípustól függően 60–100 lux is lehet (a tojóké általában 40–60 lux).

A gúnarak szelektálása: Mesterséges spermavételre a gúnaraknak csak mintegy 50–70%-a alkalmas. A fehér olasz gúnarak 60–70%-a, a bütykös lúd 90%-a jól reagál a masszálással történő ondóvételekre, de csak 30, illetve 50%-uk ad megfelelő minőségű ejakulátumot (*Lukaszewicz és mtsai*, 2000; *Nickolova és Guerzilov*, 2000; *Kisné és Hargatai*, 1995). Adott fajtán belül az egyedek között is jelentős eltérés lehet a tulajdonságot illetően, és így mind a spermavolumenre, -minőségre, mind az ondóleadási képességre eredményesen lehet szelektálni. A válogatás történhet napos korban, illetve felnőtt állományból. A naposok közül a legjobban fejlett egyedeket vesszük ki, a tervezett mennyiség mintegy ötszörösét. A fiatal madarakat speciális takarmányozási és tartási technológiával neveljük fel és az állományt 3-4 alkalommal újraszelektáljuk.

Felnőtt állomány esetén a gúnarakat az 1–3 évesek közül válogatjuk ki az alábbi szempontok alapján:

- Pozitív reakció a dorso-abdominális masszálásra (farktollak emelése, 10–15 masszírozás után duzzadt, jól kitapintható phallus, erekció, ejakuláció).
- Nyugodt vérmérséklet.
- Phallus hosszúsága, épsége (aktív állapotban 50–80 mm).
- Testsúly (genotípusra, életkorra jellemző).
- Spermaminőség és -mennyiség, folyamatos spermatermelés.

A gúnarak kiválogatása 1 héttel, illetve néhány nappal a tojókkal való özszeengedés előtt történik. A gúnarak előkészítését a tojókkal párhuzamosan de külön istállóban végezzük. A megvilágított órák száma egyforma a tojók és a gúnarak esetében, intenzitása azonban a gúnaraknál magasabb.

A válogatás során a tervezett gúnarmennyiség 140%-át (1 éves madaraknál) illetve 120%-át (2–3 éves madaraknál) helyeztük egyedi ketrecekbe. A tréning heti 2 alkalommal történik. Ezen időszak alatt nagyon fontos a stresszmentes környezet. Ennek biztosításához kívánatos, hogy mindig ugyanazok a személyek tartózkodjanak a gúnarak közelében (*Behr és Hartmann*, 1992). Ilyen feltételek mellett a jó minőségű sperma termelése 4–5 héten belül megindul.

Ondóvétel, ondóvizsgálat: A spermasejtekéréséhez szükséges időt figyelembe véve a heti kétszeri ondóvétel ajánlott 72 órás különbségekkel, de egyes adatok szerint a heti háromszori gyűjtést sem káros (*Lukaszewicz és mtsai*, 2000). A heti kétszeri gyűjtést találtuk megfelelőnek, amelyet mindig ugyanazo-

kon a napokon és lehetőség szerint a reggeli órákban végeztünk. Szennyeződésmentes ondó nyerése céljából, a gúnarokat 12 órát koplaltattuk a gyűjtés előtt. A mesterséges termékenyítéshez használt gúnarok számára kialakított takarmányban előnyös, ha az A-, E-, és B2-vitamin-tartalmat a szokásos 1,5–2-szeresére emeljük. Pozitív hatású a spermaminőségre a szerves szelén adagolása is (*Kurbatov és mtsai, 1976*).

Az ondóvételt két, állandó személy végzi. Az ejakulátum felfogására egy erre a célra kifejlesztett, üvegből készült műhüvelyt használtunk. A masszálásra jól reagáló gúnaraktól már az első alkalommal ki tudtuk váltani az erekciót és az ejakulációt. Ha egy madár 4–5 alkalommal sem mutatott pozitív reakciót azt kizártuk a programból. Az ejakulációt követően, a phallus elernyedése után, lehetőség van további masszírozásra, amelynek során a párzás során ki nem használt ondómennyiség nyerhető. Mesterséges ondóvételtkor gyakran több plazmaszűrlet is préselődik ki, mint a párzáskor, ami hátrányos a spermasejtek vitalitására.

Fontos, hogy a gyűjtés fél óránál tovább ne tartson, mert a spermiumok nagyon gyorsan felélik energia-tartalékaikat, amely termékenyítő képességük csökkenését okozhatja (*Grunder és Pawluczuk, 1991*).

Üzemi körülmények között a levett ejakulátumok ún. ondókeverékbe kerülnek, amelybe nem kerülhet bélsártól, vértől, húgysavtól szennyezett, sárgás színeződésű ondó. A keveréket a továbbiakban mikroszkóppal vizsgáljuk, melynek során a spermiumok motilitását és életképességét mérjük fel. Az ondókeverék hígítását koncentrációtól függően végezzük, általában 1:1 arányban. Mindezen vizsgálatok 10–15 percnél több időt nem vehetnek igénybe, a termékenyítést amilyen gyorsan csak lehet, végrehajtjuk.

A tojók termékenyítése: A mesterséges termékenyítés egyik nagy előnye, hogy az ivararány tágítható, a gúnarok spermatermelésétől függően 1:5-től akár 1:15-ig is. Jelenleg a tojók termékenyítésére vonatkozóan a kifordításos és a benyúlásos módszer szerint járhatunk el. A ludakra a benyúlásos módszert találtuk a legmegfelelőbbnek. A termékenyítést 15–20 millió élő spermium/tojó adaggal végezzük, amely elegendőnek bizonyul a termékenységi magas szinten tartásához.

Az inszemináláshoz speciális pisztolyt és eldobható műszalmát használunk. Figyelembe véve a benyúlásos módszer állategészségügyi kockázatát fontos a kéz és a műszalma fertőtlenítése minden egyes tojó után.

Az általunk alkalmazott módszer nagyüzemi körülmények között is eredményesen működik. A termékenységet rátermékenyítéssel (tojóállomány + gúnarok) 95%-ig, csak mesterséges termékenyítéssel (tojók gúnarok nélkül) 92%-ig tudtuk felvinni.

IRODALOM

- Behr, K. – Hartmann, U.*(1992): Artificial insemination of geese under field conditions. Proc. 9th International Symposium On Waterfowl. Pisa, Italy, 112–114.
- Bogenfürst, F.*(1992): Lúdtenyésztők kézikönyve. Új Nap Lap- és Könyvkiadó, Budapest
- Chelmonska, B. – Lukaszewicz, E.*(1995) Current state and future of artificial insemination in waterfowl. Proc. 10th European Symposium On Waterfowl. Halle, Germany, 225–240.

- Csuka, J. – Ledec, M.*(1984). The development and correlations of reproductive performance of ganders in the course of three years. *Zivocisna-Vyroba*, 29. 7. 635–640.
- Dobos-Kovács, M.*(2000): A gúnár phallus gyulladásáról. I.–II. *Baromfi*, 3. 1. 78–86.; 2. 80–82.
- Grunder, A.A. – Pawluczuk, B.*(1991): Comparison of procedures for collecting semen from ganders and inseminating geese. *Poult. Sci.*, 70. 1975–1980.
- Johnson, A.S.*(1954). Artificial insemination and duration of fertility of geese. *Poult. Sci.*, 33. 638–640.
- Kisné, X. – Hargitai, Cs.*(1995): A lúd mesterséges termékenyítésének gyakorlati tapasztalatai. *Magyar Áo. Lapja*, 50. 344–347.
- Kurbatov, A.D. – Tsarenko, R.G. – Popov, I.I.*(1976): Improving of AI in geese. 8th Int. Cong. Anim. Repr. Al. Krakow, Poland, 4.1009–1012.
- Lukaszewicz, E. – Furuta, H. – Xi, Y.M. – Fujihara, N.*(2000): Comparative study on semen quality of one and two-year old ganders during the entire reproductive season. *Asian J. Andrology* 2. 139–142.
- Nickolova, M. – Guerzilov, V.*(2000): Sperm characteristics of Landes and Benkovsky White Ganders during the first and the second reproductive years. *Int. Conf.*, Taiwan, 181–187.
- Nitsan, Z. – Nir, I. – Dvorin, A.*(1988): Reproductive performance of laying geese kept on flocks or in individual pens. *International Symposium On Waterfowl Production, The Satellite Conference for the XVIII WPC*, Beijing, China, 278–280.
- Sellier, N. – Roussetot-Pailley, D. – De Reviers, M.*(1995): Artificial insemination of Landes geese: current position and prospects. *Productions-Animales*, 2. 127–133.

Szerző címe: Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar
Authors' address: University of Kaposvár, Faculty of Animal Science
H-7401 Kaposvár, Pf. 16.

MATERNÁLIS STRESSZ HATÁSA A SZIKBE DEPONÁLT SZTEROIDOKRA ÉS AZ UTÓDOK SZOMATIKUS TULAJDONSÁGAIRA TŐKÉS RÉCÉBEN (ANAS PLATYRYNCHOS)

SZŐKE ZSUZSANNA — FERENCZI SZILAMÉR —
ÁDÁM DÓRA — BICZÓ ANDRÁS — PÉCZELY PÉTER

ÖSSZEFOGLALÁS

Emlősök és humán vonatkozásban jól ismert az, hogy az anyát ért stresszhatások az intrauterin fejlődés élettani sajátosságai miatt áttevődnek a fejlődő magzatra, és annak fejlődését több szinten is károsítják.

A vizsgálatokban egy madár modell, a tőkés réce esetében kétféle kezelést alkalmaztak. Egyrészt a stresszor, a handling terhelés volt, melyet rövid időintervallumon belül, többszöri kézbevételel valóstították meg. Másrészt éter-inhalációt alkalmaztak, melyet követően a vérplazma kortikoszteron koncentrációja 10–15 perc múlva szignifikánsan emelkedik.

Az eredmények azt mutatják, hogy a handling-stresszt követően a kezelt csoportban tojástermelés rövid idejű visszaesését követően nő a tojástömeg, viszont a megnövekedett tojásokból csökken a kikelő utódok száma. A kezelt csoport hímivarú embriót tartalmazó tojásainak szikanyagában a tesztoszteron koncentráció szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll csoportban. A szik 17- β -ösztradiol koncentrációjában nem volt különbség a csoportok között. A kikelt, életképes kiskacsák testsúlyukat tekintve megegyeztek a kontrollal, de egy hetes korukban a kezelt csoport utódai szignifikánsan kisebbek voltak. Ez a hátrányuk megmarad a juvenilis vedlés kezdetéig. A kezelt csoport utódai viszont gyorsabban és többnyire egyszerre fejezték be a vedlésüket és így a 12. élethéten már utoléri, sőt a gácsérok tekintetében el is hagyják a kontroll csoportba tartozó társaikat.

Az éter-inhalációt követően is megfigyelhető volt egy kismértékű tojásprodukciónak csökkenés, valamint egy rövidebb idejű tojástömeg emelkedés. A kelési százalék itt is alacsonyabb és a naposkori testsúly is elmaradt a kontrollhoz képest, viszont a 4. élethéten már utolérte a kontroll csoportot.

SUMMARY

Szőke, Zs. Ms. – Ferenczi, Sz. – Ádám, D. Ms. – Biczó, A. – Péczely, P.: EFFECT OF MATERNAL STRESS ON YOLK STEROIDS AND ON SOMATIC PARAMETERS OF OFFSPRINGS IN MALLARD (ANAS PLATYRYNCHOS)

Two types of stress were used in female mallards to study the steroid deposition into the yolk and some somatic parameters of F1 generation. As an effect of the handling stress the egg-production showed a transitory decrease and the weight of eggs was higher relatively to the control group. In the eggs containing male embryos of the handling stress effected group the testosterone concentration of the yolk was higher than in the control eggs. The yolk concentrations of E2 didn't show any differences between the treated and control groups. The hatching success of the eggs with increased weight laid by the treated ducks was lower and the ducklings were significantly smaller in one-week's age. The ducklings of the de-treated mothers showed a faster juvenile moulting and at the end of this process their weight was similar in females and higher in the case of males relatively to the control ones. Ether-stress resulted in a decrease of hatching percent, too, and the one-day's old body weight was lower.

BEVEZETÉS

Madaraknál sokáig általánosan elfogadott volt az, hogy az utódra gyakorolt „szülői hatásokat” csupán a genetikai információátadás jelenti és „normális összetételű” tojás esetében egészséges utódra számíthatunk. Ez más szóval azt jelentené, hogy az emlősöknél igazolt epigenetikus, intrauterinális hatások az ovipara madárban nem jelentkeznek. Ebben az elméletben hozott alapvető áttörést Schwabl (1993) megállapítása, hogy a tojás szikanyagában RIA-val jól mérhető mennyiségű szexuáliszteroidok és kortikoszteron található. Ezek mennyisége változónak tűnt, például kiderült, hogy a kanári (*Serinus canaria*) tojásaiban a tesztoszteron mennyiség fokozatosan nőtt a lerakott tojások számával. A feltevés szerint a növekvő szteroid koncentráció kompenzálja a később lerakott tojás és utód „hátrányosabb” helyzetét, valamint a kelés szinkronizálásához is hozzájárul, emellett a szik tesztoszteron tartalma és a kikelt fiókák agresszivitása és életrevalósága között határozott pozitív összefüggés volt kimutatható (Eising és mtsai, 2001).

Valószínűsíthető, hogy a tojó képes befolyásolni a tojásszik szteroid tartalmát, pl. annak megfelelően, hogy a számára attraktívabb hímmel párosodik, vagy sem. Amennyiben egy domináns és „vonzó” hím lesz a párja akkor, pl. a tőkés récénél megfigyelhető nagyobb méretű tojások rakása, emellett a tojás szikanyagában jóval magasabb koncentrációban jelennek meg az androgének (Gil és mtsai, 1999; Cunningham és Russell, 2000). A nagyobb tojásba több nutritív és más biológiailag aktív anyag is kerül, amelyek elősegíthetik az utód nagyobb rátermettségét, jobb túlélési esélyét. Zebrapintyek esetében figyelték meg, hogy attraktív hímmel való párosodást követően a lerakott tojásokban magasabb androgén koncentráció volt (tesztoszteron, androszténdion és 5 α -dihidrotesztoszteron). Az utódok ivarmegoszlását is érintheti az irányított szexuál szteroid depozíció, mert ha több androgén kerül a tojás szikanyagába, akkor ez hatással lehet arra, hogy az első poláros testbe Z vagy W ivari kromoszóma fog-e kerülni (Petrie és mtsai, 2001).

Ez a néhány adat is arra utal, hogy madarak esetében is fennáll az utód maternális eredetű epigenetikus „befolyásolásának” lehetősége. Sőt nem kizárt az, hogy a tojásszám modulációja, illetve a fészekalj egy részének sokszor nehezen megmagyarázható pusztulása arra lenne visszavezethető, hogy a tojó egyfajta adaptációs stratégiát alkalmazva befolyásolni képes az utódszámot és ezen keresztül javítja egy teljes populáció életben maradásának esélyeit (Sasvári és mtsai, 1999,2001).

Az utódvizsgálatoknál felmerül a kérdés, hogy a tojót ért stresszhatások hogyan befolyásolják a következő nemzedéket. Az emlősöknél már régóta ismert, hogy ha egy vemhes nősténynél glükokortikoid kezelést alkalmazunk, akkor az utód(ok) születési testtömege szignifikánsan alacsonyabb lesz, mint a kontroll csoportban (Seckl, 2001). Ismert, hogy a reprodukciós ráta jóval alacsonyabb a szubordinált hímekkel történt párosodást követően, mivel a rangsorért folytatott harcban történt alulmaradás a glükokortikoid koncentráció növekedését okozza, amely szupresszálja a hím reprodukciós kapacitását (Creel, 2001). A domináns egyedek plazmájában az alap glükokortikoid érték magasabb, mint a szubordinált egyedeknél, de egy szociális rangsorért vívott harc

után a szupresszált egyedekben magasabb glükokortikoid szintet lehet kimutatni, mint a domináns egyedekben. (Creel, 2001). A kanárinál is hasonló jelenséget figyeltek meg: a fiatalabb fiókákra alacsonyabb alap kortikoszteron szint jellemző, mint az idősebb, domináns testvérekre, de ennek ellenére ezek a fiókák kisebbek, gyengébb kondícióval bírnak. Ezt a jelenséget az eltérő tesztoszteron depozíció okozhatja: a tojó az első tojásba rakja a legkevesebb tesztoszteront, majd az ezt követő tojásokba fokozatosan emeli a deponált androgén koncentrációt. Az embrionális kori magas tesztoszteron koncentráció „enyhíti” a kelés aszinkronitását negatív hatását, mivel fokozza a fiókák „táplálékoldulós magatartását” és ez által növeli a kondíciójukat (Schwabl, 1996). A két tojást rakó kéklábú szuláknál az idősebb fióka domináns a fiatalabb, subordinálttal szemben. A szupresszált fiókában magasabb alap kortikoszteron érték mérhető, amelyet valószínűleg a domináns testvérnek való folyamatos alárendeltség eredményez, és ennek következtében csökken a fiatalabb fióka kondíciója (Nuñez-de la Mora és mtsai, 1996)

A tojás szikanyagának szteroid tartalmát több tényező határozhatja meg: a fejlődő embrió ivardeterminációja, a tojó párjának „minősége”, valamint a környezeti viszonyok a költési időszakban. A 10 napig inkubált hím embrió esetében a tesztoszteron és az androsztendion, míg hasonló korú nőivarú embrióknál a $17\text{-}\beta$ -ösztradiol és az $5\text{-}\alpha$ -dihydrotesztoszteron koncentrációja magasabb a szikben (Petrie és mtsai, 2001). Fontos kérdés az, hogy az embrió szteroid termelését az inkubáció hányadik napjától lehet figyelembe venni, hogy reális képet nyerjünk a maternális eredetű szteroidok koncentrációjáról. Gilbert 1971-ben közölt vizsgálatai szerint az embrió ivarmirigyeknek szteroid termelése jóval a szöveti differenciálódás előtt kialakul. A gonád-kezdeményekben az inkubáció második napján, már a petefészek és a here szöveti szerkezetének elkülönülése előtt $\Delta^5\text{-}3\beta$ -hidroxyszteroid-dehidrogenáz aktivitás mutatható ki. A hatodik napon ösztrogéneket, a nyolc-tíz napos csirkeembrió ivarmirigyeiben pedig androgéneket, ösztrogéneket és progeszteront mutattak ki (Péczely, 1987).

Fejlődő madár embriókban az ivardetermináció és ivari differenciálódás kapcsolata a deponált szexuálszteroid és az embrió szteroid produkciójával kevésbé ismert, mint emlősökben. Madarak esetében az oocyta első meiotikus osztódása, a szik beépülése után, az ovuláció előtt pár órával megy végbe, és e folyamat során az egyik szex-kromoszóma a poláris testbe vándorol meghatározva ezzel a tojásban fejlődő embrió ivarát. Tehát valószínű, hogy nem a tojó deponál a kialakuló embrió ivarának megfelelő mennyiségű szteroidot a tojásba, hanem feltehetően az anyai szteroidok befolyásolják a szex-kromoszóma szegregációját az első meiotikus osztódás folyamán (Petrie és mtsai, 2001)

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatainkat egy éves tőkés récéken végeztük, melyeket szabad kifutós ólakban helyeztünk el. Az állatok számára a kacsza tojótáp, mézskőgritt és az átfolyó rendszerben biztosított víz ad libitum rendelkezésükre állt. A kezelt és kontroll csoportban is 15 tojó és 10 gácsér volt, az esetleges termékenyülési

problémák elkerülése érdekében nem a 3:1 ivararányt alkalmaztuk. A tojásokat 7 naponként raktuk be a Gergely-féle keltetőbe.

Kétféle kezelést alkalmaztunk. Az először stresszorként a handling kezelést alkalmaztuk, melyet rövid időintervallumon belül, kézbevitellel, a tojók négyeszer áthelyezésével valósítottunk meg, majd a negyedik áthelyezést követően vért vettünk a szárnyvénából. A másodikban éter-inhalációt alkalmaztunk.

A kísérleti protokollt az 1. táblázat tartalmazza, a handling stresszt kétszer ismételtük, mely 2002. április 9-én kezdődött és teljesen megegyezik a handling-I-nél alkalmazottakkal

1. táblázat

Handling- és éter stressz kísérleti protokoll

Handling-stressz		Éter-stressz	
03.19 – 03. 21.	03.22 – 04. 01	05.07– 08	05. 09. – 05. 20.
faeces gyűjtés(1): 10 h; 14 h; 18 h	F: 10 h	faeces gyűjtés(1): 10 h; 14 h; 18 h	F: 10 h
Tojásgyűjtés keltetésre 03. 21-től napi 1–3 db tojás 84 órás inkubálás szik analízis és embrió szexálás(2)		Tojásgyűjtés keltetésre 05. 09-től napi 1–3 db tojás 84 órás inkubálás szik analízis és embrió szexálás(2)	

Table 1: Experimental protocol of handling and ether-stress faeces collection(1), egg collection for hatching from 21.03 or 09.05. and 84 hours incubation of 1–3 egg/day for yolk analysis and embryo sexing(2)

A biopszia során a szikból a tesztoszteront (T) és 17-β-ösztradiolt (E2) Radio Immuno Assay módszerrel határoztuk meg. A tojásszikból való szteroid kinyeréshez a Schwabl-féle dietil-éteres extrakciót alkalmaztuk, melyet 0,5%-os Triton-X-100 emulgeálással egészítettük ki. Az extrakciót követő visszanyerést ³H-tesztoszteron hozzáadásával mértük, átlagos visszanyerés: 74,63% volt. A RIA E2 és T esetében is 2,5 mg-ból történt.

A minták statisztikai analízisét Student-féle t-teszttel végeztük. A biopsziás vizsgálat során a 8 napig inkubált tojásokból eltávolítottuk az embriót és Chelex 100 (Bio-Rad) extrakcióval genomiális DNS-t izoláltunk (Walsh és mtsai., 1991). Ezt követően a mintából 2 mikroliter használtunk a PCR reakcióhoz a következő feltételek mellett:

— reakciótérfogat 50 mikroliter, reakciómix tartalmaz: 0,2 mM mindegyik dNTP-ből, 40 pM mindegyik primerből, 2,5 unit Taq polimeráz (PROMEGA), 2,5 mM MgCl₂, 5 mikroliter 10 x PCR puffer (PROMEGA)

— PCR primerek: a szexáláshoz használt két primer párt Itoh és mtsai. (2001) által végzett kísérletek alapján terveztük.

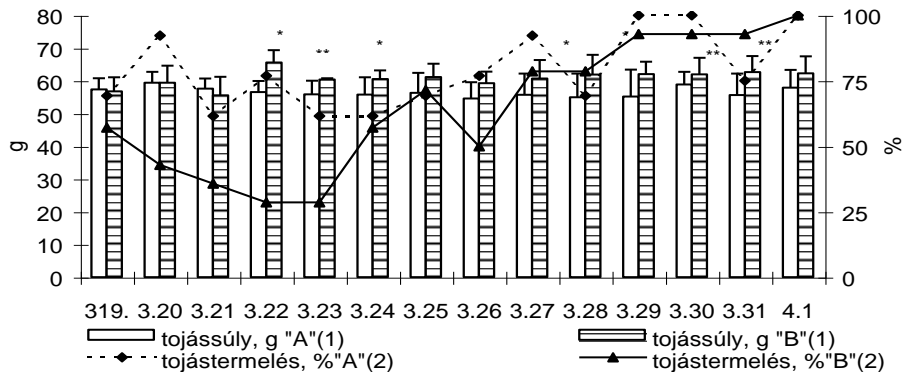
— PCR körülmények: 95 °C, 5 perc
 95 °C, 80 másodperc
 56 °C, 90 másodperc
 72 °C, 60 másodperc
 72 °C, 5 perc
 } 35 ciklus

A PCR reakciót Perkin Elmer Gene Amp 2700-as típusú készülékkel végeztük. A kapott termékeket 2 v/w %-os agaróz gélen választottuk el 1X TBE pufferben. Ezt követően etidium bromiddal festettük a PCR termékeket.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A két handling-stressz kezelést követően a kezelt csoportban a tojástermelés rövid idejű visszaesését figyelhetjük meg különösen az első kezelést követő 4–5. napon, ezzel párhuzamosan emelkedik a tojássúly: átlagban mintegy 7%-kal, (1. és 2. ábra) és ez a megnövekedett súly a vizsgált periódusban mindvégig megfigyelhető volt. A nagyobb súlyú tojásokból a kikelő utódok száma csökkent (2. táblázat).

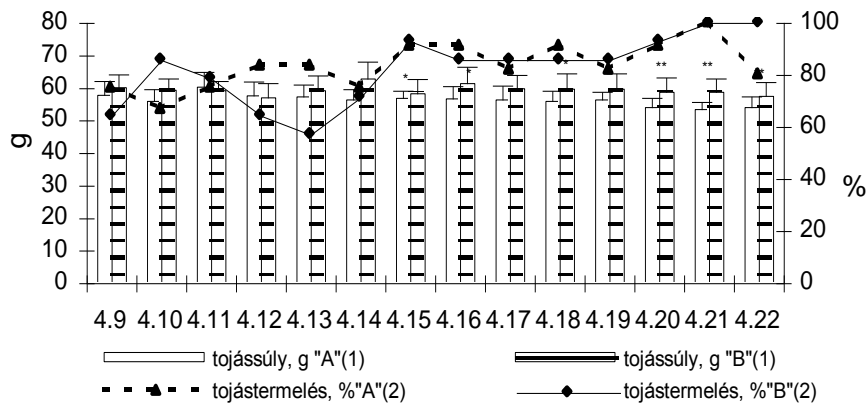
1. ábra A handling stressz (I.) hatására a tojástermelés és tojástömeg változásai a két csoportban



*=P<0,05 **=P<0,001 „A”: kontroll csoport „B”: kezelt csoport

Fig. 1: Effect of Handling stress-I on persistence and egg-weight in both group egg weight(1), egg production(2), control group(3), treatment(4)

2. ábra A handling stressz (II.) hatására a tojástermelés és tojássúly változásai a két csoportban



*=:P<0,05 **=P<0,001

Fig. 2.: Effect of Handling stress-II on persistence and egg-weight in both group egg weight(1), egg production(2)

Kétszeresére emelkedett az embrióelhalás (korai elhalás a keltetés 7–10. napján), a második elhalási csúcst pedig a 21. nap körül kaptuk, de itt már kisebb a különbség a kontrollhoz képest. A befulladás mértéke mindkét csoportban azonosan alakult. A stresszírozott madarak tojásaiban magasabb T koncentrációt találtunk és jellemző volt az, hogy ebben a csoportban a fiókák tömeges kelése mintegy 12–24 órával megelőzte a kontroll csoportot. Ez a megfigyelésünk megegyezik *Eising és mtsai* (2001) közlésével.

2. táblázat

A kelés alakulása a két csoportban, %

Handling stressz I.		Handling stressz II.		Éter stressz	
kontroll „A”(1)	kezelt „B”(2)	kontroll „A”(1)	kezelt „B”(2)	kontroll „A”(1)	kezelt „B”(2)
83,14	60,11	76,32	57,50	62,40	44,61

Table 2.: The hatching percent in both group control(1), treatment(2)

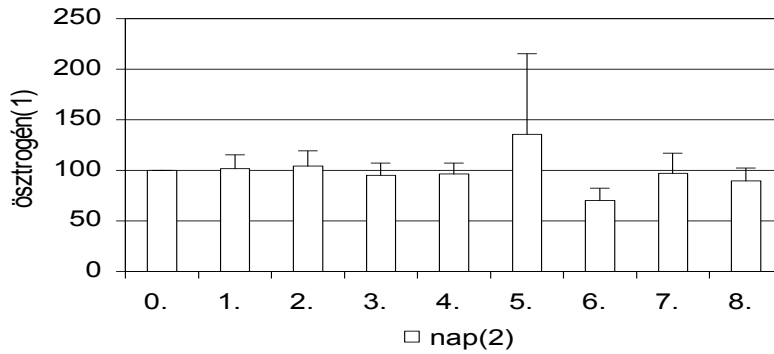
A tojó által deponált T és E2 mennyiségének és az embrionális felvétel ellenőrzésére megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a szikben ezen szteroidok koncentrációja az inkubáció során. 3,5 napig inkubáltuk a tojásokat, mivel ekkor már az embrió tökéletesen kiperarálható volt. Másrészt folyamatos biopsziával ellenőriztük a szik szteroid tartalmának esetleges változását, hogy megállapítsuk, hogy a 3,5 napos szikben levő szteroid koncentráció tükrözi-e az „anyai befektetést”. Az irodalmi adatok szerint ugyanis 10 napig inkubált páva embriókból történt a PCR alapú ivar-meghatározás és ugyanakkor a „megmaradt” szik szteroid tartalmából következtettek a tojó által deponált szteroid koncentrációra (*Petrie és mtsai*, 2001).

A tojásokból inkubálás előtt vett szikminták szteroid koncentrációit vettük száz százalékknak, ehhez viszonyítottuk a keltetés különböző napjain mért értékeket és ezt százalékban fejeztük ki (24 óránként történt a mintavétel, n=15).

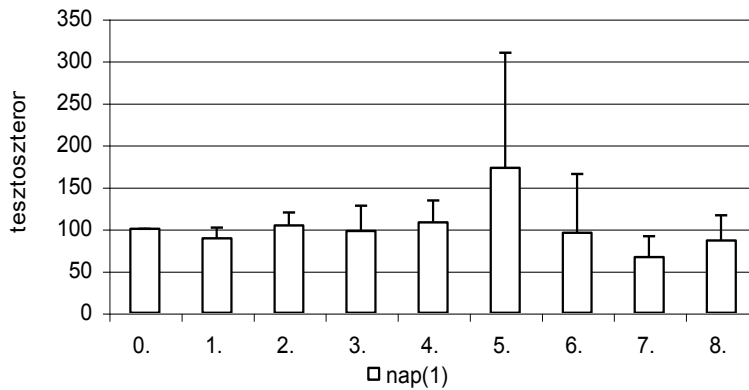
Eredményeink azt mutatják, hogy a keltetés 4. napjáig nem történt jelentős változás a szik T és E2 koncentrációját tekintve, de az 5. napon mindkét szteroid esetében jelentős koncentráció változás volt megfigyelhető (3. és 4. ábra). Összességében megállapítható, hogy az általunk használt 3,5 napig inkubált tojás szteroid koncentrációi még jól tükrözik a tojó által deponált mennyiséget.

Megállapítható, hogy mind a kontroll, mind a kezelt csoportokban hímváru embriót tartalmazó tojás szikanyagában magasabb a T koncentráció, mint a nőivarú embriót tartalmazó tojásokban. A stresszírozott tojók nagyobb tömegű tojásaiban a hím ivarú embrióknál magasabb a T koncentráció, mint a kontroll hímeknél. A nőivarú embriót tartalmazó tojásokban mind a kezelt, mind a kontroll csoportban alacsonyabb E2 koncentrációt találtunk. Az E2 koncentráció nem tért el a kezelt és kontroll csoportok között. Ezek a megállapításaink alátámasztják *Gil és mtsai* (1999) és *Cunningham és Russell* (2000) eredményeit, akik szerint az attraktívabb hímmel párosodó tőkés récék nagyobb tojásokat raktak és ezek szikanyagában több androgén volt.

3. ábra: Az ösztrogén koncentráció változása a keltetés első 8 napjában

Fig 3.: Changes of oestrogene concentration during 0–8 days of incubation
oestrogene(1), days(2)

4. ábra: A tesztoszteron koncentráció változása a keltetés első 8 napjában

Fig. 4.: Changes of testosterone concentration during 0-8 days of incubation
days(1)

3. táblázat

A tojásszék szteroid koncentrációja kontroll és „Handling I.” csoportokban ng/g

Kontroll tesztoszteron(1)	♀ (n=13) ♂ (n=16)	13,58±0,66 ^b 20,45±5,6 ^{ab}
Kezelt tesztoszteron(2)	♀ (n=11) ♂ (n=14)	11,59±1,36 ^c 27,45±1,09 ^{ac}
Kontroll ösztrogén 17-β-ösztradiol(1)	♀ (n=13) ♂ (n=16)	2,26±0,17 ^d 3,83±0,34 ^d
Kezelt ösztrogén 17-β-ösztradiol(2)	♀ (n=11) ♂ (n=14)	2,12±0,14 ^e 3,53±0,37 ^e

^a=P<0,05; ^{b,c,d,e}=P<0,001Table 3.: Yolk steroid concentrations in control and „Handling-I” groups
control(1), treatment(2)

Az életképes naposkacsák testsúlya azonos volt a kontroll és a kezelt csoportban, de egyhetes korban a kezelt csoport utódai szignifikánsan kisebbek voltak, mint a kontroll utódok (5. táblázat). Ez a hátrányuk csak a juvenilis vedlés kezdetéig maradt meg, ugyanis a kezelt csoport utódai gyorsabban és többnyire egyszerre fejezték be a vedlésüket és így a 12. élethétén már utolérték, sőt a gácsérok el is hagyták a kontroll csoportba tartozó társaikat a testsúly tekintetében. A vedlés során bekövetkező testtömeg-csökkenés a kontroll csoportban kifejezettebb volt.

4. táblázat

Az utódok testsúlyának alakulása a handling- illetve az éter stresszt követően

	Napos(1)	1. hetes(2)	4. hetes(2)	8. hetes(2)	12. hetes(2)	
					♀	♂
A maternális <i>handling</i> stresszt követő F1, g(3)	33,19±4,50	120,5±16,9 ^c	614,7±98,8	1031,3±197,8	895,0±220,1	1121,8±135,1 ^d
Kontroll csoport, g(4)	32,79±4,26	130,4±14,8 ^c	646,7±74,3	1092,5±144,6	874,1±195,4	1033,3±184,0 ^d
A maternális <i>éter stresszt</i> követő F1, g(5)	31,97±4,81 ^a	78,0±11,1 ^b	553,7±74,6	-	-	-
Kontroll csoport, g(4)	36,06±4,64 ^a	97,43±6,53 ^b	584,7±68,8	-	-	-

^{ab}=P<0,001 ^{cd}=P<0,05

Table 4.: Changes of offsprings' body weight after the handling and ether treatment one day' old(1), weeks' old(2), F1 generation of handling stressed female group(3), control group(4), F1 generation of ether stressed female group(5)

A kontroll csoport utódai (n=163) között 45% gácsér, 55% tojó, míg a Handling-l. csoportban ez az arány: 61% gácsér, 39% tojó volt (n=122).

Az éter-inhalációt követően is megfigyelhető volt egy kismértékű tojástermelés csökkenés, valamint egy rövidebb idejű tojássúly emelkedés. A kelési százalék itt is alacsonyabb, de a naposkori testsúly is elmaradt a kontrollhoz képest. További különbség, hogy már 4. élethétén nem volt a testsúlyban szignifikáns különbség.

5. ábra: Az éter-stressz hatására a tojástermelés és tojástermélet változásai a két csoportban

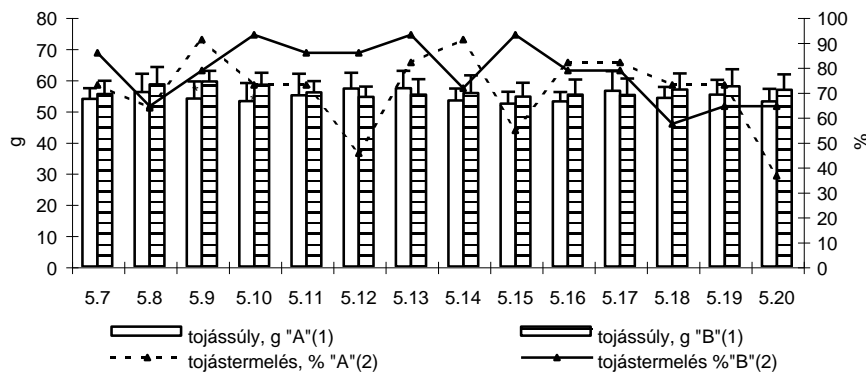


Fig. 5.: Effect of ether-stress on persistence and egg-weight in both group egg weight(1), egg production(2)

Vizsgálataink arra utalnak, hogy a maternális stressz hatások megváltoztatják a szikbe deponált androgén mennyiségét és feltevésünk szerint ezen keresztül az utódok növekedési erélyét és egyes szomatikus paramétereit.

IRODALOM

- Creel, S.*(2001): Social dominance and stress hormones. *Trends in Ecology&Evolution*, 16. 9. 491–497.
- Cunningham, E.J.A. – Russell, A.F.*(2000): Egg investment is influenced by male attractiveness in the mallard. *Nature*, 404. 74–77.
- Eising, C. – Eikenaar, C. – Schwabl, H. – Groothuis, TGG.*(2001): Maternal androgens in black-headed gull (*Larus ridibundus*)eggs: consequences for chick development. *Proc. R. Soc. London*, 268. 839–846.
- Gil, D. – Graves, J. – Hazon, N. – Wells N.*(1999): A male attractiveness and differential testosterone investment in zebra finch eggs. *Science*, 286. 126–128.
- Itoh, Y – Suzuki, M – Ogawa, A – Munechika, I. – Murata, K. – Mizuno, S.*(2001): Identification of the sex of a wide range of Carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences. *J. Hered*, 2. 4. 315–21.
- Núñez-de la Mora, A. – Drummond, H. – Wiengfield, J.C.*(1996): Hormonal correlates of dominance and starvation-induced aggression in chicks of the blue-footed bobby. *Ethology*, 102. 748–761.
- Péczely, P.*(1987): A madarak szaporodásbiológiája. Mezőgazda Kiadó, 80–90.
- Petrie, M. – Schwabl, H. – Brande-Lavridsen, N. – Burke, T.*(2001): Sex differences in avian yolk hormone levels, *Nature*, 412. 498–499.
- Sasvári, L. – Hegyi, Z. – Péczely, P.*(1999): Brood reduction in white storks mediated through asymmetries in plasma testosterone concentrations in chicks, *Ethology*, 105. 569–582.
- Sasvári, L. – Hegyi, Z. – Péczely, P.*(2001): Reply to Ros, Hirschenhauser and Oliviera. *Ethology*, 107. 854–856.
- Schwabl, H.*(1993): Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90. 11446–11450.
- Schwabl, H.*(1996): Maternal testosterone in the avian egg enhances postnatal growth. *Comp. Biochem.Phys. A.*, 114. 271–276.
- Seckl, J.R.*(2001): Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanismus. *Molec. Cell. Endocrinology*, 185. 61–71.
- Walsh, P.S. – Metzger, D.A. – Higuchi, R.*(1991): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 4. 506–513.

Szerzők címe: Szóke, Zs. – Ádám, D. – Biczó, A. – Péczely, P.:

Authors' address: Szent István Egyetem, Szaporodásbiológiai Laboratórium
Szent István University, Lab. of Reproductive Biology
2100 Gödöllő, Páter K. u. 1.

Ferenczi, Sz.: Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,
Molekuláris Genetika Intézet
Agricultural Biototechnology Center, Institute for Molecular Genetics
2100 Gödöllő, Szent-Györgyi u. 4.

A GYÖNGYTYÚK (*NUMIDA MELEAGRIS*) VÉRPLAZMA ÉS FAECES SZEXUÁLSZTEROID PARAMÉTEREINEK VIZSGÁLATA

BICZÓ ANDRÁS — SZÓKE ZSUZSANNA — PÉCZELY PÉTER

ÖSSZEFOGLALÁS

A legtöbb baromfifaj esetében ismertek a szaporodási ciklusra jellemző szexuáliszteroid szintek, gyöngytyúk esetében az erre a témára vonatkozó irodalom még hiányzik. Ezért jelen munka célja elsősorban alapadat felvétel volt további vizsgálatokhoz.

A vérplazma és faeces tesztoszteron, dehidroepiandrosteron és ösztrogén tartalma került vizsgálatra 10-10 gyöngyös tojó, illetve kakas esetében, valamint a progeszteron mennyisége tojók esetében. Két időszakban történt mintagyűjtés: a tojástermelés megindulása előtt, valamint 80%-os tojástermelés mellett, így nyomon követhető volt, hogy milyen változások zajlanak le az ivarérés során a szexuáliszteroidok koncentrációiban.

Kakasok esetében az androgének, tyúkoknál az ösztrogén és a progeszteron szintje növekedett az ivarérés során, mind a vérplazma, mind a faeces esetében. Az egyes hormonok faecalis szintjének napszakos ritmusában a két időszak között a 6–12 órás fáziseltolódás figyelhető meg hormontól függően. A vérplazma és a faeces koncentrációk közti fáziseltolódás a kapott adatok alapján 6–12 óra közé tehető mindkét időszakban.

SUMMARY

*Biczó, A. – Szóke, Zs.Ms. – Péczely, P.: PLASMA AND FECAL SEXUALSTEROID PARAMETERS OF GUINEA FOWL (*NUMIDA MELEAGRIS*)*

In guinea fowl we don't have published data on steroidal background of reproduction. In this study basic data were collected for detailed experiments.

We measured testosterone, dehydroepiandrosterone and oestrogen concentration of plasma and fecal samples in both sexes, and progesterone content in females. Samples were collected before egg laying period and when persistence was 80%, so we could detect the changes of sexual steroid concentrations during maturation.

In males the concentration of androgens, and in females the concentration of oestrogene and progesterone increased during maturation in both feces and plasma samples. In the diurnal changes of sexualsteroids we found a hormone dependent phase-shift (6–12 hour) between the two periods. Our data suggested that, the phase-shift between plasma and fecal sexualsteroid concentrations is between 6–12 hours.

BEVEZETÉS

A gyöngytyúk őse, a sisakos gyöngytyúk Közép- és Nyugat-Afrika sztyep-péin őshonos. Európába valószínűleg a görögök, illetve a rómaiak hozták be, majd szétterjedt az egész kontinensen, a tengerészek közvetítésével átkerült az Újvilágba is, ahol elvadult és sok helyütt már a természetes fauna részeként tartják számon. Annak ellenére, hogy szubtrópusi területeken őshonos, rendkívüli alkalmazkodóképességének köszönhetően még Szibériában is tenyésztik, ahol télen a hőmérséklet -50 °C alá csökken. Európa középső és keleti régióiban még ma is a hagyományos extenzív módon tenyésztik, de egyes nyugati országokban (Franciaország, Olaszország) már hibridekre alapozott intenzív technológiával jelentős árutermelő ágazattá vált a gyöngytyúktenyésztés (Horn, 2000). Kiváló minőségű húsa mellett elterjedtek egyéb hasznosítási módjai is (toll, vadászat), valamint biológiai adottságai révén jelentős szerepre tehet szert a manapság egyre népszerűbb öko-, vagy biogazdálkodásban. Annak ellenére, hogy a gyöngytyúk már régóta szerepet játszik az állattenyésztésben, szaporodásbiológiájával még kevesen foglalkoztak, szaporodási ciklusának endokrin szabályozásáról nem található adat.

A szteroid analitikai elterjedt módszere a vérből történő hormon-meghatározás mellett, ma már a laboratóriumunkban kidolgozott faecalis szteroid analízis (Kelemen és Péczely, 2000; Kelemen és mtsai, 2002) is biztonsággal alkalmazzuk. A módszerrel jó eredményeket értünk el már tűzokon (Biczó és mtsai, 2000; 2002), seregélyen (Pintér és Péczely, 2002), tőkés récén (Ladjánszky és mtsai, 2002), valamint további vizsgálatok folynak örvös légykapón és vízirigón.

Jelen munkánk elsősorban alapadat-felvételnek tekinthető, hiszen egy nagyobb kísérletsorozat bevezetésének szántuk, melynek során hosszú távú szezonális és stresszvizsgálatokat tervezünk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A mintagyűjtéseket a gödöllői Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézetben végeztük. 10-10 kékesszürke gyöngytyúk tojót és kakast helyeztünk el egyedi ketrecekben, ivóvíz és takarmány *ad libitum* állt rendelkezésükre. A ketrecek alatti trágyafelfogó lemez lehetővé tette az egyedi faecesminta gyűjtést. Az állatok intenzív tojóházi megvilágításban részesültek.

Az első mintavételre január 24-én, még a tojástermelés megindulása előtt került sor, a második mintavételt február 24-én végeztük, mikor a tojástermelés megközelítette a 80%-ot. Mindkét időszakban 10 és 16 órakor végeztünk vérvételt és 10, 16, 22, 04 órakor faecesgyűjtést.

A vérmintavétel heparinos fecskendővel történt, majd cenrifugálással (3000 rpm, 20 min) választottuk el a plazmát. A faecesmintákat és a vérplazmát feldolgozásig -20 °C -ra fagyasztva tároltuk.

A vérplazma és a faeces előkészítése a rádióimmunoassay-ra eltérően történt. Vérplazma esetében minden minta adott mennyiségét (0,5 ml) három alkalommal extraháltuk 20 térfogategység dietil-éterrel. Faecesminták (0,5 g) esetében a háromszoros éteres extrakciót 10%-os nátrium-lauril-szulfát oldattal

(SDS; $C_{12}H_{25}NaO_4S$) törő lipid emulgeáció előzte meg, mely a faecesben levő szexuáliszteroid metabolitok lipidektől történő elválasztását segíti elő.

A szteroid meghatározást plazma esetében 0,1 ml-es, faeces esetében 2 mg-os hígításból végeztük. A tesztoszteron (T) RIA kivitelezése *Jallageas* (1975) módszere szerint, a progeszteron (P4) RIA kivitelezése *Abraham és mtsai* (1971) módszere szerint, az 17- β -ösztradiol (E2) RIA kivitelezését a *Mikhail és mtsai* (1970) módszerének megfelelően történt. A dehydroepiandrosteron (DHEA) meghatározást pedig *Fehér Tibor* (szóbeli közlés) módszerével végeztük. Az antiszérumhoz kötődött (B) radioaktivitás (cpm) meghatározása LKB-Wallack típusú Scintillációs Spektrométer segítségével történt. A kapott eredményeket standard görbén értékeltük, majd a szteroid koncentrációkat plazma esetében pg/ml, faeces esetében ng/g faeces-ben adtuk meg.

A recovery (szteroid visszanyerés) mérését, exogén háromszorosan triciált tesztoszteron hozzáadásával végeztük: a homogenizált mintákhoz 200 μ l (\approx 4000 cpm) 3H -T / g faeces adtunk, ezek után kezdtük meg a tisztítási és kinyerési procedúrát. Az extrakciók után ismert arányú mennyiségeket vettünk ki mérőküvetába, a beütésszám méréséhez a küvetákat szcintillációs koktéllal töltöttük fel, és a radioaktivitás meghatározására LKB-Wallack típusú szcintillációs spektrométert használtunk. A számított és mért beütésszámok arányából kiszámítottuk a T visszanyerési arányát, mely átlaga faeces esetében 72% volt. A statisztikai értékelést MINITAB programcsomag segítségével végeztük.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A vizsgált szteroidok koncentrációit és egymáshoz való viszonyukat az 1. ábrán láthatjuk.

Kakasok esetében a vizsgált szexuáliszteroidok közül legnagyobb mennyiségben — a faeces és vérmintákban egyaránt — a tesztoszteron (T) fordult elő. Az ivarézés során koncentrációja megemelkedett és ez a növekedés a vérplazma esetében szignifikáns volt ($P \leq 0,0001$). A második legnagyobb koncentrációt a másik androgén, a dehydroepiandrosteron (DHEA) esetében mértük. Az ivarézés során ezen szteroid esetében is megfigyelhető volt egy kis koncentráció emelkedés, mely faeces esetében szignifikáns volt ($P \leq 0,0004$). A legkisebb koncentrációban a 17- β -ösztradiol (E2) volt jelen mind két mintatípusban, a várakozásoknak megfelelően. A vizsgált időpontok között mennyiségében enyhe csökkenés volt megfigyelhető.

Tyúkoknál legnagyobb mennyiségben szintén a T fordult elő mind a faecesben, mind a vérplazmában. Ez a magas T koncentráció tojók esetében többféle módon indokolható. Egyik valószínű ok, melyre már több publikáció is utalt, hogy a tesztoszteron lényegében csak prehormonnak tekinthető és metabolizáció (aromatizáció, redukció) során alakul át aktív (ösztrógen, 5 α -dihydrotesztoszteron), illetve inaktív (5 β -dihydrotesztoszteron) szteroidokká. Ezzel is magyarázható, hogy míg a vizsgált két időszak során mennyisége a vérplazmában nőtt, ezzel párhuzamosan a faecesben csökkent. A tojók esetében mért magas T koncentráció a tojók párválasztási magatartásával is indokolható, hiszen több tojó is tartozik egy kakas háremébe és a köztük levő rang-

sor kialakításában a magasabb T koncentráció előnnyel jár. A T után a második legnagyobb koncentrációt — az irodalomban leírtak alapján (Péczely, 1987) — vérplazma esetében a progeszteron (P4) esetében mértük, azonban, a faecesben ennek a szteroidnak volt a legkisebb a mennyisége. Ez azzal magyarázható, hogy a P4 a többi szexuáliszteroiddal ellentétben jóval nagyobb mértékű metabolizáció után, 5α - és 5β -pregnánok formájában kerül a faecesbe. Koncentrációja az aktív tojástermelés idején kis mértékben megemelkedett a rendszeres ovulációknak köszönhetően. A vérplazmában a tojástermelés megindulása előtt a harmadik legnagyobb koncentrációt a DHEA adta, majd a legkisebbet az ösztrogén, de a tojástermelés idején, mikor a tüszőérés rendszeressé vált arányuk megfordult. A DHEA koncentrációjának csökkenése a faeces ($P \leq 0,022$) és a vérplazma ($P \leq 0,0028$) esetében is szignifikáns volt.

1. ábra: A szexuáliszteroidok koncentrációinak összehasonlítása

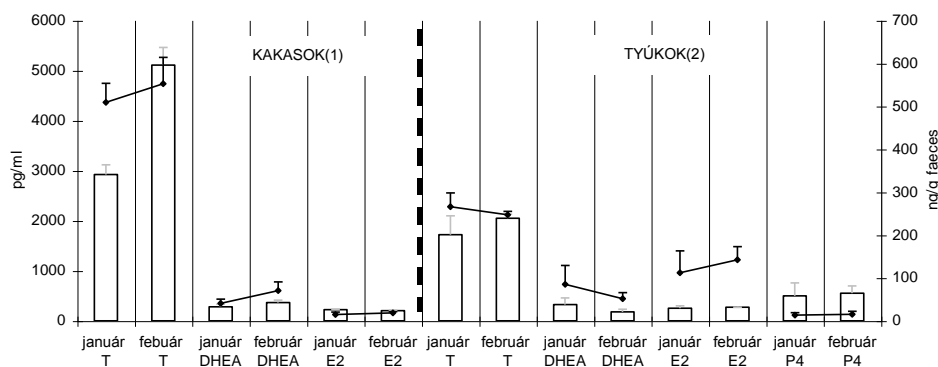


Fig. 1.: Concentrations of sexualsteroids in males and females males(1), females(2)

A faecesben mért szexuáliszteroidok diurnális ritmusa esetében a két időpont között egy fázis eltolódás volt megfigyelhető, mely hormononként eltérően alakult. Tojóknál a T és E2 esetén a januári és a februári hormongörbék között egyaránt 12 órás eltolódást feltételezünk, míg kakasoknál ez az érték T esetében 6 óra volt, E2 esetében pedig a két görbe napi ritmusa nagyon hasonlóan alakult. A DHEA mindkét ivarnál 6 órás eltolódást mutatott, a P4 esetében viszont szinte teljesen megegyezett a két időszakban a napi ritmus. A 2. ábrán példaként a tojók E2 koncentrációját szemléltetjük a két időszakban, valamint a közöttük levő 12 órás eltolódást.

Összefoglalva tehát az mondható el, hogy a szaporodás szempontjából aktív és inaktív időszakokban mért faecalis szexuáliszteroid szintekben hormontól függően 0–12 órás eltolódás figyelhető meg. Mivel már számos faj esetében rendelkezünk a szaporodási ciklus több fázisában is faecalis szexuáliszteroid adatokkal, ezért tervezzük, hogy a jövőben több faj esetében is végzünk vizsgálatokat ebben a témakörben az eredmények további megerősítése érdekében.

2. ábra: A faecalis E2 koncentráció napi ritmusa a két időszakban

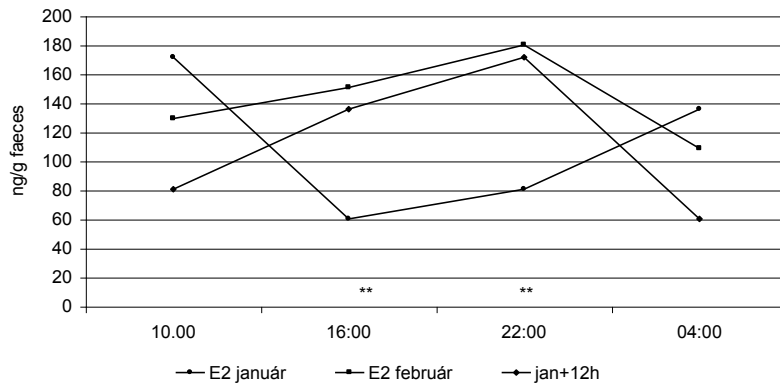


Fig. 2: Diurnal changes of E2 in hens

Korábban már megfigyelték tőkés réce esetében (Ladjánszky és mtsai, 2002), hogy adott szexuálszteroid faecalis és plazma koncentrációi között fázis eltolódás (phase shift) figyelhető meg. Ennek értékét tehát az úgynevezett faecalis késés adja, vagyis a faeces és vérplazma csúcsok közti időkülönbség. Értékét a szteroid fajtájától és szaporodási ciklustól függően 8–12 órára becsülték. Jelen vizsgálatban a szexuálszteroidok vérplazma és faecalis koncentrációi közötti kapcsolatot csak rövid intervallumon belül tudtuk vizsgálni a kevés vérminta miatt. Azonban a vérvételi időpontok között koncentrációváltozások tendenciáját összevetettük a faecalis görbékkel és azt kaptuk, hogy a phase-shift értéke valószínűleg 6–12 óra között van. Az eredmények további pontosítására még további, nagyobb mintaszámot feldolgozó vizsgálatot tervezünk.

Vizsgálatunk konklúziójaként elmondható, hogy a faecalis szteroid analízis gyöngygyúk esetében is jól használható. További vizsgálatokat tervezünk még a szteroid elválasztás, kiürülés, a szezonális és ivarérés, valamint a maternális stresszhatások témakörében, melyhez az általunk már rutinszerűen alkalmazott faecalis szteroid analízis rendkívül jó módszerként, eddigi eredményeink pedig jó kiindulási alapként szolgálnak.

IRODALOM

- Abraham, G.E. – Swerdloff, R. – Tulcinsky, D. – Odell, W.D.(1971): Radioimmunoassay of plasma progesterone. J. Clin. Endocr. Metab., 32. 619–624.
- Biczó, A. – Tarcsai, G. – Kelemen, K. – Péczely, P.(2000): Relationship between faecal sexual steroid content and intensity of display behaviour of male Great Bustard (*Otis tarda*) VII. Int. Symp. Avian Endocrinology, Varanasi, U.P. India, 11.11 Poster
- Biczó, A. – Tarcsai, G. – Mödlinger, P. – Péczely, P.(2002): Role of androgenes, oestrogene and progesterone in the regulation of display behaviour in Great Bustard (*Otis tarda*) males: a fecal steroid study, XXIII. Int. Ornithol. Congr., Beijing, China, Poster
- Jallageas, M.(1975): Interactions reciproques testo-thyroidiennes chez le Canard male. Indcidenés sur les cycles endocriniens annuels. These, Université de Montpellier, France
- Horn, P.(ed.)(2000): Gyöngygyúktenyésztés. In: Állattenyésztés 2. Baromfi és haszongalamb, (Horn, P. szerk), Mezőgazda Kiadó, Budapest, 213–223.
- Kelemen, K. – Péczely,P.(2000.): Standardization of avian faecal steroid analysis: Comparative aspects. VII. Int. Symp. Avian Endocrinology, Varanasi, India, 11.10. Poster

- Kelemen, K. – Péczely, P. – Szőke, Zs. – Ladjánszky, V.*(2002): A comparative methodical study of the fecal steroid analysis on birds: looking for a valid method of testosterone determination. Acta Biol. Hung., in press
- Ladjánszky, V. – Kelemen, K. – Péczely, P.*(2002): Seasonal and diurnal changes of plasma and fecal sexual steroids in Mallards. XXIII. Int. Ornithol. Congr., Beijing, China, Poster
- Mikhail, G. – Wu, C.H. – Ferin, M. – Vande Wiele, R.L.*(1970): Radioimmunoassay of plasma estrone and estradiol. Steroids, 15. 333–352.
- Péczely, P.*(1987): A madarak szaporodásbiológiája. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 47–53. 151–168.
- Pintér, O. – Péczely, P.*(2002): Quantitative histological study of seasonal functional zonation of adrenocortex in starlings. XXIII. Int. Ornithol. Congr., Beijing, China, Poster

Szerző címe: Szent István Egyetem, Szaporodásbiológiai Laboratórium
Authors' address: Szent István University, Laboratory of Reproductive Biology
H-2103 Gödöllő, Páter K. u. 1.
E-mail: biczus@yahoo.com

A SEREGÉLY (*STURNUS VULGARIS*) MELLÉKVESE SZÖVETTANI JELLEMZŐI A SZAPORODÁSI, VALAMINT AZ ŐSZI REAKTIVÁCIÓS IDŐSZAKBAN

PINTÉR, OTTÓ – PÉCZELY, PÉTER

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők Magyarország és Jugoszlávia különböző területein gyűjtött seregélyek mellékveséjének szövettanát vizsgálták a szaporodási és az őszi reaktivációs periódusban. E célra a ma már igen elterjedt image-analyzeres technikát alkalmazták.

A mellékvese elemzése során az interrenalis és az adrenalis állomány közötti arány, valamint az interrenalis állomány három zónájában levő sejtmagok nagysága került vizsgálatra az alábbi időpontokban: március, április, május, augusztus-szeptember és október.

Az interrenalis/adrenalis hányados fokozatos növekedést mutat márciustól augusztus-szeptemberig, majd értéke októberben nagy mértékben lecsökken. A sejtmagok mérésénél nagy esést tapasztalunk áprilisban, majd májustól növekedő tendencia figyelhető meg a három zónában. Minden esetben a külső zóna sejtmagjai domináltak különösképpen áprilisban ($P < 0,001$), augusztus-szeptemberben ($P < 0,001$) és októberben ($P < 0,001$). A kísérletek bizonyítják, hogy a sejtmagok nagysága és a here funkciója reciprok antagonizmust mutat az éves ciklus folyamán.

SUMMARY

*Pintér, O. – Péczely, P.: ROLE OF ADRENAL GLAND IN BREEDING AND NONBREEDING SEASON IN EUROPEAN STARLING (*STURNUS VULGARIS*)*

The adrenal glands of European starlings were collected in March, April, May, August-September and October in different parts of Yugoslavia and Hungary.

The adrenal tissue samples were analyzed by SPOT-Advanced software, when in the interrenal tissue the nucleus sizes (in the supposed 3 zone) and the surface of interrenal and adrenal tissue were measured.

We find that the interrenal/adrenal ratio increased from March to August-September-, while in October it was the smallest. The nuclear sizes in the peripheral zone were the biggest in every cases and it significantly decreased in April, while it increased in May again and it was continuously until October when it reached the maximal size. In the middle and internal zone the nucleus sizes show almost the same picture like the previous zone.

BEVEZETÉS

Általánosan elfogadott, hogy a madár mellékvesében — némi eltéréssel bizonyos fajok között — az interrenalis állomány sejtszöveti tömör sejtkötegekben (perifériás rész) vagy oszlopokban (mélyebb rész) rendeződnek el, az adrenalis állomány pedig különböző számú sejtekből álló csoportokban, szigetekben vagy göcökben helyeződnek el a kéregkötegek között (*Guzsa*, 1981). Több kísérlet alapján bebizonyosodott, hogy az interrenalis állományban nem csak morfológiai, hanem funkcionális eltérések figyelhetők meg. *Vigh és Kondics* (1984) galambokat, Na-gazdag táplálékon tartva kimutatták, hogy a perifériás kéregsejtek lipidszegényé válnak. Az eltűnt lipid az aldosteronszekréció helyét lokalizálja. Ha viszont ACTH-kezeléssel a glikokortikoidok szekrécióját fokozták, akkor a lipidcseppek a mélyebben fekvő sejtekből tűntek el. *Mikami és mtsai* (1980) japán fűrjek mellékveséjének kéregszövetében zonálisan elhelyezkedő, különböző nagyságú és típusú sejteket találtak. A subcapsularis (perifériás) zóna I. típusú sejtek az emlősök zona glomerulosa-jának, az alatta levő II. típusú sejtek az emlősök zona fasciculata-jának, a mélyen fekvő III. típusú sejtek pedig az emlősök zona reticularis-ának sejtszövetével mutatnak hasonlóságot.

Bhattacharyya és Ghosh (1965) több madárfaj esetében figyelte meg mellékvese szezonálisitást; a házi veréb mellékvese kéregállományának térfogata a szexuálisan inaktív időszak 75%-ról a fészkelési időszakban 90%-ra nőtt. *Moens és Coessens* (1970) szerint a házi veréb mellékveséjének a tömege a szaporodási periódusban megnő, továbbá a perifériás zóna sejtmagjai a téli nyugalmi fázis idején nagyobbak, mint a centrális zónában, a fészkelési időszakban viszont fordított a helyzet.

Vizsgálatunkban egy határozott szezonálisitású madár, a seregély esetében tanulmányoztuk a mellékvese struktúra változásait. Célkitűzésünk kettős volt: 1. kimutatható-e az interrenalis állomány zonációja, 2. milyen összefüggés jelentkezik a gonád funkció szezonálisitása és a mellékvese szövettani szerkezet változásai között.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A minták gyűjtését lég- és sörétes fegyver segítségével végeztük Magyarország és Vajdaság (Jugoszlávia) különböző területein, 2000 májusától 2001 márciusáig. Öt csoportot különítettünk el időpont szerint, mégpedig: március, április, május, augusztus-szeptember és október csoportokat. A meglőtt madarakból kiemeltük a gonádokat és a mellékveséket, majd Bouin-fixálóba helyeztük őket, 3–4 órát. A fixálást követően a szerveket Péterfi-féle kettős beágyazással dolgoztuk fel. A beágyazott szervek metszését Reichert-féle szánka mikrotómmal végeztük, melynek során 5 mikrométer vastagságú metszeteket kaptunk. Ezeket haematoxylin-eozin eljárással festettük meg (*Krutsay*, 1980).

A vizsgálat folyamán a mellékvese interrenalis, valamint adrenalis állományának a területét mértük, továbbá második lépésként az interrenalis állomány három zóna sejtmagméretének a meghatározása volt. A mérések image-analyzeres technikával történtek és a kapott eredményeket Student-féle t-teszt módszerrel elemeztük.

EREDMÉNYEK

A seregély mellékveséjének általános jellemzése: A mellékvese vöröses barna színű szerv, amelyet kötőszöveti tok burkol. A seregély esetében is megfigyelhető az, hogy a mellékvese központi része sinusokban gazdag, melyek bőségesen tartalmaznak vörös vérsejteket. Egyes esetekben mélyen az interstitiumban nyirokcsomócskákat figyelhetünk meg.

Az interrenalis kötegekben a külső (subcapsularis) zóna gomba vagy patkó alakú, kissé hasonló szöveti szerkezetet mutatva az emlős mellékvesekéreg zóna glomerulosa-jával. Az alatta levő interrenalis köteg részek legtöbbször radiális lefutásúak, megnyúlt oszlopos szerkezettel. Bennük a sejtek párosával, közvetlenül egymás mellett szorosan helyezkednek el. Ez a középső zóna foglalja el a kéregállomány területének legnagyobb részét, és nagy hasonlóságot mutat az emlősök mellékvesekéreg zóna fasciculata-jával. Az interrenalis állomány belső elemei gyakran nehezen áttekinthető, rendezetlen kötegeket alkotnak. A szerv centrumában levő vérér sinusok mentén. Az interrenalis állomány zonációja minden egyes mintában megfigyelhető, vagyis tipikusnak mondható.

Az adrenalis állomány is csaknem minden esetben jellegzetes területi megoszlást mutat. A kötőszövetes tok alatt rendszerint egy vékony adrenalis zóna található, melyből kisebb-nagyobb megszakításokkal keskeny gerendák nyomulnak a mellékvese közepe felé.

Az interrenalis/adrenalis állomány szezonális változása: A seregély mellékveséjének interrenalis és adrenalis állománya a vizsgált időszakokban jól érzékelhető változásokat mutat (1. táblázat.). Megfigyelhető volt, hogy a madarak tavaszi megérkezését követő időszaktól az interrenalis/adrenalis hányados folyamatos növekedést mutatott a nyár végéig (1. ábra). Legmagasabb értéke (2,82) az őszi részleges ivari reaktiváció idejére esik. Az októberben mért igen alacsony érték pedig a vonulás okozta stresszel hozható összefüggésbe.

1. táblázat

Az interrenalis és adrenalis állomány százalékos megoszlása az éves ciklus folyamán

	március(1)	április(2)	május(3)	aug.-szept.(4)	október(5)
interr. %	69,2	72,7	73,4	73,9	65,3
adren. %	30,8	27,3	26,6	26,1	34,7

Table 1.: Interrenal and adrenal percentage distribution during the annual biocycle March(1), April(2), May(3), August-September(4), October(5)

Az interrenalis állomány három zónájának szezonális változásai és az egyes zónák sejtmagjainak csoportok közötti összehasonlítása: A sejtmagok csoportonkénti nagyságában, mind a három zónában, ugyancsak szezonális változások tapasztalhatóak (2. ábra). A költés előtti (március) időszakban a sejtmagok nagysága magas értéket mutatnak mind a három zónában, majd a költés kezdetén ennek értékében erős csökkenés észlelhető.

1. ábra: A mellékvese interrenalis /adrenalis hányadosának változása csoportonként

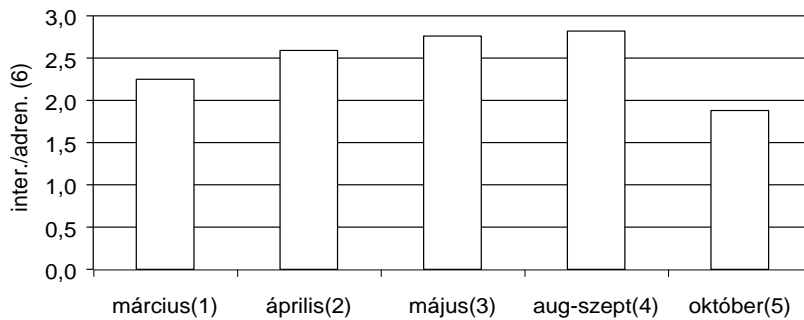


Fig. 1.: The changes of the interrenal/adrenal ratio as in Table 1.(1–5), interrenal/adrenal ratio(6)

2. ábra: A sejtmagok mérete zónánként és csoportonként

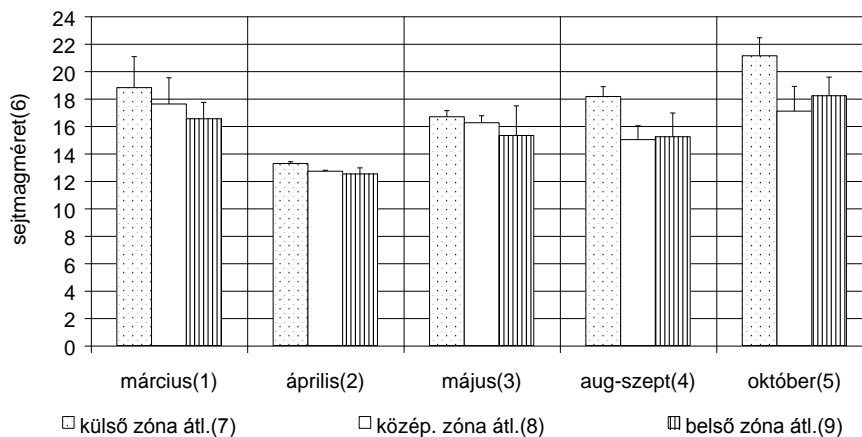


Fig. 2.: Nucleus sizes in three zones of the interrenal tissue during the annual biocycle as in Table 1.(1–5), nucleus sizes(6), peripheral zone(7), middle zone(8), internal zone(9)

Végül a postnuptialis időszakban (májusban) a sejtmagok méretében növekedést figyelhetünk meg és ezt a növekvő tendenciát októberig meg is tartják. Szignifikáns különbséget találtunk az áprilisi külső és középső zóna ($P < 0,001$), az augusztus-szeptemberi külső és középső zóna ($P < 0,001$), valamint a külső és belső zóna ($P < 0,001$), végül az októberi külső és középső zóna ($P < 0,001$), sejtmagjainak méretei között. Jellemzőnek találtuk azt, hogy minden esetben a külső zóna sejtmagjai voltak a legnagyobbak; mégpedig szignifikáns különbség mutatkozott a márciusi és áprilisi külső ($P < 0,001$), valamint a májusi csoport megfelelő zónájának sejtmagjai között ($P < 0,001$). A here tömege március eleje és április között erősen nő (udvarlási-párazási időszak) — ekkor az interrenalis állomány jelentősen csökken, ami főként a perifériás zónára jellemző. Augusztus-szeptemberben a seregély részleges ivari reaktivációja következik be (a hímek újból énekelnek, udvarlás jelentkezik). Ekkor a here tömege minimum

szintre csökken, viszont a mellékvese interrenalis állománya (főként a perifériás zóna) erősen megnövekszik.

KÖVETKEZTETÉSEK

A madár mellékvese corticalis állományának funkcionális zonációjáról viszonylag kevés közlemény jelent meg. *Kondics* (1963), *Péczely* (1964), *Kondics és Kjaerheim* (1966) adatai szerint a perifériás zóna sóterhelésre atrófiával reagál, míg a középső zóna ACTH-kezelést követően mutatott jelentős hipertrofiát. A belső zóna működésére vonatkozóan viszont nem alakult ki egységes vélemény.

Seregélyen végzett vizsgálataink szerint a mellékvese interrenalis állománya valamennyi vizsgált időszakban zonális felépítést mutat, amennyiben a külső zóna sejtmagjai a legnagyobbak és a perifériás kötegek minden esetben jól elkülönültek. Adataink így alátámasztják a korábbi irodalmi közléseket, amennyiben *Miller és Riddle* (1942), *Mikami és mtsai.* (1980) az interrenalis állomány perifériás zónájában találták nagyobb méretű sejteket. Így adataink is valószínűsítik a funkcionális zonáció létezését.

Keveset tudunk a madár mellékvese és a gonád funkció szezonális kapcsolatairól. *Bhattacharya és Ghosh* (1965) szerint a házi veréb interrenalis állománya a fészkelési időszakban növekszik, míg a szexuális nyugalom idején csökken. Seregélyben fordított irányú változást figyeltünk meg: a maximális here (és petefészkek) méret időszakában (április) a legkisebbek az interrenalis állomány magvolumenei, míg augusztus-szeptemberben és októberben voltak ezek az értékek legnagyobbak. Seregélyben tehát valószínű, hogy a gonád működés és a mellékvese corticalis működése között reciprok antagonizmus van.

A seregélyre is jellemző őszi, részleges szexuális reaktiváció idején (augusztus vége, szeptember) a mellékvese interrenalis állományának perifériás zónája határozott hipertrofiát mutat, ami arra utal, hogy a magatartás-mintázat jellemző megváltozásai az ebben a zónában termelt szteroid hormonokkal, esetlegesen androgénekkal lehetnek kapcsolatban. Ezt a feltevést látszanak alátámasztani *Soma és Wingfield* (2001) adatai, mely szerint ebben az időszakban az Észak-Amerikai Melospiza melodia vérében megemelkedik a dehidroepiandroszteron koncentrációja.

IRODALOM

- Bhattacharya, T. K. – Ghosh, A.*(1965): Seasonal histophysilogic study of the interrenal of the house sparrow. Acta Biol. Hung., 16. 1. 67–77.
- Guzsal, E.*(1981): Háziállatok szövettana. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- Kondics, L.*(1963): Über die Wirkung des Kochsalzes auf die interrenalen Zellen der Nebbeniere bei Haustauben. Ann. Univ. Sci. Rolando Eötvös Nom. Sect. Biol., 6. 101–107.
- Kondics, L. – Kjaerheim, A.*(1966): The zonation of interrenal cells in fowls (an electron microscopical study). Z. Zellforsch., 70. 81–90.
- Krutsay, M.*(1980): Szövettani technika. Medicina Könyvkiadó, Budapest

- Mikami, S. – Takagi, T. – Farmer, D.S.*(1980): Cytological Differentiation of the interrenal tissue of the japanese quail (*Coturnix coturnix*). *Cell Tissue Res.*, 208. 353–370.
- Miller, R.A. – Riddle, O.*(1942): The cytology of the adrenal cortex of normal pigeons and in experimentally induced atrophy and hypertrophy. *Am. J. Anat.*, 71. 311–341.
- Moens, L. – Coessens, R.*(1970): Seasonal variations in the adrenal cortex cells of the house sparrow (*Passer domesticus L.*), with special reference to a possible zonation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 15. 95–100.
- Péczely, P.*(1964): The adaptation to saltwater conditions of the adrenal structure in various bird species. *Acta. Biol. Acad. Sci. Hung.*, 15. 171–179.
- Soma, K.K. – Wingfield, J.*(2001): Dehydropiandrosteron in songbird plasma: seasonal regulation and relationship to territorial aggression. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 123. 2. 144–155.
- Vigh, H.B. – Kondics, L.*(1984): Összehasonlító szövettan. Tankönyvkiadó, Budapest

Szerzők címe: *Pintér, O. – Péczely, P.*: Szent István Egyetem,
Authors' address: Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar
Szent István University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences
H-2103 Gödöllő, Páter K. u. 1.
e-mail:fringila@freemail.hu

TARTALOM — CONTENT

<p>Révay, T. – P. Tardy, E.Ms. – Hassanane, M. – Nagy, Sz. – M. Edvi, E.Ms. – Hidas, A. – Rens, W. – Gustavsson, I. – Kovács, A.: Az x- és y-kromoszóma mikroszkópos felismerése bikaondósejtekben. Irodalmi áttekintés. (Microscopic identification of X-and Y-chromosomes in bovine spermatozoa. Methodological review).....</p> <p>Szabari, M. – Nánássy, L. – Szabó, L. – Baranyai, B. – Petrovics, Á.Ms. – Kovács, A. – Zomborszky, Z. – Gócza, E.Ms. – Bodó, Sz.: Spermaértékelés peteburok kötődési teszt segítségével. (Sperm evaluation using zona binding assay)</p> <p>Nánássy, L. – Szabari, M. – Szabó, L. – Baranyai, B. – Petrovics, Á.Ms. – Kovács, A. – Bali Papp, Á.Ms. – Gócza, E.Ms. – Bodó, Sz.: Spermaértékelés mikro Swim up eljárás segítségével. (Sperm evaluation using micro swim-up).....</p> <p>Gábor, Gy. – Szász, F.: A termékenyülési eredmények javításának lehetőségei tejelő szarvasmarha állományban. (Possible methods for the improvement of fertility results in dairy herds).....</p> <p>Baranyai, B. – Virág, Gy.Ms. – Polgár, Zs.Ms. – Bodó, Sz. – Gócza, E.Ms.: Nyúlsperma mélyhűtésének értékelése morfológiai vizsgálattal és mesterséges termékenyítéssel. (Evaluation of rabbit semen cryopreservation with morphology assessment and artificial insemination).....</p> <p>Makkosné Petz, B.Ms. – Deák, E.Ms. – Bali Papp, Á.Ms. – Iváncsics, J.†: Examination of different boar semen during short storage. (Különböző kanok termékenyítő anyagának vizsgálata rövid idejű tárolás során)</p> <p>Kútvölgyi, G.Ms. – Nagy, Sz. – Czimber, Gy. – Balogh, A. – Stefler, J. – Kovács, A.: Mén spermiumok élő/elhalt és akroszóma festése. (Viability and acrosoma staining of stallion spermatozoa).....</p> <p>Bozsaky, É.Ms. – Czimber, Gy. – Kovács, A.: X0 szindróma kancákban. Irodalmi összefoglaló és előzetes esetismertetés. (X0 syndrome in the mare. Literary background and a case report).....</p> <p>Szabados, T. – Gergátz, E. – Vittinger, E.Ms. – Gyökér, E.Ms. – Czimber, Gy.: Out-of-season induced oestrus in ewe lambs. (Ivarzás indukálás jerekéknél aszezonban)</p> <p>Virág, Gy.Ms. – Eiben, Cs.Ms.: Új irányok a házinyúl szaporításában. Nemzetközi kutatási együttműködés (COST 848) a KÁTKI Nyúltenyésztési osztályának részvételével. (New methods in the reproduction of meat rabbit. International research cooperation and main results achieved by the Dept. of Rabbit Breeding and Genetics in KÁTKI)</p> <p>Virág, Gy.Ms.: A biostimulálás egy fajtájának hosszútávú, átfogó hatása az anyanyulak termelésére. (Long term effect of biostimulation on global productivity of rabbit does)</p> <p>Varga, Á. – Barna, J.Ms. – Almási, A.Ms.: Sperm analysis and sexual characteristics of frizzled Hungarian ganders. Preliminary study. (Fodrostollú magyar gúnarak spermatológiai vizsgálata és ivari jellegzetességei)</p> <p>Almási, A.Ms. – Bogenfürst, F.: A mesterséges termékenyítés jelentősége és módszere a lúdfajban. (The importance of artificial insemination in goose: Practical approach)</p> <p>Szőke, Zs.Ms. – Ferenczi, Sz. – Ádám, D.Ms. – Biczó, A. – Péczely, P.: Maternális stressz hatása a szikbe deponált szteroidokra és az utódok szomatikus tulajdonságaira tőkés récében <i>Anas platyrhynchos</i>. (Effect of maternal stress on yolk steroids and on somatic parameters of offsprings in mallard <i>Anas platyrhynchos</i>)</p> <p>Biczó, A. – Szőke, Zs.Ms. – Péczely, P.: A gyöngytyúk (<i>Numida meleagris</i>) vérplazma és faeces szexuáliszteroid paramétereinek vizsgálata. (Plasma and fecal sexualsteroid parameters of Guinea fowl <i>Numida meleagris</i>)</p> <p>Pintér, O. – Péczely, P.: A seregély (<i>Sturnus vulgaris</i>) mellékvese szövettani jellemzői a szaporodási, valamint az őszi reaktivációs időszakban. (Role of adrenal gland in breeding and nonbreeding season in european starling <i>Sturnus vulgaris</i>)</p>	<p>98</p> <p>102</p> <p>107</p> <p>112</p> <p>122</p> <p>131</p> <p>137</p> <p>144</p> <p>151</p> <p>156</p> <p>162</p> <p>167</p> <p>173</p> <p>180</p> <p>189</p> <p>195</p>
--	--

Ebben a lapszámban „A megújuló szaporodásbiológia” c. anyag, szerkesztve, de lektorálás nélkül került közlésre. (In this issue, the papers of the conference on „The renewing reproduction biology” are edited but not supervised)

