
(Hungarian Journal of) ANIMAL PRODUCTION

ÁLLATTENYÉSZTÉS
és **T**AKARMÁNYOZÁS

3

ENGLISH SUMMARIES

Vol. 54.

2005.

TARTALOM — CONTENT

<i>Barna, J.</i> : Előszó (Preface).....	193
<i>Polichronopoulos, T.</i> – <i>Solti, L.</i> – <i>Gáspárdy, A.</i> – <i>Cseh, S.</i> : Andrológiai laboratóriumi vizsgálatok, különös tekintettel a sperma számítógépes analizisére. (Laboratory investigations in the andrology with special emphasis to computer assisted sperm analyses (CASA)).....	194
<i>Nagy, Sz.</i> – <i>Péntek, I.</i> : A motilitásról — másképp. (Checking motility — in a different way) ...	198
<i>Görhöny, B.</i> – <i>Bodó, Sz.</i> – <i>Tóth, Sz.</i> – <i>Dinnyés, A.</i> : Intracitoplazmatikus spermiuminjektálás metodikai összehasonlítása humán és egér modellrendszerben. (Methodic comparison of Intracytoplasmic sperm injection in human and mouse models).....	203
<i>Végi, B.Ms.</i> – <i>Varga, Á.</i> – <i>Szőke, Zs.Ms.</i> – <i>Lennert, L.Ms.</i> – <i>Barna, J.Ms.</i> : A termékenység elemzése új <i>in vitro</i> technika segítségével brojler szülőpár-állományokban. (Fertility analysis using a novel <i>in vitro</i> technique in broiler breeders).....	208
<i>Tóth, F.Ms.</i> – <i>Solymosi, N.</i> – <i>Gábor, Gy.</i> : Az embrióvesztés hatása a tejelő szarvasmarhák fertilitási eredményeire. (Effect of embryonic loss on the fertility of lactating dairy cows).....	216
<i>Gyovai, M.Ms.</i> – <i>Szendrő, Zs.</i> – <i>Maertens, L.</i> – <i>Biró-Németh, E.Ms.</i> – <i>Radnai, I.</i> – <i>Matics, Zs.</i> – <i>Gerencsér, Zs.</i> – <i>Princz, Z.</i> – <i>Horn, P.</i> : A felnevelési módszer hatása az anyanyulak termelésére. (Előzetes eredmények) (The effect of rearing method on the performance of rabbit does. Preliminary results).....	223
<i>Egerszegi, I.</i> – <i>Hazeleger, W.</i> – <i>Rátky, J.</i> – <i>Sarlós, P.</i> – <i>Kemp, B.</i> – <i>Bouwman, E.Ms.</i> – <i>Brüssow, K.P.</i> – <i>Solti, L.</i> : Eltérő takarmányozási szinteken tartott, különböző fajtájú nőivarú sertések tüszőfejlődése. (Follicular development in gilts from different breeds after feeding with distinct energy levels).....	228
<i>Gyovai, M.Ms.</i> – <i>Maertens, L.</i> – <i>Nagy, I.</i> – <i>Biró-Németh, E.Ms.</i> – <i>Radnai, I.</i> – <i>Princz, Z.</i> – <i>Gerencsér, Zs.</i> – <i>Szendrő, Zs.</i> : A felnevelési mód hatása az anyanyulak élettartamára. (Előzetes eredmények) (Examination of factors influencing the survival of rabbit does. Preliminary results).....	233
<i>Balogh, O.Ms.</i> – <i>Kovács, K.Ms.</i> – <i>Kulcsár, M.Ms.</i> – <i>Gáspárdy, A.</i> – <i>Zsolnai, A.</i> – <i>Reiczigel, J.</i> – <i>Kátai, L.</i> – <i>Fésüs, L.</i> – <i>Huszenicza, Gy.</i> : A növekedési hormon genotípus (Alu-I polimorfizmus) hatása az ellés utáni első ovuláció idejére Holstein-fríz tehénekben. (Possible role of the STH genotype (Alu-I polymorphism) in the length of postpartum (pp) acyclic period in dairy cows).....	237
<i>Sáfár, O.Ms.</i> – <i>Kovácsné Gaál, K.Ms.</i> : Magnézium-adagolás hatása a csirkeembrió fejlődésére és a keltethetőségre. (The effect of magnesium supplementation on the development and the hatchability of chick embryo).....	246
<i>Szőke, Zs.Ms.</i> – <i>Ferenczi, Sz.</i> – <i>Biczó, A.</i> – <i>Péczely, P.</i> : A tökérséce tojót ért stressz hatása a tojásszíkbe deponált szteroidokra és az utódokra. (Effect of maternal handling stress on steroid deposition into the yolk and the offspring in mallards).....	255
<i>Nagy, L.</i> – <i>Póti, P.</i> – <i>Pajor, F.</i> – <i>Láczó, E.Ms.</i> : Anyajuhok szaporulati mutatóinak alakulása és azok életteljesítményre gyakorolt hatása a tenyésztésbe vételi idő és a sűrített elletés függvényében. (Changes of prolificacy traits of ewes and their effects on life production depending on early breeding and frequented lambing).....	265
<i>Somfai, T.</i> – <i>Kikuchi, K.</i> – <i>Onishi, A.</i> – <i>Iwamoto, M.</i> – <i>Fuchimoto, D.</i> – <i>Bali Papp, Á.Ms.</i> – <i>Dinnyés, A.</i> – <i>Sato, E.</i> – <i>Nagai, T.</i> : Összefüggés a kumulusz morfológiai változása és a petesejt érés dinamikája közt follikuláris sertés petesejtek <i>in vitro</i> maturáltságakor. (The relationship between the morphologic changes of cumulus and the nuclear progression of follicular porcine oocytes during <i>in vitro</i> maturation).....	272
<i>Horogh, G.</i> – <i>Zsolnai, A.</i> – <i>Kornlósi, I.</i> – <i>Fésüs, L.</i> : Molekuláris genetikai marker szelekció (MAS) a sertés szaporaságának növelésére. (Marker assisted selection (MAS) to improve the reproduction of pig).....	277
<i>Baji Gál, Á.</i> – <i>Bodó, Sz.</i> – <i>Bőonkusz, D.</i> – <i>Görhöny, B.</i> – <i>Balogh, E. Ms.</i> – <i>Dinnyés, A.</i> : Génexpressziós különbségek kimutatása kinetikus PCR-rel korai egérembriók egyedi blasztomer sejtjeiben. (Different gene expression of individual blastomeres in early mouse embryo detected by real time PCR1,2).....	285
<i>Varga, Á.</i> – <i>Végi, B.Ms.</i> – <i>Szőke, Zs.Ms.</i> – <i>Liptói, K.Ms.</i> – <i>Várkonyi, E.Ms.</i> – <i>Lennert, L-né Ms.</i> – <i>Barna, J.Ms.</i> : Kakasspermiumok életképességének és termékenyítő-képességének alakulása a mélyhűtési protokoll során. (Alteration in cock sperm viability and fertilizing ability during cryopreservation procedure).....	293

ELŐSZÓ

Az *Állattenyésztés és takarmányozás* c. lap szerkesztősége immár negyedik éve biztosítja a lehetőséget, hogy a Szaporodásbiológiai Társaság éves rendszerességgel megrendezett találkozójának szakmai anyagát (összefoglalók vagy teljes anyagok) a találkozót követő évfolyam valamelyik számában megjelenteti. Örömkre szolgál, hogy az idei kiadványban — első ízben — a teljes anyagok *lektorált* formái jelenhetnek meg. Reméljük, hogy ez a lépés hagyományteremtő lesz a jövőre nézve is.

A Társaság 2004-ben tartotta 11. szakmai találkozóját Dobogókőn „*A jelen tudománya – a jövő gyakorlata*” címmel. A szokásos másfél napos rendezvény első napját *Haraszti János* professzor úr 80. születésnapja alkalmából megrendezett ünnepi ülésnek szenteltük, amelyen az Állatorvostudományi Egyetem Szülészeti Tanszékének öt kiemelkedő munkatársa (*Cseh Sándor, Huszenicza Gyula, Solti László, Szenci Ottó, és Zöldág László*) — mindannyian a professzor úr korábbi tanítványai — kutatási területének témájában félórás előadással köszöntötte mesterét.

A rendezvény második napjának délelőtti szekciósülése olyan változatos témákat mutattak be, mint a fenntartható állattenyésztés, az EU integrálódás, az EU akkreditációs kérdések, valamint a 2004-ben megrendezett nemzetközi szaporodásbiológiai témájú konferenciák tapasztalatai (XV. ICAR; 16. AI Vets Meeting; 4. AAAA Meeting; 20. Európai Embriótranszfer Konferencia).

Ismert, hogy az utóbbi években tudatosan kezdtük bevonni rendezvényeinkbe a fiatal kutatókat is. Ez 2004-ben sem volt másképp, így a délutáni szekcióban a legkülönbébb állatfajok (szarvasmarha, sertés, baromfi, nyúl, egér) legfrissebb szaporodásbiológiai-biotechnológiai kutatási eredményeit tudták — a zömében PhD. hallgatók — bemutatni 7 előadás és 9 poszter keretében. A jelen kiadványban ezek az anyagok kerülnek a nagyobb szakmai közönség számára is megismerhetővé, bízván abban, hogy a fiatal kollégákkal való szakmai kapcsolatfelvételt is megkönnyítjük ezzel a lehetőséggel.

Remélem rendezvényeink szakmai színvonala évről-évre emelkedik, és egyre ismertebbek, és népszerűbbek leszünk a lap olvasói számára. A Szaporodásbiológiai Társaságról, annak tevékenységéről, illetve a belépési lehetőségekről bővebb információ a www.szapbiol.hu honlapon áll az érdeklődők rendelkezésére.

This is the Proceeding of 11th Meeting of the Hungarian Society for Animal Reproduction titled as „Current science – future practice“. Each of the full text paper is in Hungarian but with English summaries. More about the papers at the authors (addresses are at the end of each papers), and about our Society in www.szapbiol.hu

Barna Judit

VENDÉGSZERKESZTŐ: DR. BARNA JUDIT

ANDROLÓGIAI LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATOK, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A SPERMA SZÁMÍTÓGÉPES ANALÍZISÉRE*

POLICHRONOPOULOS, TASSOS — Solti László —
GÁSPÁRDY ANDRÁS — CSEH SÁNDOR

ÖSSZEFOGLALÁS

A spermiumok mozgásának/motilitásának a vizsgálata lényeges eleme a spermaminőség bírálatának. Számatalan utalás található az irodalomban arra, hogy a spermiumok mozgása meghatározó a termékenyítő-képességük szempontjából. A számítógépes sperma analízis objektív módon értékeli és jellemzi a spermiumok mozgását. A vizsgálatok célja volt: 1) tenyészbikáktól származó fagyasztott sperma motilitási paramétereinek a tanulmányozása, 2) a kapott eredmények és a termékenyülési adatok összevetésével kapcsolatot találni a mozgás paraméterek és a termékenyítő-képesség között. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a spermiumok mozgását jellemző különböző paraméterek (elsősorban a VAP) előrejelző értékkel bírnak a spermiumok termékenyítő-képessége szempontjából.

SUMMARY

Polichronopoulos, T. – Solti, L. – Gáspárdy, A. – Cseh, S.: LABORATORY INVESTIGATIONS IN THE ANDROLOGY WITH SPECIAL EMPHASIS TO COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSES (CASA)

The examination of spermatozoa motility is an important part of the quality evaluation of semen samples. It has been demonstrated that motility of spermatozoa is highly correlated with their fertilizing capability. Computer assisted semen analyses allows an objective assessment of different cell motion characteristics. The aim of the study was: 1) to evaluate the motility parameters of frozen-thawed bull semen obtained from breeding bulls, 2) to correlate the data with the pregnancy results in order to draw conclusions concerning the relationship between different motility parameters and fertility. Based on the results, it can be concluded that velocity data can be used (preferably average path velocity, VAP) to predict the fertilizing potential of frozen bull semen.

* A kutatást az NKFP 4/31/2001 számú téma támogatta.

BEVEZETÉS

A sperma minősége és fertilitása (termékenyítő-képessége) közötti kapcsolat megismerése régi törekvése az andrológusoknak a humán és az állat gyógyászatban (állattenyésztésben). A spermiumok motilitása/mozgása lényeges feltétele a termékenyülésnek *in vivo* és *in vitro* körülmények között egyaránt. Ezért a spermiumok mozgásának a vizsgálata illetve értékelése az egyik legfontosabb lépés a sperma minőségének bírálatakor.

A 90-es évek elejéig — közepéig az ejakulátum minőségének ellenőrzése során a spermiumok mozgásának értékelésekor az általános gyakorlat szerint egy gyakorlott személy mikroszkópos vizsgálattal minősítette a spermiumok mozgását, meghatározta a mozgó és nem mozgó sejtek számát/arányát, valamint az ejakulátumban található sejtek koncentrációját. A WHO által finanszírozott felmérések tapasztalatai szerint azonban a „hagyományos” módszer rendkívül szubjektív, nagymértékben függ a vizsgáló személy gyakorlatától, ezért az eredményekben akár 30–80%-os eltérések is előfordulhatnak, ami lehetetlenné teszi az eredmények laboratóriumok közötti cseréjét. Ezért fogalmazódott meg a szakemberekben az igény egy olyan módszer kifejlesztése iránt, ami objektíven, több szempontból értékeli/jellemzi a spermiumok mozgását és nem csak a mozgó sejtek számát/arányát adja meg. A számítógépes szoftver és hardver fejlesztés terén megmutatkozó hihetetlen gyors fejlődés, megteremtette a feltételeit a számítógép nyújtotta lehetőségeknek az ejakulátum vizsgálatában történő hasznosításához.

Vizsgálataink célja volt, a spermiumok speciális kinetikai tulajdonságai és a spermium termékenyítő-képessége (fertilitása) közötti kapcsolat tanulmányozása. Vizsgáltuk, hogy a spermiumok mozgását különböző szempontok alapján jellemző/leíró paraméterek (pl. progresszivitás, sebesség, linearitás (egyenes vonalúság), stb.) kapcsolatban állnak-e, és ha igen milyen mértékben a hím ivarsejtek termékenyítő-képességével, továbbá az említett adatok ismeretében mennyiben jelezhető előre a spermiumok fertilitása.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Tíz ivadékteljesítmény vizsgálatba állított fiatal bikától származó fagyasztott sperma mintát értékeltünk MEDEALAB CASA Verzió 4.1 (Németország) számítógépes programmal. A vizsgált minták azokból az ejakulátumokból származtak, amelyekből a fagyasztott inszemináló adagokat is előállították és — több mint 100 gazdaságban — összesen 8909 állatot termékenyítettek. A minták vizsgálatakor bikánként/mintánként 10 látótérben, átlagosan összesen 2330 sejt mozgását értékeltük. Az eredmények feldolgozásánál a program által biztosított adatok közül a következőket vettük figyelembe: a felismert/nyomon követett spermiumok száma, összes mozgó, helyben, és körben mozgó sejtek, nem mozgó spermiumok, gyorsan és egyenes vonalban előre mozgó sejtek, és lassan előre mozgó spermiumok száma és aránya. A program megadta a csoportokhoz tartozó átlagos, továbbá a sejtekhez tartozó egyedi sebességi adatokat egyaránt. A következő speciális motilitási paramétereket értékeltük: VCL,

Curvilinear Velocity, μm ; VSL (görbe vonalú mozgás), Straight Line Velocity (egyenes vonalú mozgás), μm ; és VAP, Average Path Velocity (átlagos/egyenes vonalú mozgás), μm (WHO, 2002). A számítógépes sperma analízis eredményeit - miután összevetettük a vemhesülést, illetve a termékenyülést megjelenítő, az inszeminálás utáni 30. és 75. napos visszaivarási adatokkal (NR 30 és NR 75) –retrospektív értékeltük.

Az adatok statisztikai analízisének χ^2 , egy- és többtényezős variancia analízist alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A több mint 100 gazdaságban, összesen termékenyített 8909 állatból a visszaivarási adatok alapján a 30. napon 6590 (NR30: 6590), a 75. napon 4525 (NR75: 4525) állat bizonyult vemhesnek. A vizsgált tenyészbikák NR30 és NR75 visszaivarási adatai között különbséget tapasztaltunk ($P < 0,05$). Eredményeink határozott eltéréseket mutatnak, a bikák NR30 és NR75 értékei között (NR30: $65,6\% \pm 13,04$ – $79,6 \pm 11,17$; $P < 0,001$ és NR75: $37,8 \pm 10,38$ – $58,3 \pm 15,53$; $P < 0,001$), ami jelzi, hogy a hímek termékenyítő-képessége között nagy egyedi ingadozások vannak. Mindegyik motilitási paraméter nagyon erős, határozott korrelációt mutatott a NR30 és NR75 visszaivarási adatokkal. A három motilitási érték (VCL, VSL és VAP) közül a VAP mutatta a legszorosabb kapcsolatot ($P < 0,02$). Eredményeink szerint, az alacsonyabb VCL ($25,51 \pm 33,04$ – $79,54 \pm 58,03$), VSL ($11,35 \pm 19,45$ – $36,36 \pm 35,71$) és VAP ($12,67 \pm 19,06$ – $41,75 \pm 34,45$) értékkel bíró bikák termékenyítő anyagával történő inszeminálás után a NR30 és NR75 vissza nem ivarási adatok alacsonyabbak (több állat ivarzott vissza), következésképpen fertilitásuk alacsonyabbnak bizonyult ($P < 0,02$). Az alacsony VCL, VSL és VAP értékekkel bíró bikák spermájával történő termékenyítések után kevesebb állat vemhesült.

KÖVETKEZTETÉS

A számítógép és a videó technikák elmúlt években tapasztalható gyors fejlődésének köszönhetően a számítógépes spermaanalízáló berendezések ma már lényegesen precízebbek és több információval/adattal szolgálnak a spermiumok mozgásával/motilitásával kapcsolatban, mint a 90-es évek második felében kifejlesztett társaik. Ismert, hogy a termékenyülés szempontjából a spermiumok egyik leglényegesebb tulajdonsága a motilitás. Tapasztalataink alátámasztják, illetve kiegészítik mások megfigyeléseit, nevezetesen, hogy a spermiumok különböző motilitási paramétereit/jellemzőit szorosan kapcsolódnak a sejtek fertilizációs képességeihez. Napjainkban már a számítógépes spermaanalízáló berendezések objektíven és több szempontból értékelik a spermiumok kinetikai tulajdonságait, így a jövőben hozzájárulhatnak a hím állat/sperma termékenyítő-képessége előrejelzése kérdésének megoldásához.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezik ki *dr. Berényi Mihály* professzor úrnak (Human Andrológiai Centrum, Budapest) a vizsgálati protokoll kialakításához és az eredmények értékeléséhez nyújtott segítségével, valamint az OMT Rt-nek és a Bakonszegi AWASSI Rt-nek a CASA berendezés üzembeállításához és a vizsgálatok kivitelezéséhez szükséges minták biztosításáért.

A kísérleti munkához felhasznált néhány szakirodalmi forrás*

- Aitken, R.J. – Sutton, M. – Warner, P. – Richardson, D.W.*(1985): Relationship between the movements characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona free hamster oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 73. 441–449.
- Andersson, M. – Hellman, T. – Holmstrom, B.G. – Jokinen, L.*(1992): Computerized and subjective assessments of post thaw motility of semen from Finnish Ayrshire AI bulls in relation to non-return rates. *Acta Vet. Scand.*, 41. 1247–1251.
- Bratton, R.W. – Foote, R.H. – Henderson, C.R. – Musgrave, S.D. – Dunbar, R.S. – Dunn, H.O.Jr.–Beardsley, J.P.*(1956): The relative usefulness of combinations of laboratory tests for predicting the fertility of bovine semen. *J. Dairy Sci.*, 39. 1542–1549.
- Budworth, P.R. – Amann, R.P. – Chapman, P.I.*(1988): Relationships between computerized measurements of motion of frozen thawed bull spermatozoa and fertility. *J. Androl.*, 9. 41–54.
- Daas, N.*(1992): Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.*, 28. 87–94.
- Davis, R.O. – Katz, D.*(1993): Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.*, 14. 385–394.
- Farrel, P.B. – Presicce, G.A. – Brockett, C.C. – Foote, R.H.*(1998): Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49. 871–879.
- Nothling, J.O. – Gerstenberg, C. – Volkmann, D.H.*(1997): Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51. 109–116.
- Verstegen, J. – Iguer-Quada, M. – Onclin, K.*(2002): Computer assisted analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57. 149–179.
- WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.* 4th Edition, Cambridge Univ. Press, (2002)

* hivatkozás nélkül

Érkezett: 2005. január
Szerzők címe: Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Authors' address: Szent István University, Faculty of Veterinary Sciences
 H-1078, Budapest, István u. 2.

A MOTILITÁSRÓL — MÁSKÉPP

NAGY SZABOLCS — PÉNTEK ISTVÁN

ÖSSZEFOGLALÁS

Az ideális spermabírálati teszt egyidejűleg több tulajdonság értékelését teszi lehetővé sejtszinten, nagy számú sejten. A számítógépes motilitásvizsgálat (CASA) elméletileg megfelel e kritériumoknak, de hatékony alkalmazását számos biológiai és technikai tényező befolyásolhatja.

A megbízható alkalmazás alapfeltétele a CASA rendszer pontosságának és precizitásának ismerete. A precizitásról a mérések ismételhősége ad képet, a pontosság közvetve, módszer-egyetértési analízis segítségével értékelhető. A laboratóriumi körülmények, és a műszer működtetési feltételeinek standardizálását követően kerülhet sor a műszeres motilitásvizsgálat diagnosztikai értékének (pozitív, negatív prediktív értékek, érzékenység, fajlagosság, stb.) megállapítására, ill. a fertilitásproblémát legjobban jelző küszöbértékek meghatározására ún. ROC-görbe szerkesztésével.

A nagyszámú sejten, sejtszinten gyűjtött motilitási paraméterek, lehetővé teszik, bonyolultabb matematikai-statisztikai módszerek alkalmazását is. Fourier-transzformáció, illetve fraktál-geometria segítségével a konvencionális kinematikai paraméterek mellett a különböző spermium-szubpopulációk mozgási jellemzőinek pontosabb mérése, míg többváltozós statisztikai módszerek alkalmazásával az egyes szubpopulációk felismerése és különböző kezelések hatására bekövetkező változásaik követése válik lehetővé.

SUMMARY

Nagy, Sz. – Péntek, I.: CHECKING MOTILITY — IN A DIFFERENT WAY

The optimal semen quality control test is able to measure several parameters at the cellular level and on a high number of cells. Computer-assisted semen analyzers theoretically meet these criteria; however, their effective application is affected by several biological and technical factors.

Knowledge of the precision and accuracy of a given CASA system is crucial. After the standardization of the laboratory environment and the working conditions of the instrument, the diagnostic values of the CASA test (positive, negative predictive values, sensitivity, specificity, etc) should be established, and then the best cut-off values should be found by drawing ROC-curves for predicting fertility problem.

The motility parameters collected at cellular level on a high number of cells allow us to apply sophisticated mathematical-statistical approaches, like Fourier transformations, fractal geometry and multivariate statistical analyses.

Az ideális spermabírálati teszt egyidejűleg több tulajdonság értékelését teszi lehetővé sejtszinten, nagy számú sejten (Nagy, 2002). A számítógépes motilitásvizsgálat (CASA) elméletileg megfelel e kritériumoknak, de hatékony alkalmazását számos olyan biológiai és technikai tényező befolyásolhatja, mint például a spermiumok élettani állapota (mellékhere-spermiumok, ejakulált, mélyhűtött/felolvasztott, vagy kapacitálódott ondósejtek), sejttermelés jelenléte. Az alkalmazott spermahígító, a minta koncentrációja, a mérési körülmények (hőmérséklet, mérőkamra típusa, értékelt sejtszám, mikroszkóp beállításai, szoftver beállításai, stb.) és az alkalmazott statisztikai próbák (Davis és Katz, 1993).

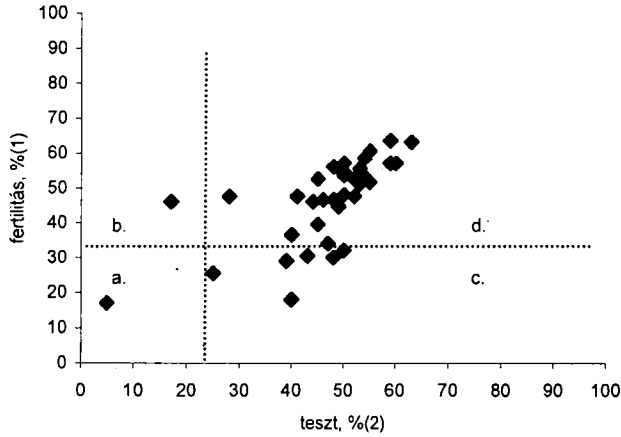
A megbízható alkalmazás alapfeltétele a CASA rendszer pontosságának és precizitásának ismerete. A precizitásról a mérések ismételtetősége ad képet, a pontosságot közvetve módszer-egyetértési analízis segítségével értékelhetjük (Bland és Altman, 1986). Első lépésben célszerű a műszer koncentrációvizsgálatait tesztelni, hiszen a biztos sejtfelismerés alapvető fontosságú a motilitásvizsgálat szempontjából. A méréstechnikai szempontból optimális koncentrációtartomány megállapításának jelentősége abban rejlik, hogy a CASA rendszerek túl sűrű minták esetében jellemzően alulbecsülik a koncentrációt, következőképpen túlbecsülik a motilitási eredményeket, míg túl híg minták esetében túlbecsülik a koncentrációt és alulbecsülik a motilitást. A laboratóriumi körülmények, és a műszer működtetési feltételeinek standardizálását követően kerülhet sor a műszeres motilitásvizsgálat diagnosztikai értékének (pozitív, negatív prediktív értékek, érzékenység, fajlagosság, stb.) megállapítására, illetve a fertilitásproblémát legjobban jelző küszöbértékek meghatározására ún. ROC-görbe szerkesztésével.

1. példa: *(a bemutatott adatok csupán illusztrációként szolgálnak a statisztikai megközelítés szemléltetésére, tényleges biológiai információt nem hordoznak)*

Harmincöt bika spermamintáját értékeltük egy adott spermabírálati módszerrel, majd a teszteredményeket összevetettük a fertilitási eredményekkel (1. ábra). Harmincöt % fertilitási eredményt, illetve 35% teszteredményt vettünk küszöbértékeknek, majd azonosítottuk a tényleges pozitív (küszöbérték alatti fertilitás és teszteredmény), a tényleges negatív (küszöbérték feletti fertilitás és teszteredmény), a hamis pozitív (küszöbérték feletti fertilitás, küszöbérték alatti teszteredmény) és hamis negatív (küszöbérték alatti fertilitás, küszöbérték feletti teszteredmény) egyedeket. Kiszámítottuk az adott teszt érzékenységét (0,25), fajlagosságát (0,92), pozitív prediktív értékét (0,5), negatív prediktív értékét (0,8) a 35%-os küszöbértékre.

A 35%-os fertilitási küszöbértéket legjobban előrejelző teszt-küszöbérték megállapításához ROC-görbét szerkesztettünk (2. ábra): a teszt érzékenységi és fajlagossági mutatóit megállapítottuk 25% és 45% teszt-küszöbértékekre is, majd az adott küszöbértékekhez tartozó tényleges pozitív arány (érzékenység) és hamis pozitív arány (1-fajlagosság) értékek összevetésével rajzoltuk meg a görbét. A legjobb előrejelzést az a küszöbérték adja, amelyhez a legnagyobb tényleges pozitív arány mellett a legkisebb hamis pozitív arány tartozik. A görbe alatti terület nagysága, pedig az adott teszt pontosságát jelzi: a példában szereplő hipotetikus teszt nem elég pontos, az optimális teszthez tartozó ROC-görbét szaggatott vonallal jelöltük.

1. ábra: Adott teszt diagnosztikai értékeinek megállapítása



az egyes kvadránsok a következők: a: tényleges pozitív, b: hamis pozitív, c: hamis negatív, d: tényleges negatív(3)

Fig. 1.: Establishing the diagnostic value of a given test
fertility, %(1), test, %(2), (1)quadrants are the following: a: true positive, b: false positive, c: false negative, d: true negative(3)

2. ábra: Receiver operating characteristics (ROC) görbe

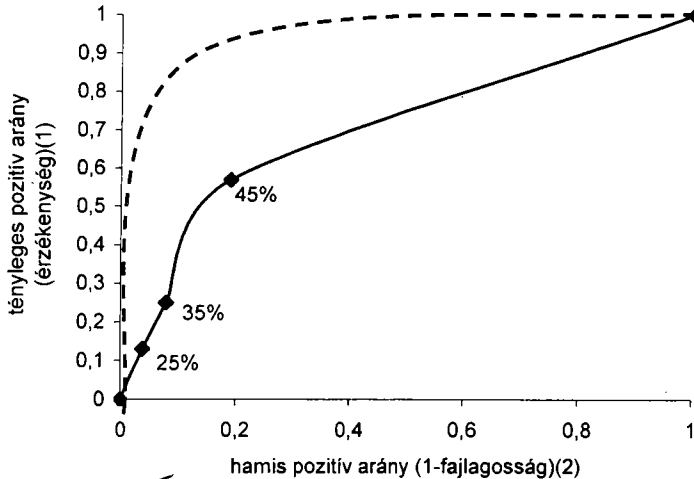


Fig. 2.: Receiver Operator Characteristic (ROC) curve
true positive ratio sensitive(1), b: false positive ratio specific(2)

A műszeres motilitásvizsgálati kísérletek többségében a kapott eredményeket az egyes mozgási paraméter-értékek számtani középértékével fejezik ki.

Ez több szempontból sem szerencsés: egyrészt, a sejtszinten végzett mérések eredményeit átlagértékekkel kifejezve jelentős mennyiségű hasznos információ vesz el (Holt, 1996), másrészt a legtöbb sejtmozgási paraméter az esetek többségében nem mutat normális eloszlást, tehát statisztikai szempontból megfelelőbb lenne a számtani középérték helyett medián értékek használata (Boyers és mtsai, 1989). A nem normális eloszlású adatsorok elemzésére a konvencionálisan alkalmazott statisztikai próbák (t-próba, ANOVA, stb.) helyett célszerűbb, más, nem paraméteres próbákat alkalmazni.

A nagyszámú sejten, sejtszinten gyűjtött motilitási paraméterek lehetővé teszik bonyolultabb matematikai-statisztikai módszerek alkalmazását is. Fourier-transzformáció (Davis és mtsai, 1992), illetve fraktál-geometria (Davis és Siemers, 1995) segítségével a konvencionális kinematikai paraméterek mellett (VCL, VSL, VAP, BCF, ALH stb.) a különböző spermium-szubpopulációk mozgási jellemzőinek pontosabb mérése válhat lehetővé (Davis és Siemers, 1995). Meg kell azonban említeni, hogy az így kapott motilitási paraméterek és a tényleges sejtmozgás minősége közötti viszony tisztázása még várat magára (Mortimer, 1997), továbbá a számítások nem végezhetőek el a kommerciális CASA szoftverekkel.

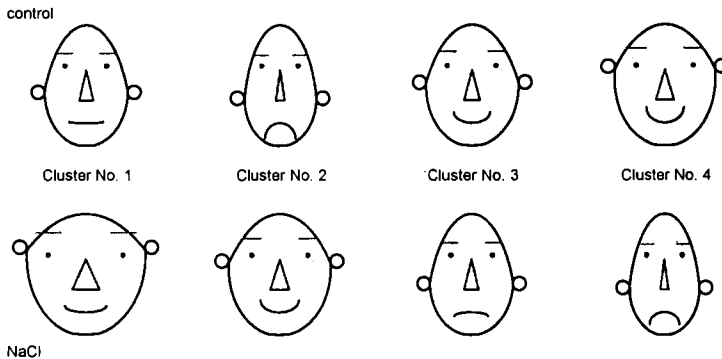
Többváltozós statisztikai módszerek alkalmazásával az egyes szubpopulációk felismerése és különböző kezelések hatására bekövetkező változásaik követése válik lehetővé (Holt, 1996). Ezen megközelítéssel az objektív műszeres vizsgálatok Achilles-sarka, azaz az egyes motilitási paraméterek küszöbértékeinek szubjektív meghatározása tehető objektívebbé (Holt, 1996), és lehetővé válik korábban még nem vizsgált állatfajok (pl. veszélyeztetett vadállat-fajok) spermamintáinak objektív értékelése (Abaigar és mtsai, 1999).

2. példa *(a bemutatott adatok csak illusztrációként szolgálnak a statisztikai megközelítés szemléltetésére, tényleges biológiai információt nem hordoznak)*

Egy ejakulátumot kétfelé osztottunk, és különböző médiumokban hígítottuk őket (kontrolli-kezelés). Műszeres vizsgálattal értékeltük, hogy a kezelés okoz-e eltérést a spermiumok mozgási paramétereiben. K-klaszteranalízist alkalmaztunk, ahol négy klaszterbe soroltuk a sejteket a VSL, VCL, LIN és ALH értékeik alapján. Az eredményt a 3. ábrán szemléltetjük, ahol Chernoff-arcokkal ábrázoljuk az egyes klasztereket. A kontroll minta (control) 2. klasztere megfeleltethető az immotilis sejteknek, az 1. klaszter a lokális motilitású sejteknek, a 3. klaszter a lassú progresszív motilitású spermiumoknak, a 4. pedig a gyors, progresszív motilitású ondósejteknek. A kezelt minta (NaCl) esetén a 4. klaszter megfelel a kontroll minta 2. klaszterének, a 3. klaszter a kontroll 1. klaszterének. Látható azonban, hogy a kezelés aktiválta a progresszív motilitású ondósejteket, hiszen a kezelt mintában nincs megfelelője a kontroll 3. klaszterének, viszont megjelenik egy hiperaktív sejtcsoportként azonosítható klaszter (kezelés 1. klasztere).

A fentieket összefoglalva, a CASA berendezések — megfelelő műszerbeállítás és validálás után — mind a rutin-, mind a kutatólaboratóriumokban megtalálhatják helyüket és szerepüket. Konvencionális spermaértékelési megközelítéssel végzett hazai kísérletekben a CASA berendezések ígéretes eredményeket mutattak (Gábor és mtsai, 2002; Cseh és mtsai, 2004), a jövő kutatási célkitűzéseit azonban feltétlenül érdemes a fentiekben vázolt statisztikai megközelítés fegyelembé vételével körvonalazni.

3. ábra: K-klaszteranalízis (Chernoff-arcok)



arc szélessége: VCL; fül magassága: VSL; száj görbülete: LIN; orr szélessége: ALH(1)

Fig. 3.: K-cluster analysis (Chernoff faces)
face width: VCL, ear level: VSL, mouth curvature: LIN, nose width: ALH(1)

IRODALOM

- Abaigar, T. – Holt, W.V. – Harrison, R.A. – Del Barrio, G.(1999): Sperm subpopulations, in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod.*, 60. 1. 32–41.
- Bland, J.M. – Altman, D.G.(1986): Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.*, 8. 1. 8476. 307–310.
- Boyers, S.P. – Davis, R.O. – Katz, D.F.(1989): Automated semen analysis. *Curr. Probl. Obstet. Gynecol. Fertil.*, 12. 165–200.
- Cseh, S. – Polichronopoulos, T. – Solti, L.(2004): Prediction of bull fertility by computer assisted semen analysis. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16. 2. 128–129.
- Davis, R.O. – Katz, D.F.(1993): Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.* 14. 5. 385–394.
- Davis, R.O. – Niswander, P.W. – Katz, D.F.(1992): New measures of sperm motion. I. Adaptive smoothing and harmonic analysis. *J. Androl.*, 13. 2. 139–52.
- Davis, R.O. – Siemers, R.J.(1995): Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7. 4. 857–869.
- Gábor, G. – Nagy, Sz. – Szász, F. – Szigeti, E. – Solymosi, N.(2002): Comparative semen motion analysis by two computer-assisted methods in AI bulls. *Ann. Meet. Society for the Study of Reproduction*, Baltimore, Maryland, USA, 28–31.
- Holt, W.V.(1996): Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Repr. Domest. Anim.*, 31. 17–24.
- Mortimer, S.T.(1997): A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update*, 3. 5. 403–439.
- Nagy, Sz.(2002): Emlős-spermiumok membrán-integritás-vizsgálatai. (Irodalmi áttekintés). *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 51. 6. 607–616.

Érkezett: 2005. január
Szerzők címe: Nagy, Sz.: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Authors' address: Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.
Péntek, I.: Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet
National Institute for Agricultural Quality Control
H-1024 Budapest, Keleti Károly u. 24.

INTRACITOPLAZMATIKUS SPERMIMUMINJEKTÁLÁS METODIKAI ÖSSZEHASONLÍTÁSA HUMÁN ÉS EGÉR MODELLRENDSZERBEN*

GÖRHÖNY BOTOND — BODÓ SZILÁRD — TÓTH SZABOLCS — DINNYÉS ANDRÁS

ÖSSZEFOGLALÁS

Az intracitoplazmatikus spermiuminjektálás (ICSI) során egyetlen hímivarsejtet juttattak a petesejt citoplazmájába, biztosítva ezzel az ivarsejtek összeolvadását. A 90-es évek elején kidolgozott eljárás emberi petesejteken való alkalmazása azonnali, igen hatékony beavatkozásnak bizonyult. Egér petesejtek esetében azonban ugyanez nem volt igaz, ezért a rendszert továbbfejlesztették. Az emberi petesejten végrehajtott ICSI az alapvető mikromanipulációs eszközökön, a petesejtet tartó holder- és az injektáló kapillárisokat vezérlő mikromanipulátorokon túl semmilyen speciális berendezést nem igényel. Az immár 14 éve rutinszerűen alkalmazott eljárás hatékonyságára jellemző, hogy az érett emberi petesejtek 80–85%-a termékenyül ICSI-t követően, majd az ezekből továbbfejlődő embriókat visszaültetve egészséges gyermekek születnek az asszisztált reprodukciós klinikákon világszerte.

Egéren az eljárás ugyanebben a formában nem kivitelezhető, ami az egér petesejt membránja és az azt körülvevő zona pellucida fiziko-kémiai tulajdonságainak tudható be. A 90-es évek közepén fejlesztettek ki a probléma áthidalására egy Piezo-elektromos hatáson alapuló, horizontális irányban, változtatható frekvenciájú és amplitúdójú, mikrorezgéseket kifejtő rendszert, ami az injektáló mikrokapilláris átjutását segíti az egérpetesejt zona pellucidáján és membránján. Azonban még ezzel a módszerrel is a petesejtek 30–50% lízis áldozatává válik a beavatkozás során, illetve az azt követő egy órában. A sikeres injektálást követően, az ép membránnal rendelkező petesejtek 92–96%-a eléri a 2 sejtés, morula, illetve 86–90%-ban a blasztociszta stádiumot. Néhány embrió 2, ill. 4 sejtés állapotban megállhat az osztódásban.

Az egér modellrendszeren végzett ICSI beavatkozással létrehozott embriók alkalmasak lehetnek arra, hogy korszerű génműködés-vizsgálati módszerekkel tanulmányozhassák a mikromanipuláció következtében esetleg kiváltott epigenetikus változásokat. Az epigenetikus változások és az utód analízis adatainak összevetésével az egér rendszeren tapasztalt összefüggések nagy jelentőséggel bírhatnak a humán ICSI-t alkalmazó szakemberek számára.

SUMMARY

Görhöny, B. – Bodó, Sz. – Tóth, Sz. – Dinnyés, A.: METHODIC COMPARISON OF INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION IN HUMAN AND MOUSE MODELS

The present comprehensive study describes the history and major technical requirements of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of mouse and human oocytes with special emphasis on the differences and similarities of the technique between the two species. ICSI is one of the important artificial reproductive technologies (ART) applying direct injection of a single spermatozoon into the ooplasm, with the help of micromanipulators attached to a microscope. ICSI was first successfully used in the early 1990s to treat couples with infertility because of severely impaired sperm characteristics, and in whom in-vitro fertilization (IVF) or subzonal insemination (SUZI) of oocytes had failed. Due to the different nature of mouse oocytes, this technique used in the human could not have been adapted to the mouse without altering major technical features. Mouse ICSI as a model system can play an important role for further development and risk assessment in human therapy. In animal production, the development of the ICSI method and the incorporation of emerging technologies, such as gene transfer and the cryopreservation of gametes, is expected to increase the efficiency of animal husbandry and support the preservation of rare species and valuable individuals.

* A kutatásokat a Wellcome Trust, a NKTH BIO-0017/2002, a B-it-Magyar TÉT GB52/01 és az Osztrák-Magyar TÉT A10/02 pályázatok támogatták

BEVEZETÉS

Az intracitoplazmatikus spermiuminjektálás (ICSI) egyetlen hímivarsejt mikromanipulációs eszközökkel történő bejuttatását jelenti a petesejt citoplazmájába. A technika az 1990-es évek elején került kifejlesztésre. Az eljárást több asszisztált reprodukciós technika (ART) előzte meg (PZD-partial zona dissection, SUZI-sub zonal insemination), amelyek hatékonysága azonban nem bizonyult kielégítőnek. A legtöbb olyan házaspár esetében, akiknél a férfi áll a terméketlenség hátterében, forradalmi áttörést jelentett és jelent az ICSI alkalmazása (Palermo és mtsai, 1992). Azon pácienseknél indikált az alkalmazása, akiknek az ejakulátuma oligoasthenoteratozoospermiás, többszöri sikertelen IVF kezelésben vettek részt, gerincvelő sérülésük van, ejakulációs problémával küszködnek, retrográd ejakulációjuk van, vazektómia után korábban mélyhűtött spermájuk van, gyógyult rákos betegeknél a kemo-, és sugárterápiát megelőzően mélyhűtött spermájuk van, illetve magas a spermaellenes antitestek koncentrációja. Ezzel ellentétben az ICSI egérben nem a reprodukciót szolgálja, hanem transzgénikus állatok előállításának egy módja. Ezen kívül a sejtmagátültetési klónozási kísérleteknél a technológiai és biológiai kontroll eszközeként is alkalmazható. Az ICSI alkalmazása egérben elsőként Kimura és mtsai (1995) nevéhez fűződik.

Technológiai lépések

Munkánkban kizárólag a humán és egér ICSI mikromanipulációs lépéseinek ismertetését tűztük ki célul.

A humán ICSI lépései:

1. A petesejtek kinyerése: A petefészkek hormonális stimulációját követően ultrahang-vezérelt transzvaginális folliculus punkcióval történik.

2. A petesejtek denudálása: Ennek során a petesejtet körülvevő kumulusz sejteket távolítjuk el 20 IU/ml töménységű hyaluronidase tartalmú HTF (human tubai fluid)-médiumban, többszöri ki-be pipettázással.

3. A sperma előkészítése: A sperma minta volumenétől, spermium koncentrációjától és azok mozgásától függően a mintát különböző módon preparáljuk. Így lehet grádiens-centrifugálás, felusztatás, mosás, illetve ezek célszerű kombinálása.

4. A spermium beinjektálása a petesejt citoplazmájába: Az előkészített spermából kis mennyiséget (1-5 μ l) teszünk a mikromanipulációs edénybe kimért 10-20 μ l térfogatú, 10% PVP-t (polivinyl-pirrolidon) tartalmazó mikroceppbe. A PVP lelassítja mozgásukban a hímivarsejteket, a mikromanipulációs károkkal vezelve egy határozott mozdulattal 5-6 μ m belső mélységű, hegyes injektáló-mikrokapillárisal egy élénken előrefelé mozgó, szabályos morfológiájú spermium farki részét az edény aljához nyomjuk, és ott a membránt szétroncsoljuk anélkül, hogy a nyaki, illetve a feji régiót érintenénk. A mozgásképtelené vált spermiumot lassan, a farki részénél kezdve a mikroinjektor segítségével a mikrokapilláris lumenébe szívjuk. Ezután az edényünk petesejtet tartalmazó HTF+5mg/ml HSA (*human serum albumin*) mikroceppjében az érett MII

(metafázis II) petesejtet a tartókapillárisal úgy rögzítjük, hogy annak első sarki teste 6 óránál legyen (1. ábra). Majd az injektáló-kapillárisal 3 óránál átszűrjük a zona pellucidát, így a lehető legtávolabb próbálunk maradni a kromoszómákat tartalmazó sejtmagtól. Fontos, hogy ne roncsoljuk a metafázisos kromoszómákat, amihez segítséget nyújthat a polarizációs fényvel működő polscope használata abban, hogy általa láthatóvá válhat az osztódási orsó (Konc és mtsai 2004). Tovább tolva a kapillárist a petesejt membránjának megszívjuk azt, amíg át nem szakad, ezután a citoplazmába injektáljuk a spermiumot, és kihúzzuk a kapillárist a sejtől. Végül elengedjük a tartókapillárisról a sejtet.

5. Az *in vitro* embriótenyésztés: A megtermékenyített petesejteket, zigótákat, illetve előembriókat a fejlődési stádiumnak megfelelő tápanyag és energiaszükségletet biztosító, kereskedelmi forgalomban kapható szekvenciális táptalajokban tenyésztjük 37 °C-os CO²-termosztátban.

6. Az előembrió(k) beültetése: Optimális esetben, 8-sejtes stádiumban a harmadik napon, vagy blasztociszták beültetése az 5. esetleg 6. napon történhet.

Az egér ICSI lépései

1. Szuperovuláltatás hormonkezeléssel, majd a petesejtek kinyerése a petevezetéből.

2. A petesejtek denudálása: 300 IU/ml töménységű hyaluronidase tartalmú HEPES-CZB médiumban.

3. A sperma előkészítése: Az ondóvezetéből nyert spermát 0,5 ml HEPES-CZB médium alá rétegezzük egy 2 ml-es Eppendorf csőben, majd inkubátorban 10–20 percig állni hagyjuk. A felúszóból 5 µl-nyit pipettázunk a mikromanipulációs edényünk 20 µl-es, 10% PVP-t tartalmazó HEPES-CZB cseppjébe.

4. A spermium fej szeparálásához: Egy speciális, a piezo-elektromos hatást felhasználó készüléket használunk. A 7–10 µm belső átmérőjű, tompa végű mikrokapillárisba beszívjuk a spermiumot a farki részénél kezdve, és amikor a kapilláris vége éppen eléri a fej-nyak összeköttetést, akkor működésbe hozzuk a piezo készüléket, ami a mikrorezgéseket továbbítja a kapillárisunk hegyére, és ennek hatására a fej elválik a faroktól. A továbbiakban csak a fejet szívjuk be a kapillárisba, a farkra nincs szükségünk. Egérben az ICSI-hez, illetve az azt követő normális előmagképzéshez, valamint osztódáshoz elegendő a spermium feje, ugyanis a sejtosztódást irányító centroszómát nem a spermium nyaki része tartalmazza, hanem a petesejt.

5. A spermium fejének beinjektálása: A petesejt citoplazmájába nem hajtható végre az emberi petesejten korábban leírtaknak megfelelően, mivel az egér petesejt zona pellucidája és plazmamembránja túl rugalmas ahhoz, hogy azokon át tudjunk így hatolni. A piezo készülék a 7–10 µm belső átmérőjű, tompa végű mikrokapillárist (2. kép) kis kalapácsként átüti a zona pellucidán, miközben abból egy kis henger alakú darabot kimetsz. Ezt a kis darabot, mivel nincs rá szükségünk, benyomjuk a zona pellucida és az oolemma közötti perivitelináris térbe. Ezután a plazmamembránnak nyomva a kapilláris végét a piezo-impulzussal megszakítjuk azt, és a citoplazmába injektáljuk a spermium fejét.

A piezo készülék alkalmazásáról általánosságban elmondható, hogy a fent említett három különféle művelet három különböző beállítást igényel a roncsó-

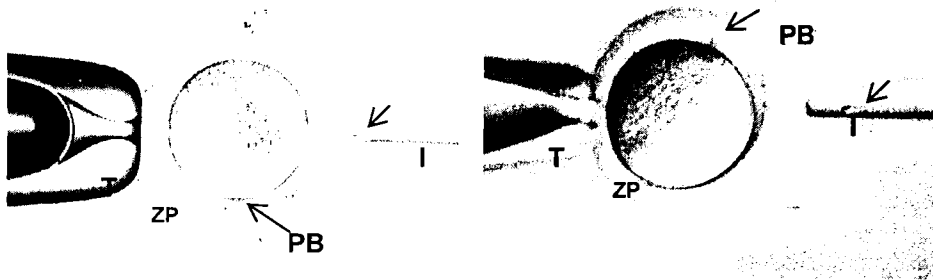
landó biológiai képlet fizikai tulajdonságai miatt. Alapelv, hogy mindig a legkevesebb számú, és legkisebb amplitudójú, még hatékony rezgéseket állítsuk be, elkerülendő ezzel a sejtlízist.

6. Az *in vitro* tenyésztést: CZB-IVC médiumban végeztük.

7. Embriótranszfer.

1. kép : Humán petesejt ICSI előtt

2. kép : Egér petesejt ICSI előtt



T: tartó kapilláris; I: injektáló kapilláris; ZP: zona pellucida; PB: első sarki test; nyíl: spermium feje (a fark nem kivehető a képen !)

T: tartó kapilláris; I: injektáló kapilláris; ZP: zona pellucida; PB: első sarki test; nyíl: szeparált spermium feje

Fig. 1.: Human oocyte prior to ICSI

T: holding pipette; I: injecting pipette; ZP: zona pellucida; PB: 1st polar body; Arrow: sperm head (tail can't be recognized here !)

Fig. 2.: Mouse oocyte prior to ICSI

T: holding pipette; I: injecting pipette; ZP: zona pellucida; PB: 1st polar body; Arrow: separated sperm head

GYAKORLATI JELENTŐSÉG

Az egér modellrendszeren végzett ICSI beavatkozással létrehozott embriók alkalmasak lehetnek arra, hogy a korszerű génműködés-vizsgálati módszerekkel tanulmányozhassuk a mikromanipuláció következtében esetleg kiváltott epigenetikus változásokat. Az epigenetikus változások és az utód analízis adatainak összevetésével az egér rendszeren tapasztalt összefüggések nagy jelentőséggel bírhatnak a humán ICSI-t alkalmazó szakemberek számára.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A Gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Állatbiológiai Intézete Mikromanipulációs és Genetikai Újraprogramozási Csoportja dolgozóinak.

A budapesti Forgács Intézet dolgozóinak.

Külön köszönettel tartozom PhD. témavezetőmnek, *Prof. Dr. Horia Cernescunak*, a Temesvári Agrár és Állatorvostudományi Egyetem prorektorának.

IRODALOM

- Devroey, P. – Van Steirteghem, A.*(2004): A review of ten years experience of ICSI. Hum. Reprod. Update, 10. 1. 19–28. Review
- Fishel, S. – Antinori, S. – Jackson, P. – Johnson, J. – Rinaldi, L.*(1991): Presentation of six pregnancies established by sub-zonal insemination (SUZI). Hum. Reprod., 1. 124–130.
- Konc, J. – Kanyo, K. – Cseh, S.*(2004): Visualization and examination of the meiotic spindle in human oocytes with polscope. J. Ass. Reprod. Gen., 21. 10. 349–353.
- Kimura, Y. – Yanagimachi, R.*(1995): Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. Biol. Reprod., 52. 4. 709–720.
- Malter, H.E. – Cohen, J.*(1989): Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. Fertil. Steril., 51. 1. 139–148.
- Palermo, G. – Joris, H. – Devroey, P. – Van Steirteghem, A.C.*(1992): Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet., 340. 8810. 17–18.

Érkezett: 2005. január
Szerzők címe: Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Authors' address: Agricultural Biototechnology Center
H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi u. 4.

A TERMÉKENYSÉG ELEMZÉSE ÚJ *IN VITRO* TECHNIKA SEGÍTSÉGÉVEL BROJLER SZÜLŐPÁR-ÁLLOMÁNYOKBAN

VÉGI BARBARA — VARGA ÁKOS — SZŐKE ZSUZSANNA — LENNERT LÍDIA — BARNA JUDIT

ÖSSZEFOGLALÁS

A termékenyítés hatékonysága, a fertilis periódus hossza, a normális fejlődésű embriók aránya a petevezetőbe jutott hímivarsejtek mennyiségétől függ, ezért indokolt a lámpázásnál érzékenyebb módszerek alkalmazása a termékenység meghatározására, illetve a tojók fertilis státuszának nyomon követésére.

A múlt évben egy Ross Breeders típusú szülőpár-állomány vizsgálatát végezték el a módszer alkalmazásával. A vizsgált állományban két eltérő ivararányban beállított csoport termékenységeinek alakulását követték nyomon a tojástermelés kezdetétől. A spermiumtranszport a 31–34. élethét között a legkifejezettebb (a penetrációs nyílások számának mediánja 100 körüli), majd az 53. héten a termelés kezdeti szintjére csökken. Míg a lámpázási adatok szerint a csoportok termékenysége a 45. hét után kezd csökkenni, a vizsgálatok adatai szerint a spermiumhiány már a 36. élethétől, azaz 8–9 héttel korábban jelentkezik. A kakascserék alkalmazása nem jelentkezett szignifikáns termékenység-javulásban.

SUMMARY

Végi, B.Ms. – Varga, Á. – Szőke, Zs.Ms. – Lennert, L.Ms. – Barna, J.Ms.: FERTILITY ANALYSIS USING A NOVEL *IN VITRO* TECHNIQUE IN BROILER BREEDERS

Mating efficiency, the duration of the fertility period, and the ratio of normal embryonic development depend on the number of spermatozoa inside the oviduct. Therefore, in order to determine the fertility status of hens, more sensible methods than the candling of eggs are advisable.

The mating efficiency of two flocks of broiler breeders with different reproduction techniques was analyzed using the IPVL hole counting method during the entire reproduction cycle by weekly monitoring. In flock A, the sexual ratio was kept during the whole cycle at 1 male to 10 females. In flock B, the sexual ratio was increased from 1:10 to 0.75:10 to the end of the cycle and at week of 36 and 42 there were 20% spikings, according to the traditional technology. The highest level of sperm transport was found between 31 and 34 weeks, after which it decreased to the starting value at the 53rd week in both flocks. While flock fertility began to decrease from the 45th week, the decrease of sperm in the eggs had already begun from the 36th week, i.e. 8–9 weeks earlier. The effect of spiking could not be proved in improving fertility.

BEVEZETÉS

A humán populáció nagyütemű növekedése (80 millió fő/év) évről-évre fokozódó élelmiszer — azon belül állati fehérje — termelést igényel világszerte. A baromfiágazaton belül a vezető szerep a brojlerhús előállításáé (87%), ami az összes hústermelés 25%-át jelenti világviszonylatban (*Brillard*, 2001). A sikeres termelés alapfeltétele a lehető legalacsonyabb költségek mellett a legjobb minőségű termék előállítása.

Jelenleg a brojler szülőpár-állományok által termelt keltetőtojások termékenysége a termelés előrehaladtával oly mértékben csökken, hogy az már gazdaságtalanná teszi az állomány tartástechnológiájában előírt életkorig való tartását (*Esóssy és Török*, 2004, szóbeli közlés). Ez a tény nem csak hazánkban, hanem a világ más részein is problémát jelent (*McDaniel*, 1986; *Creel és mtsai*, 1990; *Walsh and Brake*, 1997).

A tojások termékenységét alapvetően a termékenyítés hatékonysága, azaz a hímivar oldaláról az ondó minősége és a kakasok libidója, a nőivar részéről — legalább ekkora, ha nem nagyobb mértékben — a tojó spermiumbefogadó-képessége határozza meg. Párázskor a spermiumok a petevezető hüvelyi szakaszának alsó részébe kerülnek, ahonnan nagy részük a hüvelyben zajló szigorú szelekciós folyamatok következtében a kloákán keresztül kiürül és így elvész a termékenyítés számára. A ki nem ürült spermiumok az uterovaginális szűkületben található spermium-tároló tubulusokban raktározódnak (*Okamura és Nishiyama*, 1978.). Az elraktározott spermiumok szakaszosan ürülnek, tyúkfélékben kb. 30% naponta. Ha a petevezető spermiumtároló helyei nem töltődnek újra ismételt párázás révén, akkor egy idő után nem lesz elegendő mennyiségű spermium a termékenyítéshez, azaz a fertilis periódus lezárul, ami háziutykban kb. 2 hét. A tojótyúkók spermiumtároló kapacitása a genetikai tényezőkön túl nagymértékben függ a tojó korától, azaz a termelési ciklusban lévő helyzetétől (*Bakst és mtsai*, 1994). Vizsgálatok igazolták, hogy a termelési csúcst követően a spermiumtároló csövecskék ürülése felgyorsul (*Brillard*, 1993), ami azt jelenti, hogy fiziológiai szempontból a tojások termékenységének fenntartásához a ciklus előrehaladtával mind több és több spermiumra lenne szükség. A termékenyülés helye a petevezető infundibuláris szakasza. A petesejtbe való belépéshez a spermiumoknak át kell hatolniuk a petesejtet körülvevő ún. belső perivitellin membránon, az akroszóma reakció révén, kis nyílások hidrolizálásával. Ezek a mikroszkopikus méretű nyílások zömmel a csírákorong körül találhatók (*Wishart*, 1999).

Egy baromfiállomány szaporításának eredményességét általában a termékeny tojások százalékában fejezik ki. A tojások termékenységének meghatározása leggyakrabban lámpázáskor történik, vagy a keléskor kieső tojások feltérésével is tájékozódni lehet az embrió jelenlétéről. E két módszer hátránya, hogy az esetleges terméketlenségre csak több hetes késéssel derül fény, az utóbbi módszereknél, pedig statisztikai problémák merülhetnek fel a mintavétel miatt, valamint a tojások elvesztése is hátrányos. A nem inkubált tojásokban a termékenység megítélése a csírákorong alapján (Kosin-teszt, *Kosin*, 1945) szintén csak kb. 80%-os biztonsággal történik. Az említett módszerek további közös, lényeges hátránya a termékenység megítélésében rejtőzik. E módszerek alapján a tojás termékeny volta csupán arról ad tájékoztatást, hogy egyetlen

spermium megtermékenyítette a petesejtet, azonban nem tudjuk, mi van a többi százmillió spermiummal. Köztudott, hogy a termékenyítés hatékonysága, a fertilis periódus hossza, a normális fejlődésű embriók aránya a petevezetőbe jutott hímivarsejtek mennyiségétől függ, ezért érthető, hogy a termékeny tojások százalékos arányának ismerete nem sokat mond számunkra.

A sikeres spermium-transzport meghatározásának sokkal közvetlenebb módja a letojt, nem inkubált tojásokban kimutatható spermiumok meghatározása, amelyek a termékenyítés idején és helyén körülveszik a petét, azaz kapcsolatba kerülnek a szikhártyával. Az itt kimutatható akár több ezer spermium a szaporítás hatékonyságáról sokkal többet árul el, mint az egyszerű kétesélyes „termékeny-nem termékeny” meghatározás. A csirakorong fölött található hidrolizált lyukak száma akár 1000 is lehet, bár már 6 nyílás jelenléte jelzi, hogy a petesejt termékenyülhetett. Ha 6-nál kevesebb a nyílások száma, kicsi a valószínűsége a termékenyülésnek, és ha nincsenek nyílások, biztos, hogy nem termékenyült a tojás (*Wishart, 1997*).

Vizsgálatunk során célunk a szaporítás hatékonyságának precíz elemzése volt, két eltérő szaporítási technika alkalmazása során.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatainkat Ross Breeders hústípusú szülőpár-állományon végeztük. A két vizsgálati csoport egy telep két istállójának állománya volt (3000-3000 szülőpár), azonos korú, azonos tartási és takarmányozási körülmények között. Az „A” állományban, a termelési ciklus alatt végig 10 kakas/100 tojó ivararányt alkalmaztunk, melynek során a kieső kakasokat azonos korú kakasokkal pótoltuk. A „B” állományban a tartástechnológiai előírást részben követve a termelés indulásakor 10 kakas/100 tojó ivararányt biztosítottak, a 36. élethétén 20%-os kakascserét hajtottak végre fiatal kakasokkal. A 38. élethétén csökkentették a kakas létszámot 8 kakas/100 tojóra. Ezt követően a 42. élethétén 17%-ban újabb kakascserét hajtottak végre, majd a 48. élethétől tovább tágult az ivararány 7,5 kakas/100 tojóra.

Egy 2–3000-es létszámú szülőpár állomány fertilitásának becslésére, a statisztikai számítások alapján, kb. 60 tojás vizsgálata elegendő (*Wishart, 1997*), tehát hetente a két állományból 60-60 tojás vizsgálatát végeztük el.

A vizsgálat menete: 1. az ép tojássárgája kinyerése a tojásból. A fehérjétől való elválasztás után a sárgáját fiziológias sóoldatban mossuk. 2. A sárgáját körülvevő szikmembránból, a csirakorong fölött egy kb. 2 cm²-es darabot kivágunk. 3. A membrándarabról csipesz segítségével, többszörös öblítéssel lemossuk a visszamaradt sárgáját és fehérjét, majd tárgylemezen ráncmentesen szétterítjük, és fedőlemezzel borítjuk. 4. A penetrációs nyílások sötétlátóteres mikroszkóp 4x-es objektívvei egyszerűen számolhatók (*Steele és mtsai, 1994.*).

Mivel a penetrációs nyílások nem normál, hanem jellegzetesen aszimmetrikus eloszlásúak, különösen az alacsony termékenységű állományokban, a penetrációs nyílások medián értékét hasonlítottuk össze a vizsgálat során, ami kérelál az állomány termékenységével (*Wishart, 1999*).

Å kapott eredményeket Microcal Origin statisztikai programmal értékeltük.

EREDMÉNYEK

Az „A” állomány penetrációs nyílásainak számszerű alakulását mutatja az 1. ábra. A termelés a 26. élethéten indult, amikor a termékenység már megközelítette a 90%-ot, de még magas volt azoknak a tojásoknak az aránya, amelyekben nem találtunk penetrációs nyílást (24,6%). A termelés során a legtöbb tojásban 21–100 között volt a penetrációs nyílások száma. A lámpázási eredmények alapján számolt termékenység a 31. élethéten érte el maximumát (95%), ami a nyílások medián értékében is tükröződött. Erre az időszakra a spermiumot nem tartalmazó tojások száma minimálisra csökkent (1,7%), valamint a nyílások számának eloszlása eltolódott a nagyobb értékek irányába. Az életkor, illetve a termelés előrehaladtával azonban újból nőni kezdett azoknak a tojásoknak a száma, amelyekben nem találtunk penetrációs nyílást (21,7%) és a termékenység ezzel párhuzamosan visszaesett 72%-ra.

1. ábra: Az „A” állomány penetrációs nyílásainak alakulása a 26., 31. és 56. élethéten

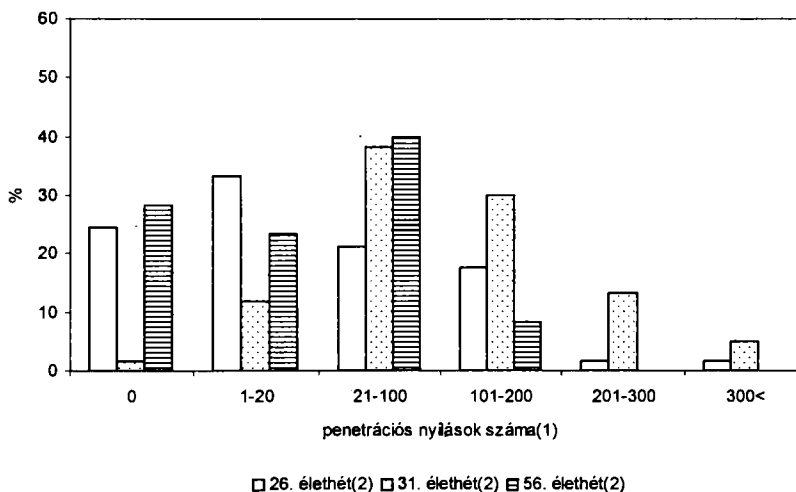


Fig. 1.: Changes in numbers of IPVL-holes as a function of age in flock „A” numbers of IPVL-holes(1), at the age of 26, 31, 56 week(2)

A „B” állomány penetrációs nyílásainak alakulása (2. ábra) az „A” állománynál megfigyelt tendenciát követi, azzal a különbséggel, hogy a „B” állomány a termelés indulásakor nagyobb spermiumpopulációval rendelkezett. A termelés 56. hetére a spermiumot nem tartalmazó tojások aránya viszont többszöröse lett a kiindulási értéknek.

A 3. ábra a két vizsgált állomány tojásaiban a medián értékek alakulását mutatja a termelési ciklus során. Ebből kitűnik, hogy a „B” állomány a kezdetektől kb. 10%-kal nagyobb spermiumtranszporttal rendelkezett és ezt az előnyt végig megőrizte.

2. ábra: A „B” állomány penetrációs nyílásainak alakulása a 26., 31. és 56. élethéten

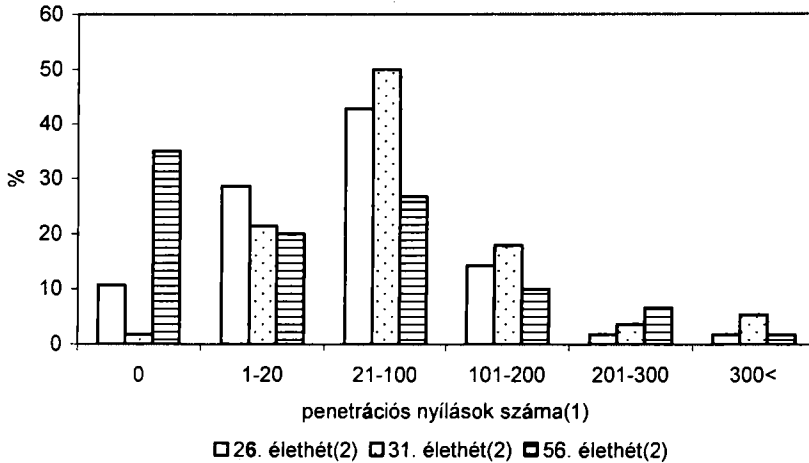


Fig. 2.: Changes in numbers of IPVL-holes as a function of age in flock „B” numbers of IPVL-holes(1), at the age of 26, 31, 56 week(2)

3. ábra: A penetrációs nyílások medianjainak alakulása a két állományban

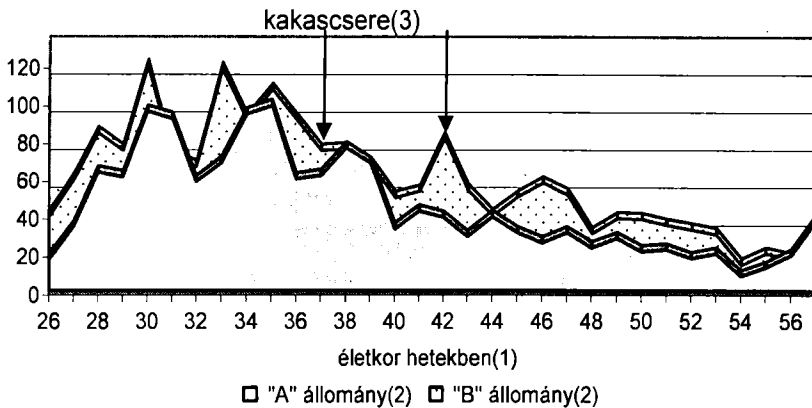


Fig. 3.: Medians of IPVL holes in flock „A” and „B” as a function of age in weeks(1), flock „A”, „B”(2), spiking(3)

A görbék jellegzetessége a spermiumok mennyiségének kb. kéthetes periodicitása. Az „A” állomány esetében ez az ingadozás kiegyenlítettebb, feltehetőleg a kiegyenlített ivararány miatt. Mindkét állományban a 34. héttől kezdve mutatható ki a spermiumok mennyiségének csökkenése, ami a pázások csökkenésére utal. Figyelemre méltó eredmény, hogy a „B” állományban a 36. héten végrehajtott 20%-os kakascsere hatása csak 6 hét elteltével mutatkozott meg a spermiumtranszport enyhe növekedésében, a 42. héten végrehajtott 17%-os

kakascsere hatása szintén csak 4 hét elteltével és nagyon enyhe emelkedésben jelentkezett. A görbe alatti területek adatainak összehasonlításából kiderült, hogy a „B” állományban a 42. hét (2. kakascsere) utáni időszakban 6%-kal magasabb volt a spermiumtranszport az „A” állomány adataihoz képest. Mindez az állomány termékenységében nem volt érzékelhető.

A 4. ábrán a két állomány lámpázási adatainak alapján kiszámolt termékenység és a medián értékek alakulása vethető össze. Ebből egyértelműen kitűnik, hogy a spermiumok transzportja és ezzel a tojásban kimutatható spermiumok jelenléte a 34. héten (92%-os termékenység) kezd rohamosan csökkenni, de ez az állomány termékenységének csökkenésében csak kb. 8 héttel később, a 42. héten jelenik meg (86%). A termékenység csökkenése az 53. hétre elérte a 72%-ot.

4. ábra: A lámpázási adatok alapján számolt termékenység és a penetrációs nyílások mediánjainak összehasonlítása

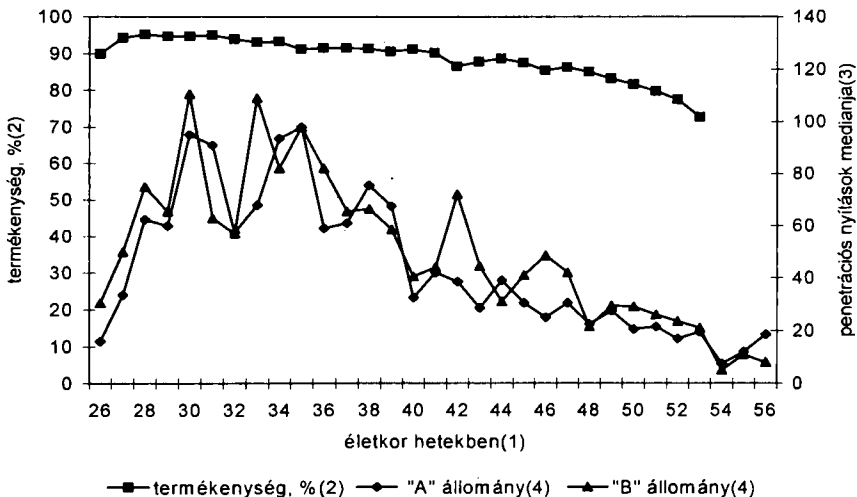


Fig. 4.: Comparison of fertility data and medians of the two flocks as a function of age in weeks(1), fertility %(2), medians of IPVL-holes(3), fertility(4), flock „A”, „B”(5)

A tojások feltörése után, a csirakorong fölötti membrándarab kimetszése előtt, a csirakorongok alapján meghatároztuk a tojások termékeny, illetve terméketlen voltát is (Kosin-teszt). Ezzel a módszerrel — összevetve a penetrációs nyílások számolásával kapott eredményekkel — a termékeny tojásokat 90%-os, míg a terméketlen tojásokat csupán 50–60%-os biztonsággal lehet megítélni.

KÖVETKEZTETÉS

Vizsgálatainkkal igazolni tudtuk, hogy a termelési ciklus második felében nincs elegendő spermium a tojók petevezetőjében a termékenység hosszú ideig történő magas szinten tartásához. Ennek feltételezhetően elsődleges oka

a tojók spermiumtároló kapacitásának csökkenésével párhuzamosan a párzások gyérülése, aminek háttérben a túlsúlyos kakasok csökkenő fizikai aktivitása, valamint a szexuális érdeklődés gyengülése állhat.

Vizsgálataink igazolják, hogy a lámpázási adatok alapján számított termékenységi százalék és az általunk használt módszer érzékenységében óriási különbség van. Az eddigi vizsgálatok azt jelzik, hogy a „B” állományban jelenleg alkalmazott szaporítási technológia nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, ugyanis az igen költséges kakascserék hatása a spermiumtranszport emelkedésére csak csekély mértékben volt kimutatható, összehasonlítva a kakascserék nélkül tartott állománnyal. Ez utalhat egyrészt arra, hogy a 17–20%-os kakascserere nem volt elég a spermiumtranszport növelésére, illetve arra, hogy a ciklus második felében jelentkező termékenység-csökkenésben nem a kakasok öregedése a felelős. Az „A” állományban alkalmazott 1:10-es ivararány kiegyenlített spermiumtermelést eredményezett és eredményességében nem volt rosszabb a „kakascserés” technológiához képest.

Eredményeink szerint a módszer alkalmas a termékenység alakulásának korai diagnosztizálására, mivel 8 héttel korábban meghatározható az állomány kritikus termékenység-csökkenésének időpontja.

A fentiek alapján indokolt további kutatások végzése, amelyek az eddigi technológiától eltérő szaporítási technikákat, takarmány-kiegészítők hatását, a mesterséges termékenyítés kiegészítő alkalmazásának lehetőségeit vizsgálják, amelynek segítségével a termékenység perzisztenciáját hosszabbítani lehet, azaz az egy tojóra eső termékeny tojások száma gazdaságosabb szintre növelhető.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozunk a „Farádi” Mezőgazdasági Termelő Szövetkezetnek a vizsgálati anyagok rendelkezésre bocsátásáért és a kísérletben való együttműködésükért.

IRODALOM

- Bakst, M.R. – Wishart, G.J. – Brillard, J.P.(1994): Oviducal sperm selection, transport, and storage in poultry. *Poult. Sci., Rev.*, 5. 117–143.
- Brillard, J.P.(1993): Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. *Poult. Sci.*, 72. 923–928.
- Brillard, J.P.(2001) Future strategies for broiler breeders: an international perspective. *Wld. Poult. Sci. J.*, 57. 243–250.
- Creel, L.H. – Maurice, D. – Bridges, W.C. – Grimes, L.W.(1990): A model to describe and predict post-peak changes in broiler hatchability. *J. Appl. Poult. Sci.*, 7. 85–89.
- Kosin, I.I.(1945): The accuracy of the macroscopic method in identifying unincubated germ discs. *Poult. Sci.*, 24. 281–295.
- McDaniel, G.R.(1986): Sex separate feeding of broiler parent stock. *Zootech. Int.*, 11. 43–58.
- Okamura, F. – Nishiyama, H.(1978): The passage of spermatozoa through the vitelline membrane in the domestic fowl, *Gallus gallus*. *Cell Tissue Res.*, 188. 3. 497–508.
- Steele, M.G. – Meldrum, W. – Brillard, J.P. – Wishart, G.J.(1994): The interaction of avian spermatozoa with the perivitelline layer *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fertil.*, 101. 599–603.

- Reddy, O.– Sadjadi, (1990): Selection for growth and semen traits in the poultry industry: what can we expect in the future? In: Control of fertility in domestic birds. Ed.: Brillard, J.P.; Institut National de la Recherche Agronomique Editions, Versailles, 47–60.
- Walsh, T.J. – Brake, J.(1997): The effect of nutrient intake during rearing of broiler breeder females on subsequent fertility. Poult. Sci., 76. 297–305.
- Wishart, G.J.(1997): Quantitative aspects of sperm:egg interaction in chickens and turkeys. Anim. Reprod. Sci., 48. 81–89.
- Wishart, G.J.(1999): Avian sperm: egg interaction:mechanisms and practical application for analysis of fertility. Proc. Int. Congr. Bird Reprod., Tours, 215–222.

Érkezett: 2005. január
Szerzők címe: Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Authors' adress: Institute for Small Animal Research
H-2101 Gödöllő, Pf. 417.

AZ EMBRIÓVESZTÉS HATÁSA A TEJELŐ SZARVASMARHÁK FERTILITÁSI EREDMÉNYEIRE

TÓTH FRUZSINA — SOLYMOSI NORBERT — GÁBOR GYÖRGY

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők négy magyarországi tejtermelő holstein-fríz szarvasmarha állományban az embrió- és magzatvesztés mértékének alakulását vizsgálták a termékenyítést követő 25. és 60. nap között. A vizsgálatba 759 vemhes állatot vontak be. A termékenyítést követő 25. és 35. nap közötti embrióvesztést a kérődzők korai vemhességének detektálására (egy vemhességi fehérje kimutatásán alapuló) használt Biopryn® ELISA teszttel vizsgálták. Ennek mértéke 3,29% volt. A vemhesség 35. és 60. napja között bekövetkező veszteségeket (12,67%) a Biopryn teszttel nem lehetett kimutatni, ugyanis a 30–36. nap között elvégzett teszt szerint a vemhességi fehérje mennyisége a szérumban a vemhességnek megfelelő mennyiségű volt. A 25–60. nap közötti embrió- és magzatvesztés mértéke valamint az egyedi tejtermelés mennyisége szerint kialakított csoportok átlaga között szoros, lineáris ($r=0,93$; $P<0,001$) összefüggést találtak.

SUMMARY

Tóth, F. Ms. – Solymosi, N. – Gábor, Gy.: EFFECT OF EMBRYONIC LOSS ON THE FERTILITY OF LACTATING DAIRY COWS

In this recent study, the authors examined the rate of embryonic and foetal loss between 25 and 60 days after AI on four Hungarian dairy farms. 759 pregnant cows were examined in the experiment. The embryonic loss (between 25–35 days after AI) was detected by the Biopryn® ELISA test for PSPB, which was 3.29% of the total number of the pregnant cows. The embryonic loss 35–60 days after the AI, which was 12.67% of the total number of pregnant cows, was impossible to detect by the Biopryn test because the serum PSPB showed the typical level of pregnancy. Interaction was found ($r=0.93$, $P<0,001$) between the individual milk production and the rate of embryonic and foetal losses between 25 and 60 days after AI.

BEVEZETÉS

A tejelő szarvasmarhák reprodukciós veszteségeinek hátterében *Sreenan és mtsai* (2001) szerint a két ellés között eltelt napok számának növekedése, a nem kielégítő hatékonyságú ivarzás megfigyelés, a nem kellő időben végzett termékenyítés, valamint az embrionális veszteségek állnak. Az embrionális veszteséget kiváltó tényezők *Boyd's* (1965) szerint két csoportba sorolhatók: genetikai (származás, beltenyésztettség, vércsoport) és környezeti faktorok (takarmányozás, életkor, kondíció, tejtermelési színvonal, uterinális környezet). Hazánkban az elmúlt négy évben, 2003 októberéig a tejelő tehen létszám körülbelül 50 ezerrel csökkent (223 ezer tehenre), az összesített tejtermelés, pedig 80 millió literrel nőtt, és elérte a tehenenkénti 7500 kilogrammot. A tejtermelés növekedése a szaporodási potenciál romlásával járt együtt, így a két ellés közötti idő 429 napra, az egy vemhesülésre eső termékenyítések száma, pedig 3,48-ra nőtt (*Mészáros*, 2003). Az embrionális veszteségek döntő hányada (70–80%) a vemhesség első 15. napjáig következik be. A többször ellett tehenek esetében a fertilizáció 70%, a korai (17–19. nap) embrionális veszteség elérheti a 30–35 százalékot is (*Ayalon*, 1978). A későbbi, 16. és 42. nap közötti veszteség 10%, majd az ezt követő időszakban az ellésig a magzati veszteség mintegy 5–8 % (*Sreenan és mtsai*, 2001). A fertilitási eredmények romlását a nagy állomány létszám, a növekvő tejtermelés és az igényeket ki nem elégítő takarmányozási gyakorlat egyaránt okozhatja (*Butler*, 1998; *Darwash és mtsai*, 1999). Az ellést követő első 3–4 hétben a tejtermelés meredek növekedésnek indul, azonban az ehhez szükséges tápanyagokat a lassabb ütemben növekvő szárazanyag-felvétel miatt az állat nem képes felvenni, ami negatív energiaegyensúly (*Negative Energy Balance, NEB*) kialakulásához vezet (*Bauman és Currie*, 1980). Az energiahiány ellensúlyozására megindul a szervezetben tárolt zsírok és fehérjék gyors mobilizációja. A testkondíció pontszám egy egységnyi romlása (az 5 pontos skálán) a laktáció elején a vemhesülési eredményeket akár 20 százalékkal is csökkentheti (*Butler*, 2000). A *NEB* hossza, az ellés utáni első ovuláció időpontja és az azt követő vemhesülési ráta között erős pozitív összefüggés áll fenn. A takarmánnyal felvett fehérjék mennyisége és összetétele befolyásolja a sárgatest progeszteron termelését, valamint az uterinális környezetet, a termékenyülést és az embriófejlődést (*Butler*, 1998).

Ma már rendelkezésünkre állnak olyan korai vemhességvizsgáló módszerek is, amelyek alkalmasnak látszanak a 25. és 60. nap közötti embrió- és magzatvesztések vizsgálatára is. A B módú diagnosztikai ultrahang készülékek már a vemhesség 18. (üzőekben) illetve 25. (tehenekben) napján is alkalmasak a vemhesség felismerésére. A szérum- ill. tej progeszteron vagy a különböző vemhességet jelző faktorok (pl. vemhességi fehérjék) kimutatása hasonló eredményességű a termékenyítést követő 28–30. naptól kezdődően. A vemhesség specifikus protein B a vemhes kérődő állatok vérszérumában található fehérje, melyet a trofoblaszt kétmagvú óriás sejtjei termelnek. Tenyészet szinten a vemhesség kimutatására a vemhesülés utáni 28–30. napon használható (*Sasser és mtsai*, 1986). A vemhesség megállapításán kívül a vemhességi fehérjék alkalmasak lehetnek a placenta állapotának vizsgálatára is (*Szenci és mtsai*, 2003). Az elmúlt években fejlesztették ki a vemhesség specifikus protein

B kimutatására alkalmas Biopryn® ELISA (BioTracking LLC, Moscow, Idaho, USA) módszert (Sasser, 2003).

Vizsgálataink célja az volt, hogy megállapítsuk azt, hogy a termékenyítés utáni 25. és 60. nap között:

— Alkalmasak-e a Biopryn teszt eredményei az embrió- és magzatvesztés felismerésére?

— A szérum progeszteron koncentrációk vizsgálatával pontosíthatók-e a Biopryn teszttel detektált embrió- és magzatvesztések?

— A tehenek egyedi tejtermelése hogyan befolyásolja az embrionális, ill. a magzati veszteség mértékét a termékenyítést követő 25. és 60. nap között?

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vemhességvizsgálat

A kísérleteket négy magyarországi tejelő tehenészetben végeztük (közel kétezer tehenet vizsgáltunk meg), és 759 vemhes tehenet diagnosztizáltunk a termékenyítést követő 30–36. napon végzett Biopryn (BioTracking LLC, Moscow, ID, USA) teszttel. A vemhesség újra-ellenőrzése a termékenyítést követő 60. napon rektális-palpációs vizsgálattal történt.

Az ELISA teszthez a (vér)mintavétel kezeletlen vércsőbe történt. A kísérletben résztvevő tehenek mindegyikénél feltétel volt, hogy az előző elléstől a vérvételig legalább 90 nap teljen el (Sasser és mtsai, 1989). Az ELISA lemez fotometrius vizsgálata ELISA (ELx800 Universal Microplate Reader, BIO-TEK Instruments, INC., USA) reader segítségével történt 450 nm hullámhosszon. A határértéket (cutoff) a gyártó által megadott formula segítségével számoltunk ki a kontroll minták optikai denzitása (OD) alapján, és ebből állapítottuk meg az egyes tehenek vemhes vagy üres státuszát.

A rektális vizsgálatokat a telepek a saját gyakorlatuknak megfelelően végezték és ezek eredménye, valamint a Biopryn teszttel vemhesnek talált állatok számának a különbsége adta meg a termékenyítés utáni 60. napig bekövetkező magzatvesztés mértékét.

A szérum progeszteron (P4) koncentráció mérése QuantiCheck (Veterinorg Kft., Budapest) ELISA teszt segítségével történt. A lemezek fotometriás vizsgálatát 450 nm hullámhosszon végeztük ELx800 ELISA leolvasóval.

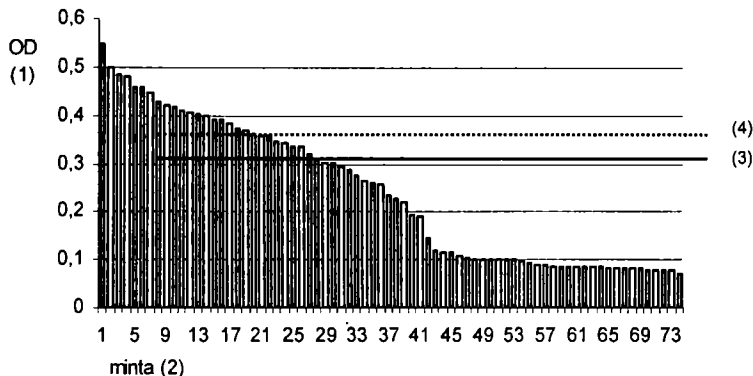
A feltételezett embrióvesztés diagnosztizálása

Korábbi, a Biopryn teszttel végzett vizsgálataink során a vemhesség specifikus fehérje kimutatásakor gyakran talákoztunk a vemhességet jelentő határértéket alulról, vagy felülről közelítő optikai denzitású (OD) mintákkal. Ezek egy részét ultrahangos készülékkel rektálisan ellenőrizve azt tapasztaltuk, hogy a határértéknél alacsonyabb optikai denzitású mintákat adó állatok valamennyien üresek voltak, míg a határérték feletti denzitást adó egyedek egy része vemhesnek bizonyult. A termékenyítés utáni 30. és 35. nap között végzett Biopryn teszttel a termékenyítés utáni 25. és 35. nap közötti veszteségek diagnosztizál-

hatók, mivel a vemhességi fehérje felezési ideje a vérkeringésben 2–3 nap (Sasser és mtsai, 1986).

Jelen vizsgálatunkban a határérték optikai denzitása + 10%-os sávba eső minták esetében embrióvesztést feltételeztünk (1. ábra). Az adott minták szérum progeszteron koncentrációját is megvizsgáltuk. A tényleges diagnózist a rektális-palpációs vizsgálat jelentette, illetve ha az állatot időközben újra termékenyítették.

1. ábra: A szérum vemhességi fehérje optikai denzitás értékek megoszlása az ELISA lemezek fotometriás leolvasása után



határérték(3), határérték + 10% OD érték(4)

Fig. 1.: Distribution of optical densities of pregnancy specific protein b optical density(1), samples(2), cutoff(3), cutoff +10%(4)

EREDMÉNYEK

A vemhesség 25–60. napjáig bekövetkező veszteség mértéke (n=118) 15,54% volt (1. táblázat). Az ELISA teszttel diagnosztizált (25–35. napos) veszteség (n=25) 3,29%, a késői (35–60 nap közötti), a Biopryn teszttel nem jelezhető veszteségek mértéke 12,67% (n=93) volt.

1. táblázat

Az embrióvesztés mértéke az egyes csoportokban

A termékenyítés utáni(1)						
25. és 35. nap között Biopryn teszt jelezte(2)			35. és 60. nap között Biopryn teszt nem jelezte(3)			25. és 60. nap között(4)
vemhes(5)	üres(6)	veszteség, %(7)	vemhes(5)	üres(6)	veszteség, %(7)	veszteség, %(7)
759	25	3,29	734	93	12,67	15,54

Table 1.: The actual embryonic losses in the different groups the embryonic loss between(1) 25 and 35 days after AI detected by the Biopryn test(2), 35 and 60 days after AI not detected by the Biopryn test(3), 25 and 60 days after AI(4), pregnant(5), non pregnant(6), embryonic loss, %(7)

A 2. táblázatban a korai vemhességvizsgálattal diagnosztizált feltételezett és tényleges embrióvesztések alakulása látható. A minták szérumszintje alapján három kategóriát állítottunk fel: amennyiben a vérérszint P4 koncentrációja alacsonyabb volt, mint 2 ng/ml, akkor embrióvesztést valószínűsítettünk, ha a 2 és 4 ng/ml közötti koncentráció értéket mértünk, akkor embrióvesztést feltételeztünk. A 4 ng/ml feletti szérumszint P4 koncentráció esetén a vemhesség fennmaradását valószínűsítettük. A feltételezett 60 esettel szemben csak 25 esetben történt embrióvesztés. Az alacsony szérumszintű minták esetében a feltételezett embrióvesztés 85 százalékban realizálódott. A közepes szérumszintű esetekben (2–4 ng/ml) a veszteség 29,41% volt, míg a vemhességre jellemző szérumszintű csoportban az embrióvesztés mindössze 9,1 százalékot ért el.

2. táblázat

A feltételezett és a tényleges embrióvesztések arányának alakulása a vemhesség 25–35. napja között

Szérumszint progesteron koncentráció(1)	Feltételezett embrióvesztés (2)	Tényleges embrióvesztés (3)	Tényleges vesztés, % (4)
<2 ng/ml	21	18	85,71
2–4 ng/ml	17	5	29,41
>4 ng/ml	22	2	9,1
Összes(5)	60	25	41,4

Table 2.: The expected and the actual rate of embryonic loss between 25 and 35 days of pregnancy
serum progesterone concentration(1), presumed embryonic loss(2), actual embryonic loss(3), actual loss, %(4), total(5)

A 2. ábrán az összes embrió- és magzatvesztés tejtermelés szerinti eloszlása látható.

2. ábra: Az embrió- és magzatvesztés alakulása a tejtermelés függvényében a termékenyítés utáni 25. és 60. nap között

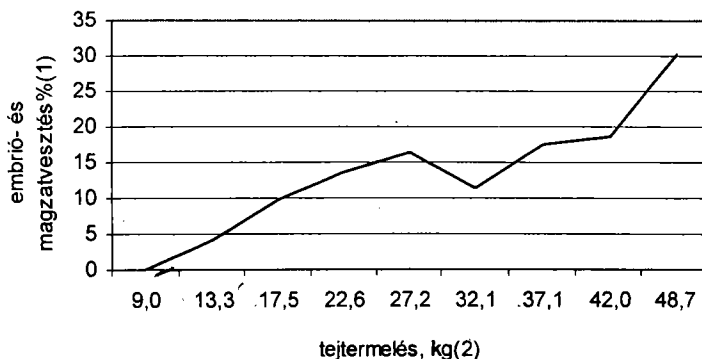


Fig. 2.: The effect of milk production on the embryonic and fetal losses between 25–60 days after AI
embryonic and fetal loss, %(1), milk production, kg(2)

A 25–60. nap közötti embrió- és magzatvesztés mértéke valamint az egyedi tejtermelés mennyisége szerint kialakított csoportok átlaga között szoros ($r=0,93$; $P\leq 0,001$) összefüggést találtunk. A tejtermelés növekedésével a veszteség mértéke is fokozatosan emelkedett. Kisebb visszaesés tapasztalható a 32 kg-os átlag tejtermelésű csoportnál az embrió- és magzatvesztés (11,5%) mértékében. A 45 kg-ot meghaladó tejtermelés esetén az embrió- és magzatvesztés mértéke meghaladta a 30 százalékot.

KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a Biopryn teszt alkalmas a korai embrionális veszteségek egy részének felismerésére. Mindenképpen jó kiegészítő módszernek bizonyult a szérum, progeszteron koncentrációjának vizsgálata is, mivel az ezek alapján felállított kategóriákban a tényleges veszteségek alakulása eltérő volt. Az alacsony progeszteron koncentrációjú minták esetében — amikor a veszteséget valószínűsítettük — az embriók több mint 85 százaléka veszett el, míg a vemhességre jellemző szérum progeszteron szint mellett az embrióvesztés alacsony, csupán 9,1 százalékot ért el.

A szakirodalommal megegyezően összefüggést találtunk ($r=0,93$) az egyedi tejtermelés mennyisége szerint kialakított csoportok átlaga között és a termékenyítés utáni 25–60. nap közötti embrió- és magzatvesztés mértéke között. A tejtermelés növekedésével a veszteség mértéke is fokozatosan emelkedett. Számos vizsgálat szerint (*Sartori és mtsai*, 2000; *Vasconcelos és mtsai*, 1997) a késői (a vemhesség 28. napja után) embrionális és magzati veszteségek hátterében a magas tejtermelés áll. Vizsgálatunkban kisebb visszaesés volt tapasztalható az embrió- és magzatvesztés mértékében (11,5%) a 32 kg-os átlag tejtermelésű csoport esetében, amire egyelőre magyarázatot nem tudunk adni, de elképzelhető, hogy a laktációs, szaporasági ill. genetikai információk további elemzésével választ kaphatunk erre a kérdésre is. Vizsgálatunk talán legmeglepőbb eredménye az, hogy a 45 kg feletti tejtermelés esetén az embrió- és magzatvesztés mértéke meghaladta a 30 százalékot, ami felhívja a figyelmet az egyirányú szelekció lehetséges negatív következményére, illetve a magas genetikai értékű állományok tápanyagigény ismeretének fontosságára.

IRODALOM

- Ayalon, N.*(1978): A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 54. 483–493.
- Baumann, D.E. – Currie, W.B.*(1980): Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.*, 63. 1514–1529.
- Boyd, H.*(1965): Embryonic death in cattle, sheep and pigs. *Vet. Bull., Weybridge*, 35. 251–266.
- Butler, W.R.*(1998): Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 81. 2533–2539.
- Butler, W.R.*(2000): Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 60–61. 449–457.
- Darwash, A.O. – Lamming, G.E. – Wooliams, J.A.*(1999): The potential for identifying heritable endocrine parameters associated with fertility in postpartum dairy cows. *Anim. Sci.*, 68. 333–347.
- Mészáros, Gy.*(2003): A gazdaságos tejtermelés és a teljesítményvizsgálat összefüggései. Nemzetközi Szarvasmarhatenyésztési Tanácskozás, előadás anyag, Farmer Expo, Debrecen

- Sartori, R. – Sartor-Bergfeld, R. – Mertens, S.A. – Guenther, J.N. – Parrish, J.J. – Wiltbank, M.C. (2000): Early embryonic development during summer in lactating dairy cows and nulliparous heifers. *Bioi. Reprod.*, 62. 155–155. 125. Suppl. 1.
- Sasser, R.G.(2003): User's manual of the Biopryn test. BioTracking LLC.
- Sasser, R.G. – Crock, J. – Ruder, C.A.(1989): Characteristics of pregnancy-specific protein B in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 37. 109–113.
- Sasser, R.G. – Ruder, C.A. – Ivani, K.A. – Butler, J.E. – Hamilton, W.C.(1986): Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and profile of serum concentrations during gestation. *Bioi. Reprod.*, 35. 936–942.
- Sreenan, J.M. – Diskin, M.G. – Morris, D.G.(2001): Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. *Anim. Sci.*, 1. Occas. Pub., 26. 93–104.
- Szenci, O. – Beckers, J.F. – Sulon, J. – Bevers, M.M. – Börzsönyi, L. – Fodor, L. – Kovács, F. – Taverne, M.A.M.(2003): Effect of induction of late embryonic mortality on plasma profiles of pregnancy-associated glycoprotein 1 in heifers. *Vet. J.*, 3. 307–313.
- Vasconcelos, J.L.M. – Silcox, R.W. – Lacerda, J.A. – Pursley, J.R. – Wiltbank, M.C. (1997): Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to heat stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. *Bioi. Reprod.*, 56. Suppl. 1. 140.

Érkezett: 2005. január
Szerzők címe: Tóth, F. – Gábor, Gy.: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Authors' address: Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.
Solymosi, N.: Androvet Kft.
Androvet Ltd.
H-1237 Budapest, Szent László u. 175.

A FELNEVELÉSI MÓDSZER HATÁSA AZ ANYANYULAK TERMELÉSÉRE*

(ELŐZETES EREDMÉNYEK)

GYOVAI MÓNICA — SZENDRŐ ZSOLT — MAERTENS, LUC —
BIRÓNÉ NÉMETH EDIT — RADNAI ISTVÁN — MATICS ZSOLT —
GERENCSÉR ZSOLT — PRINCZ ZOLTÁN — HORN PÉTER

ÖSSZEFOGLALÁS

A vizsgálat célja annak megállapítása, hogy a magzati élet alatti, a szoptatás alatti és az elválasztás utáni táplálóanyag-ellátottság, valamint a tenyésztésbe-vételi életkor hogyan befolyásolja az anyanyulak termelését.

A kísérletben az újszülött nyulakat születési súlyuk alapján három csoportba osztották. Az almok egyik felét egy, a másik felét két anya szoptatta. A 21 napos elválasztást követően a nyulak egyik felét ad libitum, másik felét az ad libitum mennyiség 80–85%-ára korlátozva takarmányozták. A tenyésznövendék nyulak mindegyik csoportját megfeleltetve, 15,5 vagy 18,5 hetes életkorban termékenyítették először. Összesen 496 anyanyúl 2239 fialási eredményét értékelték.

A születési súly szignifikánsan befolyásolta az anyák testsúlyát, a 3 hetes egyedi súlyt, valamint a választáskori alomsúlyt, azonban a vemhesülési arányra, az alomlétszámra, a szopós elhullásra és a 3 hetes alomsúlyra nem volt hatással. A két anyával történő nevelés hatása a tenyésztésbevételel követően is kimutatható az anyanyulak testsúlyában. A két anyával nevelt nyulak nagyobb almot fialtak és neveltek fel, de a szoptatási mód nem volt hatással az anyanyulak vemhesülésére, az alom- és az egyedi súlyra, valamint a szopóskori elhullásra. A takarmányozási mód szignifikánsan befolyásolta az anyanyulak testsúlyát, tenyésztésbevételekor az ad libitum, később a korlátozott csoport súlya volt nagyobb. A korlátozott csoport, később fialt először és szignifikánsan nőtt a 3 hetes kori alom- és egyedi súly. A tenyésztésbe-vételi életkor szignifikánsan befolyásolta az anyanyulak testsúlyát: tenyésztésbevételekor a 18,5, később a 15,5 hetesen termékenyített csoport súlya volt nagyobb. Az alomlétszám a 15,5 hetesen tenyésztésbe vett csoportban volt szignifikánsan nagyobb, de a vemhesülési arány, a 3 hetes és a választáskori alomlétszám, az alom- és egyedi súly független volt a tenyésztésbe-vételi kortól.

Az összes vizsgált tényező együttes étkezelése alapján megállapítható, hogy az anyanyulak teljesítménye szempontjából a két anyával történő felnevelés, majd választástól tenyésztésbe vételig 80–85%-os korlátozott takarmányozás előnyös.

SUMMARY

Gyovai, M.Ms. – Szendrő, Zs. – Maertens, L. – Biró-Németh, E.Ms. – Radnai, I. – Matics, Zs. – Gerencsér, Zs. – Princz, Z. – Horn, P.: THE EFFECT OF REARING METHOD ON THE PERFORMANCE OF RABBIT DOES (PRELIMINARY RESULTS)

Using a 3x2x2 factorial design, the influence of nutrient supply in intrauterine life, during nursing and after weaning, as well as the effect of age at first insemination (AI), on the performance of does was studied.

New-born rabbits were divided into three groups on the basis of their birth weight. Half of the litters were nursed by one doe and the other half by two does. After weaning at 21 days of age, from day 28 half of the rabbits were fed ad libitum, while the other half were reared on a restricted feeding regime corresponding to 80–85% of the *ad libitum* feed intake level. All groups of young does were again divided and inseminated for the first time, either at 15.5 or at 18.5 weeks of age. Altogether, 2239 litters from 496 does are yet available for the analysis of the results.

* A kutatást az OTKA TS 044743 számú téma támogatta

The birth weight significantly influenced the body weight of does, but had no effect on the kindling rate, litter size, suckling mortality and litter weight at 3 weeks of age. The effect of nursing by two does was significant on the body weight of does even after insemination. Rabbits nursed by two does kindled and reared larger litters. However, the nursing method had no influence on the kindling rate, on litter weight and individual body weight and on kits' mortality during nursing. *Ad libitum* feeding led to a significant increased body weight of does at the first AI but the weight of the restricted-fed group was higher from the first kindling off. In the restricted-fed group, the first kindling took place later and the litter weight and individual kit body weight at 3 weeks of age increased significantly. Age at first AI significantly influenced the body weight of does. Females had higher weight when inseminated at 18.5 weeks of age but from kindling off females inseminated at 15.5 weeks of age had higher body weight. Litter size was significantly higher in females first inseminated at 15.5 weeks of age. However, the kindling rate, the litter size at 3 weeks of age and at weaning, and the litter weight and individual kit body weight were independent of age at first AI.

From the combined evaluation of all traits studied, it can be concluded that nursing by two does followed by restricted feeding (80–85% of *ad lib*) up to the time of the first AI exerts a beneficial effect on the subsequent performance of does.

BEVEZETÉS

A házinyúlnál különös jelentősége van az anyai hatásnak, az anya és az ivadécai közötti szoros kapcsolatnak. Több kutató (*Szendró és mtsai*, 1989; *Tudela és mtsai*, 1998) foglalkozott a felnevelés alatti alomlétszámnak az anyanyulak termelésére gyakorolt hatásával. *Poigner és mtsai* (2000) szerint előnyös, ha az anyanyúl nagy súllyal születik, viszont az alomlétszám hatását nem tudták igazolni. *Rommers és mtsai* (2001) a 12-es alomban történő felnevelést kifejezetten hátrányosnak találták. *Maertens* (1992) a gyorsabban gyarapodó fajtáknál a felnevelés alatti korlátozott takarmányozást ajánlja. *Rommers és mtsai* (2001) eredményei szerint a 14,5 hetesen tenyésztésbe vett anyanyulak szaporasági mutatói elmaradnak a 17,5 hetes korban tenyésztésbe vett társai-kétől. Ezekben a kísérletekben az egyes tényezőket általában egymástól függetlenül, esetleg két, maximum három hatást kombinálva vizsgálták.

Kísérletünkben a legkedvezőbb felnevelési módot és az ehhez párosuló ideális tenyésztésbe-vételi kort kerestük. Célunk annak megállapítása, hogy a magzati élet (születési súly) és a szoptatás alatti táplálóanyag-ellátottság (egy vagy két anyával nevelés), az elválasztás utáni takarmányozás (*ad libitum* vagy korlátozott), illetve a tenyésztésbe-vételi életkor (15,5 vagy 18,5 hét) hogyan befolyásolják az anyanyulak termelését.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérleteket a Kaposvári Egyetem kísérleti telepén Pannon fehér nyulakkal végeztük. Az egynapos nőivarú nyulakat három csoportba (kis (S)=35–45g, közepes (M)=53–58g, nagy (L)=65–70g) osztottuk. A három csoportot megfeleltük, és az almok felét hagyományosan egy (O) a másik felét *Szendró és mtsai* (2002) által leírt módon két anya (T) szoptatta. Az egyik anyát reggel, az aznap fiatal pótyanyát este engedték be az elletőládába szoptatni. Az egy anyás nevelésnél az anya csak reggel szoptatható.

A 21 napos választás után a nyulakat kettesével hizlaló ketrecbe helyeztük. A hat csoportot ismét megfeleztük, a nyulak egyik felét *ad libitum* (A), a másik felét 28 napos kortól korlátozva (R) takarmányoztuk. A korlátozott csoportban a nyulak 4–6 hetes kor között napi 10, 6–9 hetes korban napi 9, 9–12 hetes korban napi 8, 12–15 hetes korban napi 7, majd tenyésztésbevételeig napi 6 órán keresztül táplálkozhattak. A tenyésztésbevétele megelőzően mind a 12 csoportot ismét megfeleztük, az anyák egyik felét 15,5, a másik felét 18,5 hetes korban vettük tenyésztésbe. A fialás előtti 3. naptól minden anyanyúl *ad libitum* kapott tenyésztápot.

Az anyanyulakat az első fialás után a 18., később a 11. napon inszemináltuk újból. Az üresen maradt egyedeket 3 hét múlva újra termékenyítettük. Az egymás után háromszor nem vemhesült anyanyulakat kiselejteztük.

A kísérlet 2001-ben kezdődött, de még folyamatban van. A feldolgozásban 496 anyanyúl 2239 fialásának eredményét értékeltük. A kísérleti adatokat többtényezős varianciaanalízissel, SPSS 10.0-s programcsomaggal dolgoztuk fel. A szopósnnyulak elhullását χ^2 -próbbával hasonlítottuk össze.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A kísérlet legfontosabb eredményeit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

Az anyanyulak testsúlyát első fialáskor az összes tényező szignifikánsan befolyásolta. A születési súly hatása a tenyésztésbevétele után is kimutatható. A két anyával nevelt nyulak súlyfölénye nem csak a vágási korig (Szendrő és mtsai, 2002), hanem azt követően is megmaradt. Az A nyulak testsúlya az első fialáskor 348 g-mal meghaladta az R csoportét, de az első fialás alkalmával már az R nyulak voltak 156 g-mal nagyobbak, és ez a különbség, később sem változott lényegesen. Számos kutató (Schlölaut és Lange, 1979; Rommers és mtsai, 1999) kimutatta, hogy visszafogott takarmányozást követően megnő a nyulak étvágya és emiatt átlag feletti súlygyarapodást érnek el. A fiatalabb korban tenyésztésbe vett anyanyulak súlya — természetesen — kisebb volt, mint a 18,5 hetesen inszemináltaké, de később már a 15,5 hetesen termékenyített csoport súlya volt nagyobb.

Az egy fialáshoz szükséges termékenyítések számában az L és a H anyák szignifikánsan jobb eredményt értek el, mint az M csoportba tartozó egyedek. A két szélsőséges súlyú csoport jobb teljesítménye nehezen magyarázható. Az O nyulak kissé, de nem szignifikánsan jobb eredményt értek el, mint a T csoport. Az A csoport anyanyulait egy-egy fialáshoz kevesebbszer kellett termékenyíteni, mint az R anyákat, de a különbség nem szignifikáns. Hartmann és Petersen (1995) az első termékenyítés alkalmával az *ad libitum*, de a 2. és 3. inszemináláskor már a korlátozott csoportban figyeltek meg jobb vemhesülést. Coudert és Lebas (1985), illetve Eiben és mtsai (2001) a fialások számának előrehaladtával szintén a korlátozva takarmányozott nyulak fölényét mutatták ki. A 18,5 hetes korban tenyésztésbe vett anyanyulak valamivel jobban vemhesültek, mint az először 15,5 hetesen termékenyített csoport. Coudert és Lebas (1985) eredményeivel szemben a különbség nem volt szignifikáns.

Az alomlétszámot a születési súly egy esetben sem befolyásolta szignifikánsan. A T anyák nagyobb létszámú almokat fialtak, mint az O csoport. 3 he-

tes korban a különbség szignifikáns volt. Ezzel szemben az elválasztás utáni takarmányozásnak nem volt hatása. Velünk szemben *Hartmann és Petersen* (1995) a korlátozva etetett anyák eredményeit találta kedvezőbbnek. A 15,5 hetes korban tenyésztésbe vett csoport szignifikánsan nagyobb almokat fialt, mint a 18,5 hetesen inszemináltak, de a különbségek 3 hetes korra megszűntek.

1. táblázat

Az anyanyulak termelése a felnevelési módtól és a tenyésztésbe-vételi életkortól függően

Tulajdonságok(1)	Születési súly(2)			Nevelő anyák(3)		Takarmányozási mód(4)		1. termékenyítés/hét(5)		SE	
	kicsi (6)	közepes(7)	nagy (8)	1	2	ad libitum	korlátozott(9)	15,5	18,5		
Termékenyített nyulak(10)	139	182	175	259	237	256	240	235	261	—	
Fialások száma(11)	731	790	718	1197	1042	1122	1112	1088	1151	—	
Anyák átl. súlya, g(12)	3929 ^a	3983 ^b	4080 ^c	3921 ^a	4088 ^b	3929 ^a	4068 ^b	4047 ^a	3954 ^b	8,8	
Termékenyítés/fialás(13)	1,27	1,3	1,29	1,28	1,29	1,28	1,29	1,31 ^a	1,26 ^b	0,01	
Alomlét-szám(14)	összes(15)	8,56	8,6	8,62	8,43	8,78	8,66	8,52	8,8a	8,39 ^b	0,06
	élő(16)	8,11	8,19	8,29	8,02	8,39	8,29	8,1	8,37 ^a	8,03 ^b	0,07
	3. hetes(17)	7,5	7,39	7,42	7,33 ^a	7,55 ^b	7,43	7,44	7,45	7,42	0,03
3. hetes alomsúly, g(18)	2815	2884	2890	2834	2898	2813 ^a	2915 ^b	2874	2855	17,1	
3. hetes egyedi súly, g(19)	385 ^a	399 ^b	391 ^{ab}	393	391	387a	397b	393	391	1,95	
Szopóskori elhullás, %(20)	6,45	7,08	7,47	7,48	6,44	7,37	6,64	7,07	6,94	0,3	

^{a b c} a különböző betűvel jelölt csoportok közötti különbség P<0,05 szinten szignifikáns(21)

Table 1.: Performance of does depending on the rearing method and the age of first mating traits(1), birth weight(2), nursing does(3), feeding regime(4), first AI, week(5), low(6), medium(7), high(8), restricted(9), N of does(10), N of kindlings(11), body weight of does (average)(12), N of AI/kindling(13), litter size(14), litter size total(15), litter size alive(16), litter size at 3 weeks of age(17), litter weight at 3 weeks of age, g(18), individual body weight at 3 weeks of age, g(19), mortality of kids, %(20), ^{abc} the difference between groups marked with different superscripts is statistically significant (P<0.05)(21)

Az M anyanyulak 3. és 5. hetes alomsúlya nagyobb volt, mint az L csoporté, de a H nyulak egyiktől sem különböztek szignifikánsan. A T csoport alomsúlya csak annyival volt nagyobb, mint az O csoporté, amennyivel az alomlétszám különbözött. Az R csoportban nagyobb alomsúlyt mértünk, mint az A nyulaknál. A tenyésztésbe-vételi kor hatását azonban nem tudtuk kimutatni. *Poigner és mtsai* (2000) szerint a nagyobb születési súly előnyt jelent. *Hartmann és Petersen* (1995) velünk megegyezően a korlátozott takarmányozás mellett felnevelt nyulaknál nagyobb tejtermelést figyeltek meg. *Eiben és mtsai* (2001), illetve *Coudert és Lebas* (1985) is a korlátozott csoportban mérték nagyobb alomsúlyt.

A három hetes egyedi súlyt csak az anyanyulak születési súlya és a takarmányozás módja befolyásolta szignifikánsan. Úgy tűnik, hogy a születési súly hatásánál közrejátszott, hogy a H csoportban kisebb volt a 3. hetes alomlétszám, és így a közel azonos mennyiségű tejből több jutott egy-egy szopósnyúlnak. A takarmányozás hatása ugyanakkor egyértelműnek tűnik, hisz az R csoport úgy ért el jobb eredményt, hogy az alomlétszáma megegyezett az A nyulakéval.

A szakmailag jelentős különbségek ellenére a nyulak szopóskori elhullását 3 hetes korig egyik tényező sem befolyásolta szignifikánsan.

KÖVETKEZTETÉS

A kísérlet még folyamatban van, korai végső következtetést levonni, de néhány összefüggésre érdemes odafigyelni. Az egy fialáshoz szükséges termékenyítések számát vizsgálva kifejezetten előnyös csoportot nem találtunk. Az alomlétszám szempontjából az a kedvező, ha az anyát korábban két anya szoptatta. A 3. hetes alomsúly (tejtermelés) akkor nagyobb, ha korlátozott takarmányozás mellett neveljük fel a tenyésznövendék nyulakat. A szopóskori jobb tejellátás, illetve a visszafogott ütemű felnevelés, majd a tenyésztésbevitel utáni *ad libitum* takarmányozás egyaránt előnyös az anyanyulak termelése szempontjából.

IRODALOM

- Coudert, P. – Lebas, F.(1985): Production et morbidité des lapines reproductrices. I. Effets du rationnement alimentaire avant et pendant la première gestation. Ann. Zootech., 34. 1. 31–48.
- Eiben, Cs. – Kustos, K. – Kenessey, Á – Virág, Gy. – Szendrő, Zs.(2001): Effect of different feed restriction during rearing on reproduction performance in rabbit does. Wld Rabbit Sci., 9. 1. 9–14.
- Hartmann, J. – Petersen, J.(1995): Vergleichende Untersuchungen zur Reproduktionsleistungen von während der Aufzuchtphase restriktiv und ad libitum gefütterten Zuchthäsinnen. 9th Symp. on Housing and Diseases of Rabbits, Furbearing Animals and Pet Animals, Celle, 97–105.
- Maertens, L.(1992): Rabbit nutrition and feeding: a review of some recent developments. J. Appl. Rabbit Res., 15. 889–913.
- Poigner, J. – Szendrő, Zs. – Lévai, A. – Biró-Németh, E. – Radnai, I.(2000): Effect of birth weight and litter size at suckling age on reproductive performance in does as adults. Wld Rabbit Sci., 8. 3. 103–109.
- Rommers, J.M. – Kemp, B. – Meijerhof, R. – Noordhuizen, J.P.T.M.(1999): Rearing management of rabbit does: a review. Wld Rabbit Sci., 7. 3. 125–138.
- Rommers, J.M. – Meijerhof, R. – Noordhuizen, J.P.T.M. – Kemp, B.(2001): Effect of different feeding levels during rearing and age at first insemination on body development, body composition and puberty characteristics of rabbit does. Wld Rabbit Sci., 9. 3. 101–108.
- Schlotaut, W. – Lange, K.(1979): Kompensatorisches Wachstum bei Jungmastkaninchen. Züchtungskunde, 51. 3. S. 227–233.
- Szendrő, Zs. – Gyarmati, T. – Maertens, L. – Biró-Németh, E. – Radnai, I. – Milisits, G. – Matics, Zs.(2002): Effect of nursing by two does on the performance of suckling and growing rabbits. Anim. Sci., 74. 117–126.
- Szendrő, Zs. – Láng, M. – Szabó, J.(1989): Performance of does in dependence of litter size in which they were born. Állattenyésztés és Takarmányozás. 38. 159–164.
- Tudela, F. – Poujardieu, B. – Gaüzere, J.M.(1998): Productivité de la lapine:préparation des reproducteurs. 7èmes J. Rech. Cunicole, Lyon, 269–271.

Érkezett: 2005. január

Szerzők címe: Gyovai, M – Szendrő, Zs. – Biróné Németh, E. – Radnai, I. – Matics, Zs. –

Authors' address: Gerencsér, Zs. – Princz, Z. – Hom P.: Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar
University of Kaposvár, Faculty of Animal Science
H-7400, Kaposvár, Guba Sándor u. 40.

Maertens, L.: Center for Agricultural Research-Ghent,
Department of Animal Nutrition and Husbandry
Scheldeweg 68, 9090, Melle, Belgium

ELTÉRŐ TAKARMÁNYOZÁSI SZINTEKEN TARTOTT, KÜLÖNBÖZŐ FAJTÁJÚ NŐIVARÚ SERTÉSEK TÜSZŐFEJLŐDÉSE*

EGERSZEGI ISTVÁN — HAZELEGER, WOUTER — RÁTKY JÓZSEF — SÁRLÓS PÉTER —
KEMP, BAAS — BOUWMAN, EMMY — BRÜSSOW, KLAUS-PETER — SOLTI LÁSZLÓ

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők az ivari ciklus 20. napján elemezték a petesejtek intrafollikuláris fejlődését és preovulációs maturációs fokának összefüggéseit, különböző energiaértékű takarmányozást követően mangalica (M, n=17) és magyar nagyfehér x lapály (MNFxML, n=20) kocasüldőkben. Az állatokat két etetési csoportba osztották, az alacsony (AT) energiaértékű takarmányozás esetén 1,25 kg, a magas estén (MT) 2,5 kg (DE 12,7 MJ/kg) volt a napi takarmányadag. Az állatok ivari ciklusát Regumate®-tal és PMSG-vel szinkronizálták. Az ovulációt 80 órával a PMSG kezelést követően hCG-vel indukálták. A kísérlet alatt a tüszőfejlődést ultrahangos vizsgálattal követték nyomon. 34 órával a hCG kezelés után endoszkópos petesejt és tüszőfolyadék kinyerést hajtottak végre. A kumulusz-petesejt-komplexek morfológiáját sztereo mikroszkóp alatt 60x-os nagyításban vizsgálták. A petesejteket fixálták és megfestették nukleáris érettségük későbbi vizsgálatára. A sejteket érettségük szerint csoportokba sorolták: 1) meiózis folytatása – GV lebomlása, diakinézis M-I – A-I és 2) érett – T-1 és M-II. A tüszőfolyadék minták 17 β -ösztadiol (E2) és progeszteron (P4) koncentrációját radio-immuno assay (RIA) módszerrel határozták meg.

Szignifikáns különbséget mutattak ki a preovulációs tüszők számában a MNF \times ML kocasüldőkben az eltérő etetési csoportok között, ezzel ellentétben a M-ra nem gyakorolt hatást a takarmányadag csökkentése. A tüszők növekedését nem befolyásolta a takarmányozás, átmérőjük azonban nagyobb volt a M kocasüldőkben.

Nem található különbség a kromatin szerkezet alakulásában a két fajta között. A MNF \times ML-ban 69,8 (MT) és 66,7% (AT), a M-ban 66,7, ill. 62,5% volt az érett petesejtek aránya. A tüszőfolyadék E2 tartalma közel 2x olyan magas volt a mangalicában (29,6 \pm 6,8 és 30,9 \pm 10,3 ng/ml), mint a MNF \times ML kocasüldőkben (16,9 \pm 9,7 és 17,9 \pm 3,6 ng/ml; P<0,01). A follikuláris P4 koncentrációja a L-hoz képest (386,2 \pm 113,7 és 298,8 \pm 125,9 ng/ml) 4–5x-ös értékeket mutatott a M-ban (2020,4 \pm 1056 és 1512,2 \pm 1121,8 ng/ml; P<0,01).

Az eredmények azt mutatják, hogy az eltérő energia tartalmú takarmányozás befolyásolja a növekvő tüszők számát a MNF \times ML fajtában, míg a M-ra nincs hatással. A tüszőfolyadék szteroid hormon tartalma is eltérően alakult a két fajtában, viszont a takarmányozás azt nem befolyásolta. A petesejtek érésére nem volt hatással az eltérő energiaértékű takarmányozás.

SUMMARY

Egerszegi, I. – Hazeleger, W. – Rátky, J. – Sárlos, P. – Kemp, B. – Bouwman, E. Ms. – Brüssow, K. P. – Solti, L.: FOLLICULAR DEVELOPMENT IN GILTS FROM DIFFERENT BREEDS AFTER FEEDING WITH DISTINCT ENERGY LEVELS

Comparison of follicular development and oocyte quality were carried out in Mangalica (M) and Hungarian Large White x Hungarian Landrace (HLW x HL) gilts after feeding with different energy levels. The two feeding groups were high ratio (HI; 2.5 kg) and low ratio (LO; 1.25 kg DE=12.7 MJ/kg). Oestrus of the animals (M; n=17 and HLW x HL; n=20) was synchronized by Altrenogest and eCG. 80 hours later ovulation was induced by hCG. During the treatment the follicular development was observed by ultrasonographic method. 34 hours after hCG endoscopic ovum-pick up was performed and follicular fluid was collected to analyse oestradiol (E2) and progesterone (P4) contents of it by RIA. The cumulus morphology was determined after recovery, thereafter the oo-

* OTKA-NWO N37318 projekt támogatásával végeztük

cytes were fixed, stained and their chromatin configuration was evaluated. The oocytes were classified as 1) resumption of meiosis – germinal vesicle breakdown, M-I – A-I or 2) mature – T-I and M-II.

HLW x HL gilts with high energy level had significantly higher ovulation rate, than in low feeding level gilts, in front of this the nutrition had no effect on number of preovulatory follicles in M. The feeding level did affect on follicular development in both breeds, but the diameter of the preovulatory follicles was higher in M. There was no difference between breeds and feeding groups in oocyte quality too. The percent of mature oocyte was 69.8 (HI) and 66.7% (LO) in HLW x HL compared to 66.7 (HI) and 62.5% (LO) in M gilts. The steroid hormones content of the follicular fluid was diverse between breeds, but the concentrations were not influenced by feeding level. The E2 concentration was 2 fold higher in M (29.6 ± 6.8 and 30.9 ± 10.3 ng/ml) than in HLW x HL (16.9 ± 9.7 and 17.9 ± 3.6 ng/ml; $P < 0.01$). Furthermore P4 concentration reached 4–5 fold greater level in M (2020.4 ± 1056 – HI and 1512.2 ± 1121.8 ng/ml – LO) compared to HLW x HL (386.2 ± 113.7 – HI and 298.8 ± 125.9 ng/ml – LO; $P < 0.01$).

It was concluded that feeding level affected in ovulation rate in HLW x HL, whereas it had no effect in M. The steroid hormone concentrations were different between breeds, but it was not influenced by nutrition. The oocyte maturation was similar in both breeds independently from feeding group.

BEVEZETÉS

A sertéstenyésztés célja a nőivarú egyedek szaporasági mutatóinak folyamatos javítása. A kocák szaporodóképességét, ezáltal a termelés gazdaságosságát jelentősen befolyásolja az ivar- és tenyészerettség ideje, az ovulációs ráta, az embrionális veszteség mértéke, a születési és választási alomnagyság, a választás-újra ivarzás közt eltelt napok száma és a kocák életteljesítménye. A fajtán és a környezeti, tartástechnológiai faktorokon kívül a takarmányozás jelentős befolyással bír ezeknek a tulajdonságoknak az alakításában, (*Han és mtsai, 2000; Stalder és mtsai, 2004*). A termelési színvonal emelkedése maga után vonja a takarmányozás szintjének változását is. Az inadekvát takarmánybevitel hatással van a szaporodásra: a pubertás késik; hosszabbodik a választás-újraivarzás között eltelt idő, csökken az ovulációs ráta, illetve csökken, vagy nő az embrionális túlélés (*Prunier és Quesnel, 2000ab*).

Jelen kísérletben az extenzív fajtának tekinthető mangalica és az intenzív lapály kocasüldők eltérő energia értékű takarmányozás hatására adott válaszreakcióját vizsgáltuk a tüszőfejlődés és petesejtérés vonatkozásában.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérleteket az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet Modelltelepén végeztük. Összesen 17, egyedileg elhelyezett mangalica kocasüldő (11–12 hónapos, 95–105 kg-os), illetve 20 magyar nagyfehér x lapály (MNFxL) kocasüldő (7–8 hónapos, 95–100 kg-os) ivari ciklusát szinkronizáltuk Regumate®-tal (15 nap 20 mg/állat, Hoechst-Roussel) és 1000 NE PMSG-vel (Folligon, Intervet). 80 órával a PMSG kezelés után applikált 750 NE hCG-vel (Choriogonin, Richter Gedeon) ovuláció indukciót végeztünk. Mindkét fajta egyedeit két etetési csoportba osztottuk. A korábbi 2,5 kg/nap fejadagot, a szinkronizálás megkezdésével egyidejűleg az alacsony szintű takarmányozásnál (AT) 1,25 kg-ra csökkentettük ($n=8$, ill. 10), míg a magasnál ($n=9$, ill. 10) (MT) megmaradt az eredeti 2,5 kg-os szint (DE 15,9 ill. 31,8 MJ/nap) volt a napi

takarmányadag. A tüszőfejlődést ultrahangos eljárással követtük nyomon. Az endoszkópos petesejt kinyerést a hCG injektálás után 34 órával végeztük *Rátky és mtsai* (1998) által leírt módon. Az 5 mm-nél nagyobb tüszőket pungáltuk a bal petefészken, a folliculusokat kétszer öblítettük át, illetve szívtuk le heparinos PBS oldattal. A kontralaterális petefészkekből tüszőfolyadék mintákat gyűjtöttünk ösztradiol és progeszteron analízishez. A frissen kinyert kumulusz-petesejt-komplexek (COC) morfológiáját sztereomikroszkóp alatt 60x-os nagyításban vizsgáltuk. A COC-okat kompakt és expandált csoportba soroltuk. Az osztályozást követően a petesejteket fixáltuk, nukleáris érettségük későbbi vizsgálatára. A COC-et először a kumulusz sejtektől fosztottuk meg a sejtek többszöri pipetázásával 100 NE/ml hialuronidáz tartalmú PBS oldatban. A sejteket tárgylemezen fixáltuk ecetsav/alkohol/kloroform (3:6:1) keverékkel minimum 24 óráig. Értékelés előtt 2%-os orceinnel festettük 60%-os ecetsavban. A petesejtek nukleáris konfigurációját fázis-kontraszt mikroszkóp alatt 250–630x-os nagyításban vizsgáltuk. A sejteket érettségük szerint a következő csoportokba soroltuk 1) meiózis *Turner és mtsai*, 1998). A tüszőfolyadék minták 17β -ösztradiol (E2) és progeszteron (P4) koncentrációját RIA módszerrel határoztuk meg. Az így kapott adatok statisztikai feldolgozását Windows SAS System 8.02-vel (*SAS Institute*, 1999) végeztük.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A kísérletben a MNF \times ML süldőkben szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) tapasztaltunk a preovulációs tüszők számában az etetési csoportok között, ezzel ellentétben a mangalica süldőkre nem gyakorolt hatást a takarmányadag csökkentése. Prepuberális süldőkben korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a takarmányadag csökkentése nem befolyásolja az első ivarzáskor a levált petesejtek számát (*Etienne és mtsai*, 1983; *Beltranena és mtsai*, 1991). Ezzel ellentétben, a ciklizáló süldőkben, az alultakarmányozás hatására alacsonyabb ovulációs rátát írtak be több tanulmányban (*Cox és mtsai*, 1987; *Flowers és mtsai*, 1989; *Ashworth*, 1991). Jelen kísérletben átlagosan $32,3 \pm 10,5$ és $17,1 \pm 12,3$ preovulációs tüszőt számoltunk a magas és alacsony takarmányadaggal etetett lapály süldőkben. A mangalicákban $25,3 \pm 2,9$ és $25,8 \pm 7,3$ tüszőt jegyeztünk fel. A hormonális beavatkozás mindkét fajtában szuperovulációs reakciót eredményezett a MT csoportban, az AT süldők esetében viszont csak a mangalicákban. *Rátky és mtsai* (2001) eltérő dóziszú PMSG használatával szuperovulációs reakciót tapasztaltak fecskehasú mangalica kocasüldőkben. Az exogén eredetű gonadotropok azonban nem minden esetben stimulálják ilyen mértékben a tüszők növekedését mangalicában. Korábbi vizsgálataink során 1000 NE PMSG hatására $6,8 \pm 1,4$, illetve $10,3 \pm 1,5$ sárgatestet jegyeztünk fel (*Egerszegi és mtsai*, 2001, 2003), ami a sponatán ivarzásban tapasztalt értékekkel egyezik meg (*Bulatovici*, 1932; *Rátky és Brüssow*, 1998). A tüszőfejlődést ultrahangos eljárással követtük nyomon, aminek az eredményeit az 1. táblázat foglalja magába. Fajtán belül nem tapasztaltunk eltérést az etetési csoportok közt, viszont a preovulációs tüszők mérete nagyobbak bizonyult a mangalicában lapályhoz viszonyítva. A petesejteket kromatin szerkezetük alapján a következő csoportokba soroltuk: 1) érett 2) meiózis újraindulása. Az érett petesejtek arányát te-

kintve nem mutatható ki szignifikáns különbség a fajták, illetve a takarmányozási csoportok közt. A MNF x ML süldőkben a petesejtek 70, illetve 67%-ának, a mangalicákban 67%, illetve 63%-nak volt érett kromatin szerkezete.

1. táblázat

A preovulációs tüszők száma, ill. a növekvő tüszők méretének változása

Takarmányadag(1)	MNF x ML(6)		Mangalica	
	magas(7)	alacsony(8)	magas(7)	alacsony(8)
Tüszők száma(2)	32,3±10,5 ^a	17,1±12,3 ^b	25,3±2,9	28,8±7,3
Tüsző átmérő, mm(3)				
UH 1(4)	2,2±0,3	2,2±0,5	2,2±0,2	2,1±0,1
UH 2(4)	4,0±0,5	4,0±0,4	5,1±0,3	5,0±0,4
UH 3(4)	5,0±0,5	5,2±0,7		
34 h-val a hCG után(5)	5,7±0,7 ^a	5,5±0,8 ^a	7,1±0,9 ^b	6,9±1,1 ^b

^{ab} P<0,05

Table 1.: Number of the preovulatory follicles and the size of growing follicles during treatment feeding(1), number of the preovulatory follicles(2), diameter of the follicles(3), ultrasound observation(4), 34 hours after hCG injection(5), HLW x HL(6), high feeding level(7), low feeding level(8)

A MNF x ML kocasüldőkben az érett maganyaggal rendelkező petesejtek aránya más szerzők eredményeihez hasonlóan alakult (Xie és mtsai, 1990; Torner és mtsai, 1998), azonban a mangalicában csaknem két-két és félszerese volt ez az érték a korábban leírtaknak (Egerszegi és mtsai, 2001). A tüszőfolyadék E2 és P4 koncentráció értékeit a 2. táblázat szemlélteti. Mindkét hormon koncentrációjában szignifikáns különbséget figyeltünk meg a fajták között, amit feltehetően a takarmányozás szintje nem befolyásolt. A mangalicában tapasztalt magas koncentráció értékek oka még tisztázásra szorul.

2. táblázat

A tüszőfolyadék E2 és P4 koncentrációjának alakulása

Takarmányadag(1)	MNF x ML(4)		Mangalica	
	magas(5)	alacsony(6)	magas(5)	alacsony(6)
E2 ng/ml(2)	16,9±9,7 ^a	17,9±3,6 ^a	29,6±6,8 ^b	30,9±10,3 ^b
P4 ng/ml(3)	386,2±113,7 ^a	298,8±125,9 ^a	2020,4±1056 ^b	1512,2±1121,8 ^b

^{ab} P<0,01

Table 2.: Oestradiol and progesterone concentration of the follicular fluid feeding(1), oestradiol concentration(2), progesterone concentration(3), landrace(4), high feeding level(5), low feeding level(6)

KÖVETKEZTETÉSEK

Az eredmények jelzik, hogy a takarmányozás szintje jelentősen befolyásolja a növekvő tüszők számát a lapály süldőkben, ezzel ellentétben nincs hatással a mangalica süldőkre. A tüszőnövekedésre egyik fajtában sem gyakorolt hatást a takarmányozás. Mivel a kísérleti állatok ciklusát szinkronizáltuk, Almeida és mtsai (2000) tapasztalatához hasonlóan, feltehető, hogy a szintetikus progesztagén (Regumate) és a petefészken esetlegesen előforduló sárgatestek együttesen szupresszállhatják a tüszőnövekedést.

IRODALOM

- Almeida, F.R.C.L. – Kirkwood, R.N. – Aherne, F.X. – Foxcroft, G.R.(2000): Consequences of different patterns of feed intake during the estrous cycle in gilts on subsequent fertility. *J. Anim. Sci.*, 78. 1556–1563.
- Ashworth, C.J.(1991): Embryo development. *Pig News Info.*, 12. 551–554.
- Beltranena, E. – Foxcroft, G.R. – Aherne, F.X. – Kirkwood, R.N.(1991): Endocrinology of nutritional flushing in gilts. *Can. J. Anim. Sci.*, 71. 1063–1071.
- Bulatovici, G.T.(1932): Beitrag zum Studium der Ursachen der geringen Fruchtbarkeit beim Mangalitzaschwein. *Diss., Ref. Züchtungskunde*, 7. 21.
- Cox, N.M. – Stuart, M.J. – Althen, T.G. – Bennett, W.A. – Miller, H.W.(1987): Enhancement of ovulation rate in gilts by increasing dietary energy and administering insulin during follicular growth. *J. Anim. Sci.*, 64. 507–516.
- Egerszegi, I. – Schneider, F. – Rátky, J. – Soós, F. – Solti, L. – Manabe, N. – Brüssow, K.-P.(2003): Comparison of luteinizing hormone and steroid hormone secretion during the peri- and post-ovulatory periods in Mangalica and Landrace gilts. *J. Repr. Develop.*, 49. 4. 291–296.
- Egerszegi, I. – Torner, H. – Rátky, J. – Brüssow, K.-P.(2001): Follicular development and preovulatory oocyte maturation in Hungarian Mangalica and Landrace gilts. *Arch. Tierz.* 44. 413–419.
- Etienne, M. – Camous, S. – Cuvillier, A.(1983): Effets de restrictions alimentaires pendant la croissance des truies sur leur maturité sexuelle et leur reproduction ultérieure. *Reprod. Nutr. Dev.*, 23. 309–319.
- Flowers, B. – Martin, M.J. – Cantley, T.C. – Day B.N.(1989): Endocrine changes associated with dietary-induced increase in ovulation rate (flushing) in gilts. *J. Anim. Sci.*, 67. 771–778.
- Han, K. – Bosi, P. – Hyun, Y. – Kim, J.D. – Sohn, K.S. – Kim, S.W.(2000): Recent advances in sow nutrition to improve reproductive performance. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 13 Special Issue 335–355.
- Prunier, A. – Quesnel, H.(2000a): Influence of nutritional status on ovarian development in female pigs. *Ann. Reprod. Sci.*, 60–61. 185–197.
- Prunier, A. – Quesnel, H.(2000b): Nutritional influences on the hormonal control of reproduction in female pigs. *Lives. Prod. Sci.*, 63. 1–16.
- Rátky, J. – Brüssow, K.-P.(1998): Ovarian activity in gilts including some characteristics of a native breed. *Reprod. Dom. Anim.*, 33. 219–222.
- Rátky, J. – Brüssow, K.-P. – Solti, L.(1998): Endoscopic methods in swine reproductive research: A review. *Acta Vet. Hung.*, 46. 487–492.
- Rátky, J. – Brüssow, K.-P. – Solti, L. – Torner, H. – Sarlós, P.(2001): Ovarian response, embryo recovery and results of embryo transfer in a Hungarian native pig breed. *Theriogenology* 56. 969–78.
- SAS Institute Inc.(1999): SAS/STAT User's Guide, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Stalder, K.J. – Knauer, M. – Baas, T.J. – Rotschild, M.F. – Mabry, J.W.(2004): Sow longevity. *Pig News Inf.*, 25. 2. 53–74.
- Torner, H. – Brüssow, K.-P. – Alm, H. – Rátky, J.(1998): Morphology of porcine cumulus-oocyte-complexes depends on the stage of preovulatory maturation. *Theriogenology*, 50. 39–48.
- Xie, S. – Broermann, D.M. – Nephew, K.P. – Bishop, M.D. – Pope, W.F.(1990): Relationship between oocyte maturation and fertilization on zygotic diversity in swine. *J. Anim. Sci.*, 68. 2027–2033.

Érkezett: 2005. január

Szerzők címe: Egerszegi, I. – Rátky, J. – Sarlós, P.:

Authors' address: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.

Hazeleger, W. – Kemp, B. – Bouwman, E.: Agricultural University
NL-6700 Wageningen, Hollandia

Brüssow, K.-P.: Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere
D-18196 Dummerstorf, Németország

Solti, L.: Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Szent István University, Faculty of Veterinary Science
H-1400 Budapest, Pf. 2.

A FELNEVELÉSI MÓD HATÁSA AZ ANYANYULAK ÉLETTARTAMÁRA*

(ELŐZETES EREDMÉNYEK)

GYOVAI MÓNIKA — MAERTENS, LUC — NAGY ISTVÁN — BIRÓNÉ NÉMETH EDIT —
RADNAI ISTVÁN — PRINCZ ZOLTÁN — GERENCSÉR ZSOLT — SZENDRŐ ZSOLT

ÖSSZEFOGLALÁS

A vizsgálat célja annak megállapítása volt, hogy a magzati élet és a szoptatás alatti, valamint az elválasztás utáni táplálóanyag ellátottság, illetve a tenyésztésbe-vételi életkor hogyan befolyásolja az anyanyulak várható élettartamát.

A kísérletben résztvevő 784 nyulat születési súlyuk alapján három csoportba osztották. Az alмок egyik felét egy, a másik felét két anya szoptatta. 21 napos elválasztást követően a nyulak egyik felét *ad libitum* (A), másik felét az *ad libitum* 80–85%-ára korlátozva (R) takarmányozták. A tenyésznövendék nyulak mindegyik csoportját megfelelően, 15,5 vagy 18,5 hetes életkorban termékenyítették először. Az első termékenyítés előtti 4. naptól mindegyik anyanyulat *ad libitum* takarmányozták. Az egyes vizsgálati csoportok megmaradási arányát a túlélés függvénye ($S(t)$) felhasználásával elemezték (Kleinbaum, 1996). A csoportokat 108 napos kortól további 915 napig figyelték. Az egyes túlélés görbék közötti eltérések szignifikancia vizsgálatához a Log-Rank tesztet (Kleinbaum, 1996) alkalmazták.

Az anyanyulak túlélése független volt a születési súlytól. A két anyával nevelt, és az R csoport valamivel jobb eredményt ért el (41,6 és 42,1%, $P=0,31$ és $P=0,11$), mint az egy anyával neveltek és az A csoport egyedei (37,5 és 36,8%). A 15,5 hetes életkorban termékenyített anyanyulak túlélése rosszabb volt, mint a 18,5 hetesen tenyésztésbe vett társaiké (35,1 és 43,2%). A nevelő anyák és a takarmányozás együttes hatása nem volt szignifikáns ($P=0,27$), de figyelemre méltó az egy anyával nevelt A csoport gyengébb eredménye (33,1%) a másik három csoporthoz viszonyítva (40,3–42,3%). A takarmányozás és az első termékenyítés együttes értékelésekor közel szignifikáns hatást ($P=0,069$) mutattak ki. Az A csoport 15,5 hetesen tenyésztésbe vett nyulai rosszabb eredményt értek el (29,6%), mint az R csoport 15,5 hetesen (39,2%), valamint az A és R csoport 18,5 hetesen termékenyített egyedei (42,9 és 43,6%).

Az eredmények alapján megállapítható, hogy az anyanyulak túlélése szempontjából egyik tényező hatása sem szignifikáns, de a két anyával nevelt, tenyésztésbevételeig korlátozottan takarmányozott és 18,5 hetesen tenyésztésbe vett anyanyulak valamivel hosszabb ideig élnek.

SUMMARY

Gyovai, M.Ms. – Maertens, L. – Nagy, I. – Biró-Németh, E.Ms. – Radnai, I. – Princz, Z. – Gerencsér, Zs. – Szendrő, Zs.: EXAMINATION OF FACTORS INFLUENCING THE SURVIVAL OF RABBIT DOES (PRELIMINARY RESULTS)

The objective of the present analysis was to study the effect of the nutrient supply during foetal life, suckling, subsequent to weaning and the effect of the age at first insemination on the does' cumulative survival rate.

784 newborn rabbits were divided into 3 groups according to their birth weight (BW). Kits of each group were nursed by one (1) or two (2) does (ND) in equal proportion. After weaning at 21 days of age all the groups were halved and then were fed (FR) either *ad libitum* (A) or restricted (R) (i.e. 80–85% of the (A) group). All groups were halved again and the does were first inseminated (AI) at either 15.5 or 18.5 weeks of age. All the does were fed *ad libitum* from the 4th day prior to their insemination. The cumulative survival of the various groups were analysed using the survival function ($S(t)$) (Kleinbaum, 1996). The groups were monitored between the age interval of 108–915

* A kísérlet az OTKA TS 044743 számú pályázat támogatásával valósult meg

days. The log-rank test (Kleinbaum, 1996) was applied to determine the significance of the differences among the survival functions of the various groups.

The cumulative survival of the does was not effected by birth weight. The (ND-2) and the (R) group showed better cumulative survival (41.6% and 41.2%, $P=0.11$) than the (ND-1) and the (A) group (37.5% and 36.8%). Survival rate of the AI-15.5 group was lower compared to the AI-18.5 counterparts (35.1 and 43.2%). The lower performance (33.1%) of the ND-1, A than that of the other three groups (40.3–42.3%) is worth mentioning. Evaluating the effect of feeding regime and age at first insemination simultaneously almost significant differences ($P=0.069$) were found. The A, AI-15.5 does showed lower cumulative survival (29.6%) than the R, AI-15.5 does (39.2%) or the A, AI-18.5; R, AI-18.5 does (42.9, 43.6%). Based on these results it can be concluded that none of the factors (BW, ND, FR and AI) had a significant effect on the cumulative survival but slightly better results were received in the group of ND-2, R, and AI-18.5.

BEVEZETÉS

A nyúltenyésztés sikerességét alapvetően meghatározza a különböző korosztályú nyulak elhullása. A szopós, a növendék és az anyanyulak kiesése általában más-más okokkal magyarázható, de bizonyos esetekben, egy korábbi időszakban ért hatások is befolyással lehetnek a későbbi időszak túlélési esélyére. A feldolgozás során azt vizsgáljuk, hogy a különböző életszakaszok alatti táplálóanyag-ellátottság hogyan befolyásolja az anyanyulak túlélési arányát.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérleteket a Kaposvári Egyetem kísérleti telepén Pannon fehér nyulakkal végeztük. Az állatokat zárt épületben, egyszintes, ponthegeesztett ketrecekben helyeztük el. Az istállót télen fűtöttük, a hőmérséklet minimum 16 °C-os volt. Nyáron nem volt klimatizáció, ezért a hőmérséklet esetenként elérte a 28 °C-ot. A megvilágítás egész évben 16 óra világos és 8 óra sötét volt.

Az egynapos nőivarú nyulakat három csoportba (kis=35–45 g, közepes=53–58 g, nagy=65–70 g) osztottuk. Minden alomba 8 fiókát helyeztünk. A három csoportot megféleztük, és az almok felét hagyományosan egy, a másik felét két anya szoptatta.

A hat csoportot ismét megféleztük, a nyulak egyik felét *ad libitum* (A), a másik felét 28 napos kortól korlátozva (R) takarmányoztuk. Az *ad libitum* fogyasztás 80–85%-ára történő korlátozást, a takarmányfelvételtre rendelkezésre álló idő csökkentésével értük el. Mind a 12 csoportot ismét megféleztve, az anyanyulak egyik felét 15,5, a másik felét 18,5 hetes korban termékenyítettük először. Az ezt megelőző 4. naptól az anyanyulakat *ad libitum* takarmányoztuk.

Az egyes vizsgálati csoportok életben-maradási arányát a túlélés függvény ($S(t)$) felhasználásával elemeztük (Kleinbaum, 1996), mely annak a valószínűségét adta meg, hogy a megfigyelés kezdetétől számított „t” idővel (nappal) az elhullás még nem következett be. Az egyes csoportokat tenyésztésbe vételtől (15,5 vagy 18,5 hetes kor) további 915 napig figyeltük. Összesen 539 anyanyúl túlélését értékeltük. Az egyes túlélés görbék közötti eltérések szignifikancia vizsgálatához a Log-Rank tesztet (Kleinbaum, 1996) alkalmaztuk. A kísérlet még folyamatban van, ezért a túlélési görbe és a túlélési arány nem egyezik meg.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az egyes csoportok túlélési aránya az 1. táblázatban látható.

Az anyanyulak túlélése független volt a születési súlytól. Több tényező esetében a csoportok között kisebb, de nem szignifikáns különbség alakult ki. Ezekre a tendenciákra azonban érdemes odafigyelni. A két anyával nevelt, és az R csoport valamivel jobb eredményt ért el (41,6 és 42,1%, $P=0,31$ és $P=0,11$), mint az egy anyával neveltek és az A csoport egyedei (37,5 és 36,8%). Habár a 15,5 hetes életkorban termékenyített anyanyulak túlélése rosszabb volt, mint a 18,5 hetesen termékenyített társaik (35,1 és 43,2%), de ez a tényező sem befolyásolta szignifikáns mértékben a túlélést ($P=0,28$).

1. táblázat

A felnevelési mód és a tenyésztésbe-vételi kor hatása a túlélési arányra

	Születési súly (1)			Nevelő anyák (2)		Takarmányozás (3)		1. termékenyítés/hét(4)	
	kicsi (5)	közepes (6)	nagy (7)	1	2	<i>ad libitum</i>	korlátozott(8)	15,5	18,5
Anyanyulak tenyésztésbe-vételkor(9)	150	196	193	280	259	265	274	250	289
Túlélési arány, %(10)	38,3	40,0	40,0	37,5	41,6	36,8	42,1	35,1	43,2
P	0,72			0,31		0,11		0,28	

Table 1.: Effect of rearing method and the age of does at first mating on their survival rate birth weight(1), nursing does(2), feeding regime(3), first AI, week(4), low(5), medium(6), high(7), restricted(8), N of does(9), survival rate(10)

A nevelő anyák és a takarmányozás együttes hatása nem volt szignifikáns ($P=0,27$), de figyelemre méltó, hogy az egy anyával nevelt A csoport, amely a gyakorlatban is alkalmazott felnevelési módnak felel meg, gyengébb eredményt ért el (33,1%), mint a másik három csoport (40,3–42,3%). A takarmányozás és az első termékenyítés együttes értékelésekor közel szignifikáns hatást ($P=0,069$) kaptunk. Az A csoport 15,5 hetesen tenyésztésbe vett nyulai hátrányban voltak (29,6%). Az R csoport 15,5 hetes életkorban (39,2%), valamint az A és R csoport 18,5 hetesen termékenyített nyulainak (42,9 és 43,6%) eredménye hasonlóan alakult.

A két anyás nevelés már szopós (*Spencer és mtsai*, 1985) és vágási életkorban (*Gyarmati és mtsai*, 2000) is szignifikánsan növeli a teljes test zsírtartalmát. A felnevelés alatti takarmánykorlátozás utáni *ad libitum* etetés is kedvezően befolyásolhatja a kondíciót. Feltevésünk szerint a jobb kondíció (több zsírtartalom) előnyös a hosszabb ideig tartó termelés szempontjából. *Xiccato* (1996) kimutatta, hogy az először vemhes és szoptató anyák negatív energiaegyensúlyi állapotban vannak. *Milisits és mtsai* (1999) szerint később is jelentős a vemhesség és a szoptatás alatt a zsírtartalom veszteség. A jobb kondícióban lévő nyulakban ez az energiaveszteség kevésbé lehet hátrányos.

KÖVETKEZTETÉS

Az anyanyulak túlélése szempontjából egyik tényező hatása sem meghatározó, de figyelemre méltó, hogy a két anyával nevelt, tenyésztésbe vételig korlátozottan takarmányozott és 18,5 hetesen tenyésztésbe vett anyanyulak valamivel hosszabb ideig élnek.

A kísérlet még nincs befejezve, sok a még termelő (élő) anyanyúl, ezért a későbbiekben még megbízhatóbb eredmények várhatók.

IRODALOM

- Gyarmati, T. – Szendrő, Zs. – Maertens, L. – Miiisits, G. – Biró-Németh, E. – Radnai, I. – Matics, Zs.* (2000): Effect of suckling twice a day on the performance of suckling and growing rabbits. *Wild Rabbit Sci.*, 8. Suppl. 1. 283–290.
- Kleinbaum, D.G.* (1996): *Survival Analysis. A Self-Learning Text.* Springer-Verlag. New York
- Miiisits, G. – Romvári, R. – Dalle Zotte, A. – Szendrő Zs.* (1999): Non-invasive study of changes in body composition in rabbits during pregnancy using X-ray computerized tomography. *Ann. Zootech.*, 48., 25–34.
- Spencer, S.A. – Vinter, J. – Hull, D.* (1985): The effect in newborn rabbits of overfeeding on fat deposition, gross energetic efficiency, and metabolic rate. *Pediatric Res.*, 19. 1. 127–130.
- Xiccato, G.* (1996): Nutrition on lactating does. 6th Wild Rabbit Congr., Toulouse, 1. 29–47.

Érkezett: 2005. január

Szerzők címe: Gyovai, M. – Nagy, I. – Biróné Németh, E. – Radnai, I. – Princz, Z.–

Authors' address: Gerencsér, Zs. – Szendrő, Zs.: Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar
University of Kaposvár, Faculty of Animal Science
H-7400, Kaposvár, Guba Sándor u. 40.
Maertens, L.: Center for Agricultural Research-Ghent,
Department of Animal Nutrition and Husbandry
Scheldeweg 68, 9090, Melle, Belgium

A NÖVEKEDÉSI HORMON GENOTÍPUS (ALU-I POLIMORFIZMUS) HATÁSA AZ ELLÉS UTÁNI ELSŐ OVULÁCIÓ IDEJÉRE HOLSTEIN-FRÍZ TEHENEKBEN*

BALOGH ORSOLYA — KOVÁCS KATALIN — KULCSÁR MARGIT —
GÁSPÁRDY ANDRÁS — ZSOLNAI ATTILA — REICZIGEL JENŐ — KÁTAI LEVENTE —
FÉSÜS LÁSZLÓ — HUSZENICZA GYULA

ÖSSZEFOGLALÁS

Szarvasmarhában a növekedési hormonnak (STH) két allélváltozata ismeretes aszerint, hogy az aminosav-szekvencia 127. pozíciójában leucin (L) vagy valin (V) található. A különböző genotípusú (LL, LV, VV) állatok tejtermelésében esetenként jelentős különbségek mutakozhatnak. A nagyobb tejtermelésre irányuló szelekció a szaporodási mutatók romlását, elsősorban az ellés utáni (pp) aciklia meghosszabbodását eredményezte. Mind ez ideig tisztázatlan volt azonban, hogy az STH-genotípus hatással van-e a pp első ovuláció időpontjára. A munka keretében öt telep összesen 341 holstein-fríz (HF) tehenén vizsgálták az STH-genotípus, az üzem, az ellésszám (első ellésű, ill. többször ellett), az első 5 héten megfigyelt kondíciópont-csökkenés (BCS) (Δ BCS) mértékét (kategóriák: 1=<0,50 pont, 2=0,50–1,00 pont, 3=>1,00 pont) és az akut putrid endometritis (APE; súlyos általános klinikai tünetekkel járó esetek kizárva) hatását a tejtermelésre (FPCM_{15,30}: 15. és 30. napi, zsír- és fehérje arányát tejtermelés), illetve a pp aciklia egyedi progeszteron profilok alapján megállapított hosszára.

Az állatok 79,4%-a volt leucin-homozigóta (LL), míg 19,4%-a a heterozigóta (LV), 1,2%-a pedig a valin homozigóta (VV) haplotípust képviselte. A statisztikai elemzéshez az LV és VV állatokat, mint valin allélt hordozókat (LV+VV) egy csoportba vonták össze. Az ellés utáni 35. napig összesen 245 állat petefészkek-működése vált ciklikussá: az LL genotípusúakból 68,4%, az LV+VV csoportból pedig 84,3% ($P=0,033$). Az átlagos BCS-csökkenés mértéke az LV+VV csoportban kisebb volt, mint az LL csoportban ($0,48 \pm 0,05$, ill. $0,59 \pm 0,03$ pont; $P=0,025$), és genotípus-függő különbségeket találtak az egyes kategóriák megoszlásában is ($P=0,002$). Az LL állatok kb. fele, az LV+VV csoportnak pedig a 64%-a csupán kismértékű (Δ BCS: <0,50), ezzel szemben 14, ill. 7%-uk kifejezett (Δ BCS: >1,00) kondícióromlás jeleit mutatta. Ugyanakkor nem volt lényeges genotípus-függő különbség a pp aciklia átlagos tartamában, az APE előfordulási arányában (LL: 14%, LV+VV: 10%; $P=0,514$, $\text{Chi}^2=0,43$), valamint a tejtermelésben.

Az eredmények megmutatták, hogy a valin allélt hordozó egyedeknél lényegesen kisebb a kondícióvesztés mértéke az ellés utáni első 30 napban, vagyis az energia-egyensúly zavara nem olyan nagy mértékű, mint leucin homozigóta társaiknál. Szignifikánsan több állatban történt tüszőrepedés az ellést követő 35 napon belül a valin allélt hordozó csoportból, mivel a negatív energiámérleg mélypontján hamarabb túljutott állatokban az ellés utáni első ovuláció is hamarabb következik be. Vizsgálatokból az a következtetés vonható le, hogy HF tehenekben az STH Alu-I polimorfizmus az ellés utáni metabolikus és endokrinológiai adaptációt befolyásoló egyik lényeges elem, amely a szárazanyag-felvétel és/vagy a tápanyag-hasznosulás mértékét, vagy esetleg a laktációs görbe alakulását befolyásolhatja, és ezen keresztül hat a szervezet energia-egyensúlyának változására és a szaporodásbiológiai mutatókra.

SUMMARY

Balogh, O.Ms. – Kovács, K.Ms. – Kulcsár, M.Ms. – Gáspárdy, A. – Zsolnai, A. – Reiczigel, J. – Kátai, L. – Fésüs, L. – Huszenicza, Gy.: POSSIBLE ROLE OF THE STH GENOTYPE (ALU-I POLYMORPHISM) IN THE LENGTH OF POSTPARTUM (PP) ACYCLIC PERIOD IN DAIRY COWS

The interrelations of herd, parity, body condition score loss, growth hormone genotype (LL, LV, VV haplotypes; Alu-I polymorphism), incidence of acute putrid endometritis, milk production and the

* A kutatást az OTKA-T/46 826 támogatta

length of postpartum acyclic period were studied in 341 Holstein-Friesian cows. The majority of the cows belonged to the LL genotype (n=271, 79.4%), while 19.4% (n=66) to the LV, 1.2% (n=4) to the VV haplotypes. During the first 35 days after calving 245 animals became cyclic, 68.4% of the LL, 84.3% of the LV and VV haplotypes (P=0.033). No significant differences in the mean length of pp acyclicity or in milk yield were found regarding genotypes. The degree of BCS loss in the first 30 days influences the time of first ovulation after calving: >1.0 BCS loss prolonged the postpartum acyclic period (58.7±2.5 days; P<0.001). Genotype groups showed great differences in the mean values of BCS loss (0.59±0.03 for LL versus 0.48±0.05 unit loss for LV+VV). The frequencies of BCS loss categories differed significantly between haplotypes, as well: approximately half of the animals of the LL genotype belonged to category 1 (BCS loss <0.5 score), while 64.3% represented the V allele group. A significantly lower number of the V allele carriers (7.1%) were present in category 3 (BCS loss >1.0 unit) versus LL homozygotes (14.0%).

In this study the valine allele carrying animals resulted in significantly smaller degree of BCS loss during the first 30 days pp indicating a less disturbed energy balance than leucine homozygotes. Significantly more cows ovulated from the valine carrier group within a 35-day time period after calving allowing us to suppose that they must have passed the nadir of negative energy balance (NEB) earlier. Finally we may conclude that in Holstein Friesian cows *Alu-I* polymorphism of the STH gene is one of the crucial factors that may influence feed intake and/or feed conversion rate, or the rise of the lactational curve, thus contribute to changes in energy balance and reproductive performance.

BEVEZETÉS

Szarvasmarhában a növekedési hormonnak (szomatotrop hormon, STH= growth hormone, GH) két allélváltozata ismeretes annak függvényében, hogy a kódoló gén nukleotid-szekvenciájában történt pontmutáció következtében az aminosav-szekvencia 127. pozíciójában a lehetséges aminosavak — leucin (L) vagy valin (V) — melyike található (ún. *Alu-I* polimorfizmus; *Lucy és mtsai*, 1991, 1993). A különböző genotípusú (LL, LV, VV) állatok tejtermelésében esetenként jelentős különbségek mutatkozhatnak (*Schlee és mtsai*, 1994; *Lee és mtsai*, 1996; *Sabour és Lin*, 1996; *Sabour és mtsai*, 1997; *Lechniak és mtsai*, 1999), bár a különböző fajtákon eddig elvégzett vizsgálatok eredményei e tekintetben nem ritkán ellentmondásosak. A további részleteket illetően *Kovács és mtsai* (2001, 2002) munkáira utalunk.

Jól ismert, hogy tejhasznú szarvasmarhában a nagyobb tejtermelésre irányuló szelekció a szaporodási mutatók jelentős romlásával jár együtt, ami elsősorban az ellés utáni első ovuláció késlekedésében, az acikliás periódus meghosszabbodásában nyilvánul meg (*Huszenicza és mtsai*, 1987, 1988; *Darwash és mtsai*, 1997; *Lucy*, 2000, 2001; *Taylor*, 2001; *Wathes és mtsai*, 2001). Az első tüszőrepedést, majd a petefészkek működésének az ezt követő ciklikussá válását elsősorban a laktáció kezdetén szinte törvényszerűen fellépő energiahány mélypontján való túljutás teszi lehetővé (*Butler*, 2001). Az élettani vonatkozásokat több, a közelmúltban megjelent irodalmi áttekintésben is olvashatjuk (*Huszenicza és mtsai*, 2002, 2003ab). Az energiaegyensúly zavarának metabolikus következményei hátrányosan befolyásolhatják a petesejtek minőségét, valamint az ovulációt követően a sárgatest képződését és progeszteron termelését (*Kátai és mtsai*, 2003). Az energiahányos állapot fokozott ketonanyag-produkcióval, májenzsírosodással járó dekompenzálódása — amellett, hogy önmagában is az állat életét veszélyeztető megbetegedéssé súlyosbodhat — hajlamosít az involúció bakteriális szövődményeire (akut putrid endometritis), a

tógy gyulladással elváltozásainak egyes formáira (ún. környezeti patogének okozta mastitis), illetve bizonyos egyéb szervi megbetegedésekre (pl. az oltógyomor helyzetváltozása) (Jánosi és mtsai, 2002; Huszenicza és mtsai, 2003b). Mind ez ideig tisztázatlan azonban az STH genotípusnak a kérdéskörben betöltött — joggal feltételezett, de részleteiben eddig még soha nem vizsgált — befolyásoló szerepe.

Munkánk során arról kívántunk tájékozódni, hogy üzemi körülmények között a holstein-fríz tehenek *STH-genotípusa* — önmagában, és egyéb tényezők (üzem hatása, kondícióvesztés, ellésszám) figyelembe vételével — milyen hatással van a *tejtermelésre*, illetve az ellés utáni első tüsszörepedésig eltelő *acikliás periódus* hosszára.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatainkat holstein-fríz fajtájú, először és többször (≥ 2) ellett teheneken ($n=341$) végeztük öt üzemben. Az állatok közel azonos időszakban (2000. nov. 19. és 2001. jan. 6. között) borjastak.

1. Genotípus vizsgálata: az STH genotípust NaEDTA-val alvadásában gátolt teljes vérmintákból, PCR-RFLP módszerrel (Kovács és mtsai, 2002) határoztuk meg.

2. Tejtermelés: A laktáció első 150 napjáig figyelembe vett havi próbafejesékek során rögzített tejmennyiségre, zsír- és fehérjeszázalékra vonatkozó adatokat használtuk fel — másodfokú függvényillesztéssel — a 15. és 30. tejezési napra korrigált egyedi tejmennyiség (Fat and Protein Corrected Milk yield; FPCM₁₅ és FPCM₃₀; Korver, 1982) kiszámításához.

3. Aciklia hossza: az állatok klinikai vizsgálatát az ellés utáni 6–10. és 28–35. napon végeztük. Mivel az akut putrid endometritis (APE) az STH genotípustól függetlenül, önmagában is jelentősen késleltetheti a petefészek működésének ciklikussá válását (Huszenicza és mtsai, 1987), a megbetegedés súlyosabb, általános klinikai tünetekben (étvágytalanság, láz) is megnyilvánuló eseteit kizártuk a további vizsgálatokból. A petefészek-működés ciklikussá válásának nyomon követése céljából az ellés utáni 7–10. naptól 8 héten át heti 3 alkalommal tejmintákat gyűjtöttünk, amelyek progeszteron tartalmát előzetes zsírta-
lanítás nélkül, ELISA módszerrel határoztuk meg. A mért progeszteron koncentrációkat a mintavétel időpontjának függvényében ábrázolva az egyedi progeszteron profilokról leolvasható a tüsszörepedés nyomán képződő első sárgatest működésének kezdete (Huszenicza és mtsai, 1987).

4. Egyéb tényezők:

— kondícióvesztés: Kondícióbecslésre (Body Condition Score, BCS; 5 pontos skálán, 0,25 pontos pontossággal) az ellés utáni 4–5., 28–35. és 50–60. napon került sor. Az értékeléskor a 4–5. és 28–35. nap közötti kondíciópontcsökkenés (Δ BCS) mértékét vettük figyelembe, és három kategóriát különböztettünk meg (1: $<0,50$ pont, 2: $0,50$ – $1,00$ pont, 3: $>1,00$ pont).

— ellésszám: Az eredmények elemzésekor különbséget tettünk az először ($n=118$), valamint a többször ellett ($n=223$) tehenek között.

— üzemek hatása: Vizsgálatainkat öt telep szarvasmarha-állományán végeztük.

A statisztikai értékeléshez (survival analízis, GLM és χ^2 teszt) Excel 5.0 és Statistica 6 (StatSoft, Inc. 2004) programcsomagokat használtunk.

EREDMÉNYEK

Felmérésünkben az állatok 79,4%-a ($n=271$) volt leucin-homozigóta (LL), míg 19,4%-a ($n=66$) a heterozigóta (LV), 1,2%-a ($n=4$) pedig a valin homozigóta (VV) haplotípust képviselte (1. ábra). A statisztikai elemzéshez az LV és VV állatokat, mint valin allélt hordozókat (LV+VV) egy csoportba vontuk össze.

1. ábra: Az állomány genotípus szerinti megoszlása

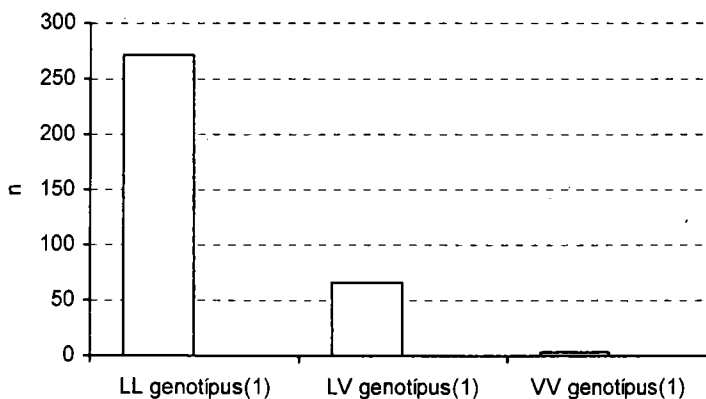


Fig. 1.: Distribution of genotypes in the population genotype(1)

Az ellés utáni 35. napig (azaz az első 3 tüszőnövekedési hullám valamelyikéből ovulálva) összesen 245 állat petefészek-működése vált ciklikussá. Az LL genotípusú teheneknek csak 68,4%-a ($n=186$), ezzel szemben az LV+VV csoportba tartozók 84,3%-a ($n=59$) ovulált 35 napon belül ($P=0,033$).

Az átlagos BCS-csökkenés mértéke az LV+VV csoportban kisebb volt, mint az LL csoportban ($0,48 \pm 0,05$, ill. $0,59 \pm 0,03$ pont; $P=0,025$). Emellett genotípus függő különbségeket ($P=0,002$) találtunk az egyes kategóriák megoszlásában is: az LL állatoknak kb. a fele ($n=134$; 49,5%), az LV+VV csoportnak pedig a 64,3%-a ($n=45$) csupán kismértékű ($\Delta\text{BCS}: < 0,50$), ezzel szemben 14,0 ($n=38$), ill. 7,1%-uk ($n=5$) kifejezett ($\Delta\text{BCS}: > 1,00$) kondícióromlás jeleit mutatta (2. ábra).

Ugyanakkor, nem volt lényeges genotípus-függő különbség az ellés utáni aciklia átlagos tartamában (LL: $40,5 \pm 1,4$ nap; LV+VV: $38,8 \pm 2,1$ nap; $P=0,4$), az APE előfordulási arányában (LL: 14%; LV+VV: 10%; $P=0,514$, $\chi^2=0,43$), valamint a tejtermelésben sem (FPCM₁₅, LL: $31,5 \pm 0,9$ kg, ill. LV+VV: $32,6 \pm 1,3$ kg, $P=0,455$; FPCM₃₀, LL: $33 \pm 0,7$ kg, ill. LV+VV: $34,4$ kg, $P=0,184$).

2. ábra: A kondícióvesztési kategóriák megoszlása genotípus-csoportok szerint

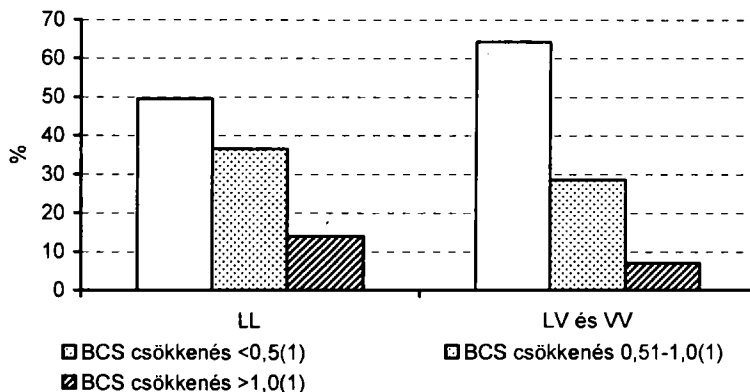


Fig. 2.: Categories of BCS decrease classified by genotypes
BCS decrease(1)

Az első borjas tehenek később ovuláltak és kevesebb tejet termeltek, mint többször ellett társaik (ellés utáni aciklia hossza, első ellésűek: $42,3 \pm 1,9$ nap, többszöri ellésűek: $37,0 \pm 1,6$ nap; $P=0,003$; FPCM₁₅, első ellésűek: $29,2 \pm 1,2$ kg, többszöri ellésűek: $34,9 \pm 1,0$ kg; $P<0,001$). Mindkét vizsgált paraméterben igazolt ($P<0,001$) üzemek közötti különbségeket is megfigyeltünk.

Az ellés utáni aciklia tartama az ellés utáni első 30 napban bekövetkezett lényeges kondícióvesztés ($\Delta BCS: >1,00$) esetén $58,7 \pm 2,5$ napra hosszabbodott, szemben a kis mértékű ($\Delta BCS: <0,50$), ill. közepes fokú ($\Delta BCS: 0,51-1,00$) kondícióromlás jeleit mutató állatokra jellemző $24,2 \pm 1,8$, ill. $36,0 \pm 1,8$ nappal ($P<0,001$; 3. ábra).

3. ábra: Az ellés utáni aciklia hossza a kondícióvesztési kategóriák szerint

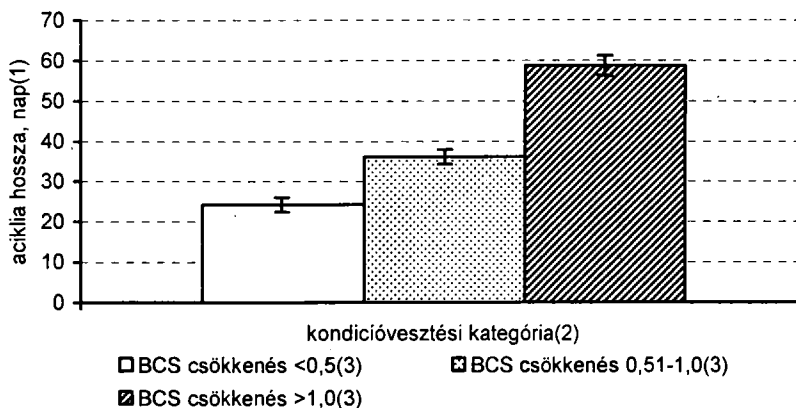


Fig. 3.: The postpartum acyclic periods according to the BCS decrease categories
acyclic, days(1), BCS decrease categor (2), BCS decrease(3)

Ezzel szemben, a tápláltsági állapot romlásának mértéke és a tejtermelés között nem tapasztaltunk lényeges összefüggést (FPCM₁₅: P=0,402; FPCM₃₀: P=0,501).

Az ellés utáni első 10 nap során 45 állatban állapítottunk meg akut putrid endometritist. A megbetegedés általános tünetekkel is járó, súlyosabb eseteit szándékaink szerint előzetesen kizártuk a kísérletből. Ezzel magyarázhatóan sem az ellés utáni aciklia hosszában, sem pedig a tejtermelésben nem volt lényeges különbség az egészséges és a kisebb fokban megbetegedett tehenek között.

MEGBESZÉLÉS

A tejtermelési mutatók javítására irányuló szelekció holstein-fríz tehenekben az STH gén különböző variánsainak egyenlőtlen elterjedéséhez vezetett (Lovendahl és mtsai, 1991). Az STH genotípus (*Alu*-I polimorfizmus) és a tejtermelés közötti összefüggésre vonatkozó megfigyelések azonban gyakran egymásnak is ellentmondóak. Egyesek szerint a *leucin allélre* homozigóta (LL) állatok nagyobb tej- és/vagy tejsír- és tejfehérje-termelésűek. Néhány esetben magasabb plazma STH szinteket mértek, a tenyészbikákban pedig a tejtermelésre vonatkozóan nagyobb tenyészértéket (predicted transmitting ability, PTA) találtak (Schlee és mtsai, 1994; Chung és mtsai, 1996; Lee és mtsai, 1996; Shariflou és mtsai, 1998). Mások a *valin allélnak* tulajdonítottak magasabb laktációs eredményeket, a tejtermelésre vonatkozó nagyobb becsült tenyészértéket (estimated breeding value, EBV), fokozottabb STH szelekciós képességet, és/vagy jobb szaporodási mutatókat (bikákban: spermaminőség, tehenekben: visszaivarzási arány; Sabour és Lin, 1996; Sabour és mtsai, 1997; Lechniak és mtsai, 1999). A mi vizsgálataink eredményei ez utóbbi kutatók megállapításaival csengenek inkább egybe, habár nem találtunk szignifikáns genotípus-függő különbséget a termelt tejnek a 15. és 30. napi FPCM-ben kifejezett mennyiségében, bár a V alléit hordozó állatok kissé magasabb tejtermelésűek voltak. A szaporodási mutatók tekintetében egyértelműen megállapíthatjuk, hogy a valin allélt hordozó tehenek igazoltan nagyobb arányban ovuláltak az ellést követő 5 héten belül és kevésbé vesztek kondíciójukból. Grochowska és mtsai (2001) különbségeket igazoltak az STH haplotípusok között az STH/IGF-I tengely működésében: a standard dózisú thyrotropin releasing hormon (TRH) kezelésre a V allélt hordozók magasabb plazma-STH, míg az L allélt hordozók magasabb IGF-I válasszal reagáltak. Emellett, allélenként különbözött a plazmában mért STH:inzulin arány is.

A laktáció kezdetén fennálló negatív energiaegyensúly olyan élettani folyamat, ami késlelteti az újravemhesülés lehetőségét. Legnyilvánvalóbb következményként az állatok jelentős részében (hazai körülmények között, ≥ 30 –36%-ában; Huszenicza és mtsai, 1987, 1988) az ellés után késlekedik az első tüzőrepedés (Staples és mtsai, 1990; Rhodes és mtsai, 1998; Rukkwamsuk és mtsai, 1999; Jorritsma és mtsai, 2000). Üzemi körülmények között az energiaegyensúly közvetlen, egyedenkénti meghatározása nem lehetséges, de a tápláltsági állapot változása a kondíció pontozásával jól követhető, a BCS alakulá-

sa megfelelő támpontként szolgál az állatok energiaegyensúlyának megítéléséhez. *Butler* (2001) megfigyelései szerint minél nagyobb fokú az ellés utáni BCS-csökkenés mértéke, annál kisebb a korai újravemhesülés valószínűsége. Az ellés utáni első 5 héten bekövetkező kondícióromlás mértéke a jelen tapasztalataink szerint is összefüggött az első ovuláció időpontjával: azoknak a teheneknek, amelyeknek tápláltsági állapota erőteljesen csökkent (Δ BCS: $>1,00$), jelentősen meghosszabbodott az ellés utáni acikliás periódusa.

Saját vizsgálatainkban a valin alléit hordozó (LV+VV) állatokat a laktáció kezdetén kisebb mértékű kondícióromlás jellemezte, és közülük lényegesen több ovulált az ellés utáni első 35 napon — azaz az első kb. 3 tüszőnövekedési hullám valamelyikéből — mint a leucin-homozigóta csoportban. Nem találtunk azonban lényeges különbséget sem az acikliás periódus átlagos hosszában, sem pedig a havonkénti termelésellenőrzés adatain alapuló tejtermelési mutatóknak az átlagában, illetve mindkét paraméter vonatkozásában meghatározó jelentőségűnek bizonyultak az üzemenkénti különbségek.

Vizsgálatunk alapján megállapíthatjuk, hogy a valin alléit hordozó egyedeknél lényegesen kisebb a kondícióvesztés mértéke az ellés utáni első 30 napban, vagyis az energia-egyensúly zavara nem olyan nagy mértékű, mint leucin homozigóta társaiknál. Szignifikánsan több állatban történt tüszőrepedés az ellést követő 35 napon belül a valin alléit hordozó csoportból, mivel a negatív energiamérleg mélypontján hamarabb túljutott állatokban az ellés utáni első ovuláció is hamarabb következik be. Mindezek arra utalnak, hogy holstein-fríz tehenekben az STH *Alu-I* polimorfizmus az ellés utáni metabolikus és endokrinológiai adaptáció egyik lényeges eleme, amelynek hatását azonban gyakran többé-kevésbé elfedik az üzemenként lényegesen eltérő takarmányozási körülmények. Valószínűsíthető, hogy az STH genotípus egyes endokrinológiai jellemzőkön keresztül a szárazanyag-felvétel és/vagy a tápanyag-hasznosulás mértékét, esetleg a laktációs görbe alakulását befolyásolhatja, az élettani részletek tisztázása azonban számos további vizsgálatot igényel.

IRODALOM

- Butler, W.R.*(2001): Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. In: *Fertility in the high-producing dairy cow*. Ed.: *Diskin, M.G.*, Br. Soc. Anim. Sci., Edinburgh, Occasional publications, 26. 1. 133–145.
- Chung, E.R. – Rhim, T.J. – Han, S.K.*(1996): Associations between PCR-RFLP markers of GH and PRL genes and production traits. *Korean J. Anim. Sci.*, 38. 321–336.
- Darwash, A.O. – Lamming, G.E. – Wooliams, J.A.*(1997): Estimation of genetic variation in the interval from calving to postpartum ovulation of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 80. 1227–1234.
- Grochowska, R. – Sorensen, P. – Zwierzchowski, L. – Snochowski, M. – Lovendahl, P.*(2001): Genetic variation in stimulated GH release and in IGF-I of young dairy cattle and their associations with the leucine/valine polymorphism in the GH gene. *J. Anim. Sci.*, 79. 470–476.
- Huszenicza, Gy. – Fébel, H. – Gáspárdy, A. – Gaál, T.*(2002): A nagy tejtermelésű tehén takarmányozásának, tejtermelésének és szaporodóképességének kapcsolata. Irodalmi áttekintés. 1. Az ellés utáni időszak anyagforgalmi jellemzői. *Magy. Áo. Lapja*, 124. 57. 719–725.
- Huszenicza, Gy. – Haraszi, J. – Molnár, L. – Solti, L. – Fekete, S. – Ekés, K. – Yaro, A.C.*(1988): Some metabolic characteristics of dairy cows with different post partum ovarian function. *J. Vet. Med.*, A 35. 506–515.

- Huszenicza, Gy. – Kulcsár, M. – Dankó, G. – Balogh, O. – Gaál, T.(2003a): A nagy tejtermelésű tehén takarmányozásának, tejtermelésének és szaporodóképességének kapcsolata. Irodalmi áttekintés. 4. A ketonanyag-képződés fokozódása és annak klinikai következményei. Magy. Áo. Lapja, 125. 58. 203–208.
- Huszenicza, Gy. – Kulcsár, M. – Kátai, L. – Balogh, O.(2003b): A nagy tejtermelésű tehén takarmányozásának, tejtermelésének és szaporodóképességének kapcsolata. Irodalmi áttekintés. 2. A pefészkés működése az ellés utáni időszakban. Magy. Áo. Lapja, 125. 58. 75–82.
- Huszenicza, Gy. – Molnár, L. – Solti, L. – Haraszi, J.(1987): Postpartal ovarian function in Holstein and crossbred cows on large scale farms in Hungary. J. Vet. Med., A 34. 249–263.
- Jánosi, Sz. – Kacs Kovics, I. – Veresegyházy, T. – Huszenicza, Gy.(2002): A szarvasmarha tüdőgyulladásra hajlamosító anyagcsere-rendellenességei és hiányállapotai. Irodalmi áttekintés. I. Az ellés körüli energiahiányos állapot. Magy. Áo. Lapja, 124. 57. 643–649.
- Jorritsma, R. – Jorritsma, H. – Schukken, Y.H. – Wentink, G.H.(2000): Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds. Theriogenology, 54. 1065–1074.
- Kátai, L. – Kulcsár, M. – Kiss, G. – Huszenicza, Gy.(2003): A nagy tejtermelésű tehén takarmányozásának, tejtermelésének és szaporodóképességének kapcsolata. Irodalmi áttekintés. 3. Az újravemhesülés zavarai. Magy. Áo. Lapja, 125. 58. 143–146.
- Korver, S.(1982): Feed intake and production in dairy breeds dependent on the ration. PhD thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen
- Kovács, K. – Fésűs, L. – Zsolnai, A. – Györkös, I.(2001): A szarvasmarha növekedési hormont (szomatotropin) kódoló gén. Szemleciikk. Állattenyésztés és Takarmányozás, 50. 2. 105–113.
- Kovács, K. – Zsolnai, A. – Bölcsey, K. – Györkös, I. – Fésűs, L.(2002): A szarvasmarha szomatotropin gén Alu-I polimorfizmusa és a termelési tulajdonságok közötti összefüggés magyarországi Holstein-fríz bikanevelő teheneiben. Állattenyésztés és Takarmányozás, 51. 1. 1–7.
- Lechniak, D. – Machnik, G. – Szydłowski, M. – Switonski, M.(1999): Growth hormone gene polymorphism and reproductive performance of AI bulls. Theriogenology, 52. 1145–1152.
- Lee, B.K. – Lin, G.F. – Crooker, B.A. – Murtaugh, M.P. – Hansen, L.B. – Chester-Jones, H.(1996): Association of somatotropin (bST) gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in Holstein cows. Dom. Anim. Endocrin., 13. 373–381.
- Lovendahl, P. – Woolliams, J.A. – Sinnnet-Smith, P.A.(1991): Response of growth hormone to various doses of growth hormone releasing factor and thyrotropin releasing hormone administered separately and in combination to dairy calves. Can. J. Anim. Sci., 71. 1045–1052.
- Lucy, M.C.(2000): Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. J. Dairy Sci., 83. 1635–1647.
- Lucy, M.C.(2001): Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? J. Dairy Sci., 84. 1277–1293.
- Lucy, M.C. – Hauser, S.D. – Eppard, P.J. – Krivi, G.G. – Clark, J.H. – Bauman, D.E. – Collier R.J.(1993): Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. Dom. Anim. Endocrin., 10. 325–333.
- Lucy, M.C. – Hauser, S.D. – Eppard, P.J. – Krivi, G.G. – Collier, R.J.(1991): Genetic polymorphism within the bovine somatotropin (bST) gene detected by PCR and endonuclease digestion. J. Dairy Sci., 74 (Suppl. 1.) 284.
- Rhodes, F.M. – Clark, B.A. – Nation, D.P. – Taufa, V.K. – Macmillan, K.L. – Day, M.L. – Day, A.M. – McDougall, S.(1998): Factors influencing the prevalence of postpartum anaestrus in New Zealand dairy cows. Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod., 58. 79–81.
- Rukkwamsuk, T. – Wensing, T. – Kruip, T.A.M.(1999): Relationship between triacylglycerol concentration in the liver and first ovulation in postpartum dairy cows. Theriogenology, 51. 1133–1142.
- Sabour, M.P. – Lin, C.Y.(1996): Association of bovine growth hormone genetic variants with milk production traits in Holstein cattle. Anim. Genet., 27. 105.
- Sabour, M.P. – Lin, C.Y. – Smith, C.(1997): Association of genetic variants of bovine growth hormone with milk production traits in Holstein cattle. J. Anim. Breed. Genet., 114. 435–442.
- Schlee, P. – Graml, R. – Schallenberger, E. – Scams, D. – Rottman, O. – Olbrich-Bludau, A. – Pirchner, F.(1994): GH and IGF-I concentrations in bulls of various GH genotypes. Theor. Appl. Genet., 88. 497–500.
- Shariflou, M.R. – Moran, C. – Nicholas, F.W.(1998): Candidate genes for production traits in dairy cattle. Proc. 6th Wld. Conf. Genet. Appl. Lives. Prod. 25. 043.
- Staples, C.R. – Thatcher, W.W. – Clark, J.H.(1990): Relationship between ovarian activity and energy balance during the early postpartum period of high producing dairy cows. J. Dairy Sci., 73. 938–947.

- StatSoft, Inc.* (2004): STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com.
- Taylor, V.J.* (2001): The growth hormone and insulin-like growth factor axis in relation to fertility in high yielding dairy cows. PhD thesis. Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, London
- Wathes, D.C. – Beever, D.E. – Cheng, Z. – Pushpakumara, P.G.A. – Taylor, V.* (2001): Life-time organization and management of reproduction in the dairy cow. In: Integrated management systems for livestock. Ed.: *Wathes, D.C. – Frost, A.R. – Gordon, F. – Wood, J.D.*, Br. Soc. Anim. Sci., Edinburgh, UK, Occasional publications, 28. 1. 59–69.

Érkezett: 2005. január

Szerzők címe: *Balogh, O. – Kulcsár, M. – Gáspárdy, A. – Reiczigel, J. – Kátai, L. –*

Authors' address: *Huszenicza, Gy.: Szent István Egyetem, Állatorvostudományi Kar
Szent István University, Faculty of Veterinary Science
H-1078 Budapest, István u. 2.*

*Kovács, K. – Zsolnai, A. – Fésűs, L.: Állattenyésztési és Takarmányozási
Kutatóintézet
Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.*

MAGNÉZIUM-ADAGOLÁS HATÁSA A CSIRKEEMBRIÓ FEJLŐDÉSÉRE ÉS A KELTETHETŐSÉGRE

SÁFÁR ORSOLYA — KOVÁCSNÉ GAÁL KATALIN

ÖSSZEFOGLALÁS

A magnézium, mint a homeosztázist fenntartó elemek egyike, élettani hatásaiból adódóan nélkülözhetetlen az állati táplálkozásban, elsősorban „enzim kofaktorként” betöltött szerepe révén. A magnézium ugyanis a szervezet energetikai folyamataiban lényeges számos enzim alkotóeleme vagy azok aktivitásának befolyásoló tényezője. A kísérletek tojtyúkokkal folytak, ahol az alap-takarmány magnézium-tartalmán kívül 300, 400, 500 mg /nap magnéziumot adagoltak az egyes kísérleti csoportoknál. A vizsgálati paraméterek a következők voltak: kelési százalék, a kiesett tojások mennyisége, a 14, 16, 18, 20 napos embrió súly, az embrió agy-, szív-, máj- és gyomorsúlya az embrió súlyához viszonyítva, az embrió egyes szerveinek magnézium-tartalma, valamint a kikelt napocsibék átlagos súlya.

Megállapítható, hogy a szükségletet meghaladó mennyiségű magnéziumadagolás kedvezően befolyásolja a tenyésztőjások minőségét, javítja a keltetési eredményeket. A tojáshoz viszonyított embrió súly lineárisan növekedett a magnézium adagolásával. Az embrió belső szerveinek súlyában viszont lényeges változás nem tapasztalható, annak ellenére, hogy az agy és a máj raktározó szervnek számít a szükségleti értéken felüli magnézium-bevitel esetében.

SUMMARY

Sáfár, O.Ms. – Kovácsné Gaál, K.Ms.: THE EFFECT OF MAGNESIUM SUPPLEMENTATION ON THE DEVELOPMENT AND THE HATCHABILITY OF CHICK EMBRYO

The aim of the study was to investigate the effects of magnesium supplementation on the parameters of egg producing for breeding, hatching yields and embryonic development, the mineral content of some organs of the chick embryo. Three magnesium doses were applied in the experiments: Mg 1. 300, Mg 2. 400, Mg 3. 500 mg/Mg/day.

It can be stated, that additional magnesium supplementation caused benefits in the quality of breeding eggs also improves hatching yield. Paralelly with the increase of the amount magnesium supplementation the growth of the embryo showed a linear increase at all the four sampling times. Furthermore the weight of the viscera (the brain, the liver, the heart, the tibia) of embryo at the age of 14, 16, 18 and 20 days was investigated. The weight of internal organs as expressed to the proportion of the weight of the embryo it was observed that during the period of 14–18 days of incubation the liver weight of the embryo gained at the same rate than the increase of the amount of magnesium supplementation. There were not consecutive gain on weight of the other organs in the test groups as compared to the control. The magnesium content of the embryonic organs did not show changes as effect of the magnesium supplementation either days of the sampling.

BEVEZETÉS

A magnézium élettani hatásaiból adódóan nélkülözhetetlen az állati takarmányozásban, elsősorban koenzimként betöltött szerepe révén. Ez azt jelenti, hogy az ATP-vel komplexet képez, és ez a komplex a magnéziumion koordinációs helyein kapcsolódik az enzimekhez, megkönnyítve ezzel az energia átadását (Miles, 2000). A tojtyúk magnézium-szükséglete 500 mg/testsúly kg. *Khokhlov és Kislyi* (1997) 40–90 mg magnéziumot javasol 100 g takarmányban.

A tyúk ásványianyag-szükséglete esetében a kalcium és foszfor szükségleti értékén kívül figyelemmel kell kísérni a magnézium-ellátottságot is, mert a két elem viszonyából adódóan a tojásbély szilárdságát csökkentheti a magnézium-túlsúly, ami mind a tenyész-, mind pedig az árutojás-termelésben rendkívül fontos (*Abdallah és mtsai* (1994).

Az ásványianyagok eloszlása szövetek szerint változik minden faj esetében. Tyúkoknál az ásványianyagok nagyobb mennyiségben található az izomzatban, mint a kakasoknál (*Myoungheon és Sangkeun*, 1999). Magnézium-adagolás esetén a takarmány foszforszintjét is nyomon kell követni, mert a magnézium-bevitel megnöveli az állatok foszforigényét (*Hess és Britton*, 1997). A foszfor legnagyobb része (több mint 61%-a) a tojássárgájában található foszfolipidek formájában (*Sugino és mtsai*, 1997). A magnézium- és a foszfor kiegészítés pozitív módon befolyásolja a takarmány-felhasználást és a tojás-súlyt (*Hossian és Bertechini*, 1998).

Rogerson és Singsen (1976) naposcsibék takarmányába kiegészítésként 875, 1375 és 1875 mg/kg magnéziumot keverték. Ennek hatására a májban a nátrium-, a vesében pedig a kalcium-koncentráció az adagolt magnézium mennyiségével párhuzamosan csökkent. A szívizomzatban viszont nem észleltek szignifikáns változásokat.

Toxikus mértékű adagolás hatására a naposcsibék sípcsontja megrövidül, megvastagszik, mikroszkópos vizsgálat során a csontlemezeknél angolkórra jellemző tüneteket figyelhetek meg nagyon kis számú oszteoblaszt sejttel (*Lee és mtsai*, 1980; *Lee és Britton*, 1980). Csökken továbbá a tojás-termelés, a takarmányfelvétel és a testsúly (*Hess és Britton*, 1997). Túlzott mennyiségben adagolt magnézium hatására csökken a vér kalciumszintje, antagonist hatás figyelhető meg a két elem között (*Ding és mtsai*, 1992). A túlzott kalciumbevitel viszont csökkenti a magnézium felszívódását (*Rogler és Parker*, 1972). *Monsey és mtsai* (1977) kísérletében a magnéziumtöbblet hasmenést okozott jércéknel valamint csökkentette a testsúlygyarapodást.

A különböző állatfajoknál a jelenlegi takarmányozási szabványok alapján nem beszélhetünk magnéziumhiányról, ennek ellenére az alaptakarmányban lévő mennyiségen felül adagolt magnézium javíthatja a termelési eredményeket.

Kísérletünkben azt a célt tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a tojtyúk takarmányához a szükségletet meghaladó mennyiségben adagolt magnézium hatását az embriófejlődésre, valamint a keltethetőségre.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérletet sárga magyar tojótyúkokkal végeztük (20–21. tojóhét), ahol az alaptakarmányon felül 300 (Mg 1), 400 (Mg 2), 500 (Mg 3) mg/nap magnéziumot adagoltunk az egyes kísérleti csoportoknak MgO formájában, melynek magnézium-tartalma 58,67%. Minden csoportban 40 tojótyú és 4 kakas volt.

Megvizsgáltuk a 14, 16, 18 és 20 napos csirkeembrió súlyát, majd az agy, máj, szív és gyomor súlyát, továbbá azok magnézium-tartalmát. Minden boncolási napon csoportonként véletlenszerűen 5-5 tojást vettünk ki a keltetőből.

A keltetés alatti lámpázások során kiestek a terméketlen, a véres, majd az elhalt és végül a befulladt tojások. A kelési %-ot a kikelt naposcsibék és a berakott tojások aránya adta, de értékének megállapításakor a berakott tojásokból csoportonként 20 tojással kevesebbet vettünk figyelembe, amelyek az inkubáció alatt végzett mintavételek során használtunk fel.

Továbbá megfigyeltük, hogyan változik a magnézium-adagolás emelkedésével az egyes kísérleti csoportoknál a keltetés során kiesett tojások mennyisége, valamint a kikelt naposcsibék átlagos súlya.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A keltetés folyamán kiesett tojásokat és a kelési % alakulását az 1. táblázat tartalmazza. Az eredményekből kitűnik, hogy a magnézium-adagolás jelentősen javította a keltetési eredményeket. A keltetés mind a négy csoport esetében azonos keltető gépben történt, a genetikai háttér, a takarmányozás és a keltető tojás gyűjtésének időtartama szintén azonos volt.

1. táblázat

A magnézium-adagolás hatása a keltethetőségére

Csoport (1)	Berakott tojás, n (2)	1. lámpázás(3)		Tojás(6) (n-15)	2. lámpázás(3)		Befulladt (8)	Kikelt csibe (9)	Kelési % (10)
		termé- ketlen(4)	véres (5)		elhalt(7)	Tojás(6) (n-20)			
Kontroll(11)	320	26	13	305	14	300	62	185	61,67
Mg 1.	328	29	5	313	14	308	41	219	71,10
Mg 2.	330	28	8	315	23	310	30	221	71,29
Mg 3.	333	30	2	318	8	313	27	246	78,59

Table 1.: Effect of magnesium on the hatchability of breeding eggs group(1), hatching eggs(2), candling(3), infertile(4), bloody(5), eggs(6), dead(7), asphyxiated(8), hatched chicks(9), hatching %(10), control(11)

Az 1a táblázatban mutatjuk be a lámpázás során kiesett tojások százalékos megoszlását az egyes kísérleti csoportokban. Megfigyelhető, hogy a magnéziumszint emelkedése kedvező hatással volt a lámpázás eredményeire, csökkentette ugyanis a kiesett tojások mennyiségét.

A 2. táblázat az embrió súlyát mutatja be a kontroll és a három kísérleti csoportban, valamint megadtuk az eredmények statisztikai értékelését is (2a táblázat). Az embriónak a tojáshoz viszonyított %-os aránya mind a négy boncolási időpontban lineárisan növekedett a magnézium-kiegészítés hatására.

1a táblázat

A magnézium-adagolás hatása a keltetés során kiesett tojásokra

Csoport(1)	Véres(2)	Elhalt(3)	Befulladt(4)
Kontroll(5)	4,06	4,38	19,38
Mg 1.	1,52	4,27	12,50
Mg 2.	2,42	6,97	9,09
Mg 3.	0,60	2,40	8,11

Table 1a: Effect of magnesium on the hatchability of breeding eggs group(1), bloody(2), dead(3), asphyxiated(4), control(5)

2. táblázat

A magnézium-adagolás hatása a csirkeembrió súlyára

Csoport(1)	Tojás(3)	Embrió(4)	Arány, %(5)	Tojás(3)	Embrió(4)	Arány, %(5)
	átlagsúlya, g(6)			átlagsúlya, g(6)		
	14. nap(2)			16. nap(2)		
Kontroll(7)	54,75	6,51	11,89	57,52	11,57	20,05
Mg 1.	53,67	6,47	12,05	51,72	12,52	24,02
Mg 2.	51,53	7,14	13,85	50,13	12,03	24,01
Mg 3.	50,47	7,34	14,54	52,68	13,11	24,88
	18. nap(2)			20. nap(2)		
Kontroll(7)	53,33	18,82	35,28	53,44	22,45	42,00
Mg 1.	51,16	19,80	38,71	52,48	24,61	46,89
Mg 2.	52,14	20,70	39,71	51,62	27,12	52,54
Mg 3.	53,99	17,95	33,25	51,65	28,83	55,82

Table 2.: Effect of magnesium on the embryo weight group(1), day(2), egg(3), embryo(4), rate, %(5), weight, g(6), control(7)

2a táblázat

Az embrió tojáshoz viszonyított arányának statisztikai értékelése

Csoport(1)	14. nap(2)				18. nap(2)			
	Kontroll(3)	Mg 1.	Mg 2.	Mg 3.	Kontroll(3)	Mg 1.	Mg 2.	Mg 3.
Kontroll(3)		NS	NS	*		*	*	NS
Mg 1.	*		NS	*	NS		NS	**
Mg 2.	NS	NS		NS	**	NS		**
Mg 3.	*	NS	NS		**	**	NS	
	16. nap(2)				20. nap(2)			

*P<0,05; **P<0,01)

Table 2a.: The statistic evaluation of the embryo group(1), day(2), control(3)

Ha az életfontosságú belső szervek embrióhoz viszonyított arányát követjük nyomon (3. táblázat), akkor megfigyelhetjük, hogy a 14–18. napig tartó embriófejlődési szakaszban a máj súlya a magnézium-adagolással párhuzamosan növekedett.

Az inkubáció 18. és 20. napján végzett mintavételkor ez a súlynövekedés a májnál már nem volt megfigyelhető. A többi belső szervnél következetes súlyváltozás a kontroll és a kísérleti csoportok között nem mutatkozott.

Az egyes szervek arányának statisztikai értékelése a 3a, 3b, 3c és 3d táblázatokban található.

3. táblázat

A belső szervek súlyának változása az embrió súlyához viszonyítva

Csoport(1)	Embrióhoz viszonyított, %*(3)							
	Agy(4)	Szív(5)	Máj(6)	Gyomor(7)	Agy(4)	Szív(5)	Máj(6)	Gyomor(7)
	14. nap(2)				16. nap(2)			
Kontroll(8)	4,43	1,23	2,18	2,58	3,74	0,79	1,81	3,00
Mg 1.	4,52	1,11	2,04	2,69	3,74	0,81	2,01	3,56
Mg 2.	4,62	1,04	2,13	3,19	3,62	1,00	2,33	3,59
Mg 3.	4,44	1,04	2,45	3,19	3,60	0,87	2,08	3,34
18. nap(2)				20. nap(2)				
Kontroll(8)	3,48	0,86	2,27	4,79	2,78	0,83	2,43	6,25
Mg 1.	3,18	0,83	2,20	4,91	2,97	0,72	2,02	9,80
Mg 2.	3,30	0,76	2,42	4,93	2,69	0,80	2,12	5,89
Mg 3.	4,14	0,88	2,34	4,36	2,54	0,68	2,03	5,73

* relatív súly az embrió teljes súlyához (100 %) viszonyítva(9)

Table 3.: The changes of intestines compared to embryo weight group(1), day(2), relative weight, %(3), brain(4), heart(5), liver(6), stomach(7), control(8), * relative weight compared to total weight (100%) of embryo(9)

3a. táblázat

Az embrió:agy arányának statisztikai értékelése

Csoport(1)	14. nap(2)				18. nap			
	kontroll(3)	Mg 1.	Mg 2.	Mg 3.	kontroll(3)	Mg 1.	Mg 2.	Mg 3.
Kontroll(3)		NS	NS	NS		NS	NS	*
Mg 1.	NS		NS	NS	NS		NS	**
Mg 2.	NS	NS		NS	NS	NS		**
Mg 3.	NS	NS	NS		NS	NS	NS	
16. nap(2)				20. nap(2)				

* P<0,05; ** P<0,01

Table 3a.: The statistic evaluation of the embryo:brain rate as in Table 2a.(1-3)

3b. táblázat

Az embrió:szív arányának statisztikai értékelése

Csoport(1)	14. nap(2)				18. nap			
	kontroll(3)	Mg 1.	Mg 2.	Mg 3.	kontroll(3)	Mg 1.	Mg 2.	Mg 3.
Kontroll(3)		NS	NS	NS		NS	NS	NS
Mg 1.	NS		NS	NS	NS		NS	NS
Mg 2.	NS	NS		NS	NS	NS		NS
Mg 3.	NS	NS	NS		*	NS	*	
16. nap(2)				20. nap(2)				

* P<0,05; ** P<0,01

Table 3b.: The statistic evaluation of the embryo:heart rate as in Table 2a.(1-3)

3c. táblázat

Az embrió:máj arányának statisztikai értékelése

Csoport(1)	14. nap(2)				18. nap			
	kontroll(3)	Mg 1.	Mg 2.	Mg 3.	kontroll(3)	Mg 1.	Mg 2.	Mg 3.
Kontroll(3)		NS	NS	NS		NS	NS	NS
Mg 1.	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS
Mg 2.	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mg 3.	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS
	16. nap(2)				20. nap(2)			

* P<0,05; ** P<0,01

Table 3c.: The statistic evaluation of the embryo:liver rate as in Table 2a.(1-3)

3d. táblázat

Az embrió:gyomor arányának statisztikai értékelése

Csoport(1)	14. nap(2)				18. nap			
	kontroll(3)	Mg 1.	Mg 2.	Mg 3.	kontroll(3)	Mg 1.	Mg 2.	Mg 3.
Kontroll(3)		NS	NS	NS		NS	NS	NS
Mg 1.	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS
Mg 2.	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS
Mg 3.	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS
	16. nap(2)				20. nap(2)			

* P<0,05; ** P<0,01

Table 3d.: The statistic evaluation of the embryo:stomach rate as in Table 2a.(1-3)

A kikelt naposcsibék átlagos súlyát mutatja be a 4. táblázat. Annak ellenére, hogy az inkubáció 20. napján történt mintavételkor az embrió súlyt mindhárom kísérleti csoportnál meghaladta a kontroll csoport embrió súlyt, a kelést követően elvégzett napos kori csibemérésnél a kísérleti csoportok értékei elmaradtak a kontrolltól.

4. táblázat

A kikelt naposcsibék átlagsúlya

Csoport(1)	Kikelt naposcsibe(2)			
	n	átlagsúly, g(3)	SD	CV%
Kontroll(4)	185	41,13	3,79	9,22
Mg 1.	219	39,62	3,35	8,45
Mg 2.	221	37,84	3,03	8,01
Mg 3.	246	38,71	3,34	8,63

Table 4.: The average weight of the hatched chicks group(1), hatched chicks(2), average weight, g(3), control(4)

Az embrió belső szerveinek magnézium-tartalma sem a magnézium-adagolás hatására, sem az inkubáció során nem változott (5. táblázat).

Az embrió belső szerveinek magnézium-tartalma

	Kor(1)	Kontroll(3)	Mg 1.	Mg 2.	Mg 3.
		Mg, mg/kg			
Agy(4)	14. nap(2)	0,196		1,185	0,222
	16. nap(2)	0,206	0,175	0,167	0,178
	18. nap(2)	0,213	0,215	0,235	0,211
	20. nap(2)	0,205	0,240	0,238	0,231
Szív(5)	14. nap(2)	0,455		0,519	0,508
	16. nap(2)	0,674	0,339	0,386	0,340
	18. nap(2)	0,350	0,312	0,363	0,578
	20. nap(2)	0,360	0,319	0,316	0,345
Máj(6)	14. nap(2)	0,653		0,592	0,678
	16. nap(2)	0,804	0,564	0,582	0,652
	18. nap(2)	0,644	0,597	0,616	0,578
	20. nap(2)	0,619	0,624	0,569	0,614
Gyomor(7)	14. nap(2)	0,269		0,240	0,241
	16. nap(2)	0,285	0,320	0,283	0,314
	18. nap(2)	0,230	0,230	0,206	0,255
	20. nap(2)	0,386	0,377	0,386	0,412

Table 5.: The magnesium content of the internal organs of the embryo
age(1), day(2), control(3), brain(4), heart(5), liver(6), stomach(7)

KÖVETKEZTETÉS

A magnézium-adagolás jelentősen javította a keltetési eredményeket. Ha az embrióknak a tojáshoz viszonyított %-os arányát figyelembe vesszük, az embriófejlődés mind a négy mintavételi időpontban a magnézium-kiegészítés hatására lineárisan és szignifikánsan ($P < 0,05$; $P < 0,01$) növekedett.

Az ásványi anyagok tárolása és metabolizmusa szempontjából az embriófejlődés során kulcsfontosságú szerepet tölt be a máj (Richards és Steele, 1987ab), melynek ásványianyag-koncentrációja az embriófejlődés során fokozatosan változik (Sandrock és mtsai, 1983; Fleet és McCormick, 1988). Richards (1991ab) vizsgálatai kimutatták, hogy a májban lévő mikroelemek ingadozó előfordulása kapcsolatba hozható a tojásból történő mobilizációval.

Ha az életfontosságú belső szervek embrióhoz viszonyított arányát követjük nyomon, azt tapasztaljuk, hogy a 14–18. napig tartó embriófejlődési szakaszban a máj súlya a magnézium-mennyiség növekedésével párhuzamosan növekedett, ami statisztikailag is igazolható volt ($P < 0,05$; $P < 0,01$). Mindez azzal magyarázható, hogy a magnézium májba történő beépülése feltehetően fokozta a biokémiai — és ennek révén a növekedési — folyamatok intenzitását. Az inkubáció 18. és 20. napján történt mintavételkor ez a súlynövekedés a májnál már nem figyelhető meg, mert erre az időpontra a tojássárgájából, héjból az ásványianyagok beépülése már jórészt befejeződik. A többi belső szervnél következetes súlyváltozás a kontroll és a kísérleti csoportok között nem mutatkozott.

Mivel az ásványianyagok csirkeembrióba való beépüléséért a chorioallantois membrán a felelős, a tojáshéjba beépülő magnéziumtöbblet bejut a fejlődő

embrióba, és az a különböző szervekbe, csontozatba beépülve befolyásolja a biokémiai folyamatokat, emiatt egyes létfontosságú vegyületek szintézisét (Grau és mtsai, 1979; Richards és Packard, 1996; Richards, 1997; Wilson, 1997). Dewar és mtsai (1974) megfigyelték, hogy az embrióban a cink-, réz-, vas- és mangán-koncentráció a keltetés ötödik napján a legmagasabb, majd folyamatosan csökken a 10. napig. Shamsuddin és mtsai (1977) azt vizsgálták, hogyan változik a csirkeembrió májának magnézium-koncentrációja a fejlődés során. A keltetés ideje alatt a 6., 14. és 18. napon mérték a legmagasabb magnéziumszintet, hasonlóan a saját vizsgálataink eredményeihez. Mivel számos anyagcsere-folyamat magnézium-igényes, így a keltetés ideje alatt megfigyelt magnézium csúcsok kapcsolatban lehetnek az ezekhez a folyamatokhoz szükséges vegyületek szintézisének növekedésével a fejlődő csirkemájban. A keltetés 14. napján mért magnézium csúcs összefügg a vérképződéssel, a 18. napon mutatózó magnéziumtöbblet, pedig kapcsolatban áll a kötőszövet és a mukopoliszacharidok képződésével.

Az embrió belső szerveinek magnézium-tartalma a laboratóriumi vizsgálatok során sem a magnézium-adagolás hatására, sem a keltetési időszak előrehaladtával nem változott.

Annak ellenére, hogy a 20. napon történt mintavételkor az embrió súly mindhárom kísérleti csoportnál meghaladta a kontroll csoport embrió súlyát ($P < 0,05$; $P < 0,01$), a napos korban történt csibemérésnél a kísérleti csoportok értékei elmaradtak a kontrolltól. Ennek pontos oka jelenleg még nem ismert, az további vizsgálatokat indokol. Feltételezhető, hogy a nagyobb embriójú tojásokból a csibék előbb keltek ki és a bújtatóban súlyvesztést okozott az egyidejű gépből való kiszedés.

Összefoglalóan megállapítható, hogy a magnézium-adagolás kedvezően befolyásolja a tenyésztőzés minőségét, javítja a keltetési eredményeket, ugyanakkor nem épül be az embrió belső szerveibe annak ellenére, hogy az agy és a máj raktározó szervnek számít a szükségletet meghaladó mennyiségű magnézium bevitel esetében.

IRODALOM

- Abdallah, A.G. – Harms, R.H. – Wilson, H.R. – El-Husseiny, O.(1994): Effect of removing trace minerals from the diet of hens laying eggs with heavy or light shell weight. *Poult. Sci.*, 73. 2. 295–301.
- Dewar, W.A. – Teague, P.W. – Downie, J.N.(1974): The transfer of minerals from the egg to the chick embryo from the 5th to the 18th days of incubation. *Br. Poult. Sci.*, 15. 119–129.
- Ding, S.T. – Chang, C.C. – Shen, T.F. (1992): The effect of dietary magnesium and calcium level on the eggshell quality and mineral content in plasma eggshell and bone in laying Tsaiya duck and Leghorn hen. *Dep. Anim. Hus., National Taiwan University, Taiwan*
- Fleet, J.C. – McCormick, C.C.(1988): The ontogeny and induction by zinc of hepatic chick embryo metallothionein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 188. 52–60.
- Grau, C.R. – Roudybush, T.E. – McGibbon, W.H.(1979): Mineral composition of yolk fractions and whole yolk from eggs from restricted ovulator hens. *Poult. Sci.*, 58. 1143–1148.
- Hess, J.B. – Britton, W.M.(1997): Effects of dietary magnesium excess in White Leghorn hens. *Dep. Poult. Sci., Univ. Georgia, Poult. Sci.*, 76. 5. 703–710.
- Hossain, S.M. – Bertechini, A.G.(1998): Effects of varying levels of magnesium and available phosphorus on performance of layers. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 71. 4. 363–368.
- Khoklov, A. – Kislyi, A.(1997): Let us control the mineral nutrition of laying hens. *Pticevodstvo*, 2. 1. 20–21.

- Lee, S.R. – Britton, W.M.(1980): Magnesium toxicity: effect on phosphorous utilization by broiler chicks. *Poult. Sci.*, 59. 9. 1989–1994.
- Lee, S.R. – Britton, W.M. – Rowland, G.N.(1980): Magnesium toxicity: bone lesions. *Poult. Sci.*, 32. 4. 2403–2411.
- Miles, R.D.(2000): Trace minerals and avian embryo development. *Cienc. Anim. Brasileira*, 2. 1–10.
- Monsey, J.B. – Robinson, D.S. – Miller, W.S. – Ellis, M.(1977): The effect of feeding magnesium-enriched diets on the quality of the albumen of stored eggs. *Br. J. Nutr.*, 37. 1. 35–44.
- Myoungheon, L. – Sangkeun, K.(1999): The contents of minerals in muscle from various species. College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Tae-jeon, Korea Republic
- Richards, M.P.(1991a): Mineral metabolism in the developing turkey embryo. The effects of developmental age and shell-less culture on trace element contents of selected tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100. 1009–1016.
- Richards, M.P.(1991b): Mineral metabolism in the developing turkey embryo. The role of the yolk sac. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100. 1017–1023.
- Richards, M.P.(1997): Trace mineral metabolism in the avian embryo. *Poult. Sci.*, 76. 1. 152–164.
- Richards, M.P. – Packards M.J.(1996): Mineral metabolism in avian embryos. *Poult. Avian Biol. Rev.*, 7. 143–161.
- Richards, M.P. – Steele, N.C.(1987a): Trace element metabolism in the developing avian embryo. *J. Exptl. Zool. Suppl.* 1. 39–51.
- Richards, M.P. – Steele, N.C.(1987b): Zinc, copper and iron metabolism by turkey embryo hepatocytes. *Trace Elements in Man and Animals*, 6. 625–626.
- Rogerson, G. – Singsen E.P.(1976): Mineral metabolism in chicks on high dietary pyridoxine and magnesium. *J. Poult. Sci.*, 55. 4. 1187–1194.
- Rogler, J.C. – Parker, H.E.(1972): Effects of excess calcium on a fluoride-magnesium interrelationship in chicks. *J. Nutr.*, 156. 3. 1699–1707.
- Sandrock, B. – Kern, S.R. – Bryan, S.E.(1983): The movement of zinc and copper from the fertilized egg into metallothionein-like proteins in developing chick hepatic tissue. *Bioi. Trace Element Res.*, 5. 503–515.
- Shamsuddin, M. – Bhaumik, A. – Nandi, J. – Medda, J.N.(1977): Quantitative estimation of magnesium in differentiating liver of chick embryo. *Ind. J. Physiol., Allied Sci.*, 16. 2. 175–180.
- Sugino, H. – Nitoda, T. – Juneja L.R.(1997): Nutritive evaluation of hen eggs. *Hen eggs – Their basic and App. Sci.*, 13–24.
- Wilson, H.R.(1997): Effects of maternal nutrition on hatchability. *Poult. Sci.*, 76. 1. 134–143.

Érkezett: 2005. január
Szerzők címe: Nyugat-Magyarországi Egyetem, Mezőgazdasági- és Élelmiszertud. Kar
Authors' address: University of West Hungary, Faculty of Agricultural and Food
H-9200 Mosonmagyaróvár, Vár 4.
safors@freemail.hu

A TÖKÉSRÉCE TOJÓT ÉRT STRESSZ HATÁSA A TOJÁSSZIKBE DEPONÁLT SZTEROIDOKRA ÉS AZ UTÓDOKRA

SZÓKE ZSUZSANNA — FERENCZI SZILAMÉR — BICZÓ ANDRÁS — PÉCZELY PÉTER

ÖSSZEFOGLALÁS

A handling stressz hatását vizsgálták a tojó és utódai vonatkozásában, amelyet az állatok háromszori befogásával és szállító dobozba történő helyezésével értek el. Ezt a procedúrát három egymást követő napon megismételték. A kezelések alatt 4 óránként történt bélsárgyűjtés a tojóktól és a 3. naptól kezdve pedig megkezdődött a tojásgyűjtés is. A kezelés hatására a tojóknak bekövetkező kortikoszteron (B), tesztoszteron (T) 17- β -ösztradiol (E2), progeszteron (P4) és dehidroepiandrosteron (DHEA)-koncentráció-változásokat a bélsárból történő szteroid analízissel (RIA) detektálták. A tojások egy részét (napi 2–4 tojás/csoport) 84. óráig inkubálták, majd a tojás felnyitása után rögzítették az embrió paramétereit. Ezt követően a későbbi ivar-meghatározás céljából az embrió eltávolítása következett. A tojásszikkból is meghatározták a fent említett szteroidokat. A többi tojást a szerzők kikeltették. A kezelt csoport kelési százaléka mintegy 20%-kal elmaradt a kontrollhoz képest és ez a különbség jórészt a korai embrió elhalásból adódott. A kezelt csoport utódainál a tömeges kelés mintegy 12–24 órával korábban kezdődött.

A stressz hatására a tojók bélsárában mérhető B koncentráció megnövekedett, s ez megjelent a szikben is. Mind a nőivarú mind a hímivarú embriót tartalmazó tojások szik B koncentrációja szignifikánsan magasabb értéket mutatott a kontrollokénál. A bélsárban mérhető T mennyiség szintén megemelkedett, azonban csak a hímivarú embriót tartalmazó tojások szik T tartalma mutatta ezt a változást, a nőivarnál a két csoport között nem volt különbség.

A DHEA estében a nőivarú embriót tartalmazó tojásokban nem tapasztalható szignifikáns különbség. Ezzel szemben a hímivarú tartalmazó tojások szikanyagában — a T-hoz képest ellenkezően — a kontroll csoporthoz képest szignifikáns csökkenés következett be. A fekális értékek tekintetében nem volt különbség a csoportok között.

Az E2-koncentrációk vonatkozásában a nőivarú embriót tartalmazó szikben volt eltérés, a kezelt csoportban szignifikánsan nagyobb volt a koncentráció, míg a hímivarú tartalmazó tojások E2 tartalma nem változott. A kezelt csoport fekális értékei elmaradtak a kontrollhoz képest. A szik P4 szintek a kontroll és stresszelt csoportokban, mindkét ivarban, azonosan alakultak. A fekális P4 koncentrációk is alacsonyabb értéket mutattak a kezelt csoportban.

A kísérlet eredményei a stressz anyai szteroid depozíciót befolyásoló hatását támasztják alá, mely hatással lehet a kelési ráta csökkenésére is.

SUMMARY

Szöke, Zs. Ms. – Ferenczi, Sz. – Biczó, A. – Péczely, P.: EFFECT OF MATERNAL HANDLING STRESS ON STEROID DEPOSITION INTO THE YOLK AND THE OFFSPRING IN MALLARDS

Handling stress was used in female mallards to study the steroid deposition into the yolk and the embryonic development. Handling stress was carried out by put the female mallards into wooden boxes and moving for 20 minutes. The procedure was repeated three times in three consecutive days, followed by blood sampling. During these manipulations feces were collected in every 4 hours and from the 3rd day the eggs were collected as well. The effect of stress was tested by changes of fecal steroid contents. Corticosterone- (B), testosterone- (T) 17- β -oestradiol- (E2), progesterone- (P4) and dehydro-epiandrosterone (DHEA) levels were analyzed using RIA method. Some eggs (2–4 eggs/groups/day) were incubated until 84th hours, then the eggshell was opened and the status of embryos was estimated. Embryonic or blastodermal tissue was taken for molecular sexing. The above mentioned steroids were analyzed from yolk too. The remaining eggs were hatched. The handling stress decreased hatching rate with about 20% which manifested in early embryonic mortality. The handling stress induced a 12–24 hours earlier hatching.

In treated group the corticosterone (B) level increased in the maternal feces and it appeared in the yolk too. On the effect of handling stress the maternal fecal T level increased, the E2 and P4 level decreased while the DHEA level didn't change. In the eggs containing male embryos of the stressed group, the testosterone concentration of the yolk was higher than in the control eggs while the DHEA levels decreased. In the stressed group the yolk containing female embryos E2 concentrations were significantly higher than in controls. In P4 levels no differences were found between the groups and the sexes.

These results support the idea of the modification effect of stress on the maternal steroid deposition.

BEVEZETÉS

A madárfiókák fenotípusát nemcsak a genetikai örökítőanyag átadása befolyásolja, hanem egyéb epigenetikus maternális hatások is. Az együttes anyai hatást a tojásszikbe deponált különböző biológiailag aktív vegyületek készletének átadása jelenti.

Bár a madártojások szteroid tartalmának vizsgálatai a 1920-as évekig nyúlnak, a technikai áttörést mintegy egy évtizede Schwabl (1993) munkássága hozta, aki a szikből Radio Immuno Assay-vel rutinszerűen megoldotta a különböző szteroid hormonok kimutatását. Vizsgálatai alapján bizonyítást nyert, hogy a kanári (*Serinus canaria*) tojásaiban a tesztoszteron mennyiség fokozatosan nőtt a lerakott tojások számával. A feltevés szerint a növekvő szteroid koncentráció (főként az androgén) kompenzálja a később lerakott tojás és utód „hátrányosabb” helyzetét (Schwabl, 1996), 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). A szikben található androgén — elsősorban a tesztoszteron koncentrációval — erős pozitív korrelációt mutat a kikeléskori izom tömeggel (Lipar, 2001), intenzívebb növekedési eréllyel és csökkent a kelési asszinkronitás is (Eising és mtsai, 2001). Ezen kívül Strasser és Schwabl (2000) megfigyelte, a magas androgén szint a csoportban betöltött magasabb dominancia szinttel és a jobb túléléssel, rátermettséggel áll összefüggésben.

Kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre arról hogyan és miként transzportálódik a madarakban — az elsődleges glükokortikoid, a kortikoszteron a tojásszikbe és ez az ott jelenlevő számottevő mennyiség, hogyan hat az embrió fejlődésére. Az emlősöknél már régóta ismert, hogy ha egy vemhes nősténynél glükokortikoid kezelést alkalmaznak, akkor az utód(ok) születési testsúlya szignifikánsan alacsonyabb lesz, mint a kontroll csoportban (Seckl, 2001). A fent említett számos vizsgálat is igazolta, hogy madarakban, a tojásszikben található szteroidok befolyásolják az utódok postnatális növekedését, fejlődését. Hayward és Wingfield (2004) vizsgálatai azt mutatták, ha japán fűrtojókba kortikoszteron implantátumot ültettek, ennek következtében magasabb kortikoszteron koncentrációt mértek a tojásszikben, majd a kelési százalék is alacsonyabb értéket mutatott, sőt ezen kívül ezek a csibék lassabban is nőttek a kontroll társaikhoz képest. Hasonló élettani hatásról számoltak be halaknál, ahol a megemelkedett glükokortikoid szint — a kortizol — növeli a peték mortalitását (Pottinger és Carrick, 2000), csökkenti a kikelés utáni lárvaméretet (McCormick, 1999) és növeli az abnormális lárvák gyakoriságát (Morgen és mtsai, 1999).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Állatok és tartásuk: Vizsgálatainkat egy éves tőkés récéken végeztük, melyeket szabad kifutós ólakban helyeztünk el. Az állatok számára a kacsátojótáp, mészkögritt és az átfolyó rendszerben biztosított víz *ad libitum* állt rendelkezésre, az esetleges termékenyülési problémák elkerülése érdekében nem a 3:1 ivararányt alkalmaztuk, a kezelt és kontroll csoportban is 15 tojó és 10 gácsér volt.

A stresszkezelést megelőző napon fekális alapadatgyűjtés történt mindkét csoportból. Handling (megfogás, befogás) stressz kivitelezése:

A tojókat a befogásuk után szállítóládába tettük és mozgattuk őket — ezzel mintegy a szállítást imitálva — 20 percig majd 10 perc szünetet követően ezt a procedúrát háromszor megismételtük. Végül vért vettünk állatainktól és bélsármintákat gyűjtöttünk. A kezeléseket, 3 egymást követő napon megismételtük. A kísérleti protokollt az 1. táblázat tartalmazza, a handling stresszt kétszer ismételtük, A második 2002. április 9-én kezdődött és teljesen megegyezik a handling-I-nél alkalmazottakkal.

1. táblázat

Handling-stressz kísérleti protokoll

Handling stressz I.	Március														Ápr. 01.
	19.	20.	21.	22.	23.	24.	25.	26.	27.	28.	29.	30.	31.		
Handling stressz II.	Április														
	09.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	
Bélsár-gyűjtés ideje, óra(1)	10	10	10		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	14	14	14												
	18	18	18												

Tojásgyűjtés keltetésre 03.21-től, ill. 04.12-től napi 1–3 tojás 84 órás inkubálás szik analízis és embrioszexálás*

Table 1.: Experimental protocol of handling-stress feces collection time, hours(1), * Eggs collection for handling from 03.21. and 04.12, daily 1–3 eggs, incubation time 84 hours, yolk analysis embryo sexing

Szteroid analízisek: A tojásszikból kortikoszteront (B) és szexuál szteroidokat: tesztoszteront (T) 17-β-ösztadiolt (E2), progeszteront (P4), dehydroepiandrosteront (DHEA) Radio Immuno Assay módszerrel határoztunk meg. A tojásszikból való szexuáliszteroid kinyeréshez a dietil-éteres extrakciót alkalmaztuk, melyet 1%-os Triton-X-100 emulgeálással egészítettük ki. Az extrakciót követő visszanyerést 3H-tesztoszteron hozzáadásával mértük, az átlagos visszanyerés: 71,79±11,32% volt. A kortikoszteron kinyeréséhez diklórmétánt használtuk és az extrakciós visszanyerést 3H-kortikoszteronnal teszteltük, az átlagos visszanyerés 71,19±8,89 % volt. A RIA az összes szteroid esetében 2,5 mg-ból történt.

Korábbi vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a tőkés récéknél az inkubáció 4. napjáig (96 óra) a szikben nem történik szignifikáns koncentráció változás a fent említett szteroidok esetében (Szőke és mtsai, 2003). A bélsárból — a tojásszikhez hasonlóan — szexuál szteroidokat és kortikoszteront határoztunk meg, az extraháló oldószerek is megegyeztek, csak ebben az esetben 1%-os SDS oldattal történő emulgeálást alkalmaztunk. A RIA az összes szteroid esetében 1mg-ból történt.

Embriószexálás: A vizsgálataink során a 84 órát inkubált tojásokból eltávolítottuk az embriót és Chelex 100 (Bio-Rad) extrakcióval genomiális DNS-t izoláltunk (Walsh és mtsai, 1991). Ezt követően a mintából 2 µl használtunk a PCR reakcióhoz a következő feltételek mellett:

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

Statisztikai analízis: A tojásszik szteroid tartalmának összehasonlításához F-próbát alkalmaztunk (Microsoft Excel, 98). A bélsárban mérhető szteroid ekvivalensek értékeléséhez, a kinetika és összproduktum összehasonlításához a görbe alatti terület integráltuk a Microcal Origin Version 3.5 szoftver segítségével.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Korábbi vizsgálataink alapján a handling-stressz kezelést követően a kezelt csoportban tojástermelés rövid idejű visszaesését figyelhetjük meg különösen az első kezelést követő 4–5. napon, ezzel párhuzamosan emelkedik a tojássúly: átlagban mintegy 7 százalékkal (Szőke és mtsai, 2003) és ez a megnövekedett súly a vizsgált periódusban mindvégig megfigyelhető volt. A nagyobb súlyú tojásokból a kikelő utódok száma csökkent

A kezelt csoport kelési százaléka mintegy 20%-kal elmaradt a kontrollihoz képest és ez a különbség jórészt a korai embrióelhalásból adódott (1. ábra).

1. ábra: Kelési eredmények a stresszkezelések után

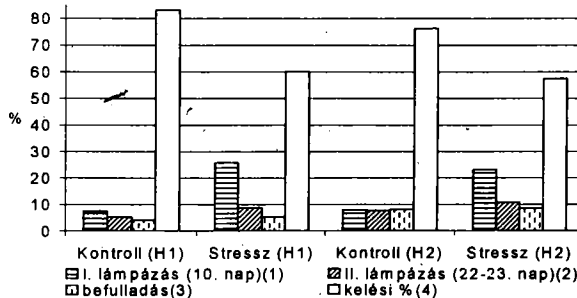


Fig. 1.: Percentages of hatchability after the handling stress' treatments candling (10th day)(1), candling (22 or 23th day)(2), perinatal death(3), percentage of hatchability(4)

Kétszeresére emelkedett az embrióelhalás (korai elhalás a keltetés 3–10. 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 szikanalízis vizsgálatokra 84 óra hosszat inkubált tojásokban is megfigyelhető az előbb említett tendencia, mely szerint a kezelt csoportban megnőtt az elhalt és abnormalis embriók aránya (2. és 3. ábra).

2. ábra: Embriófejlettség 84 órás inkubálás után a „handling” stresszt követően

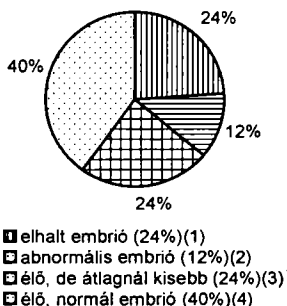


Fig. 2.: Embryonic development after 84th incubation time in stressed group

3. ábra: Embriófejlettség a 84 órás inkubálás után a kontroll kezelésben

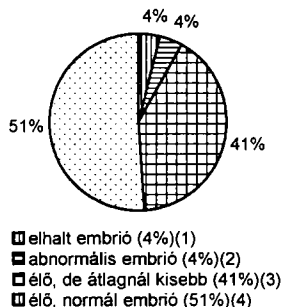


Fig. 3.: Embryonic development after 84th incubation time in control group

A handling stresszkezelés után a tojókban megnőtt a bélsárban mérhető kortikoszteron koncentráció (4. ábra), statisztikailag (a görbe alatti területszámítással) a 10. napig igazolható a megemelkedett glükokortikoid tartalom.

4. ábra: A tojók fekális kortikoszteron koncentráció változásai a stresszkezelés alatt és azt követően

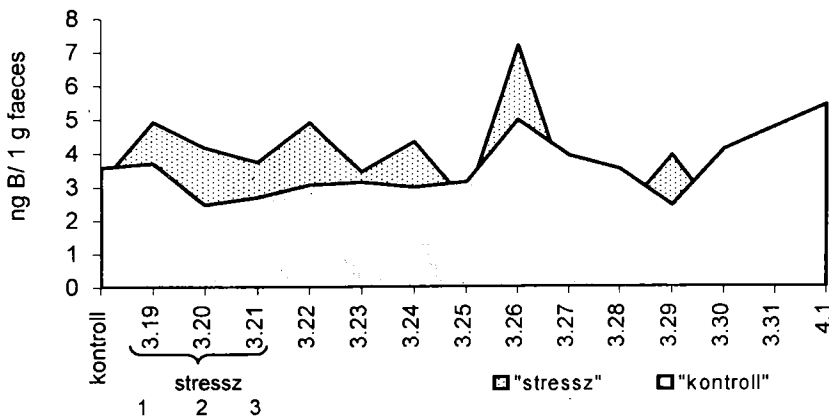


Fig. 4.: Changes of faecal corticosterone level in females during and after the stress treatments

Ezzel párhuzamosan a tojásszikben is detektálható egy erőteljes szignifikáns emelkedés mind a nőivarú-, mind a hímivarú embrióot tartalmazó tojások szikanyagát tekintve (5. ábra). Ez az eredményünk jól korrelál Hayward és Wingfield (2004) eredményeivel, mely szerint a tojókba szubkután implantált kortikoszteron „sylastic” segítségével megemelkedett kortikoszteron koncentráció átjutott a tojásszikbe.

5. ábra: A 84. óráig inkubált tojás szik-kortikoszteron (B) koncentrációi a két csoportban

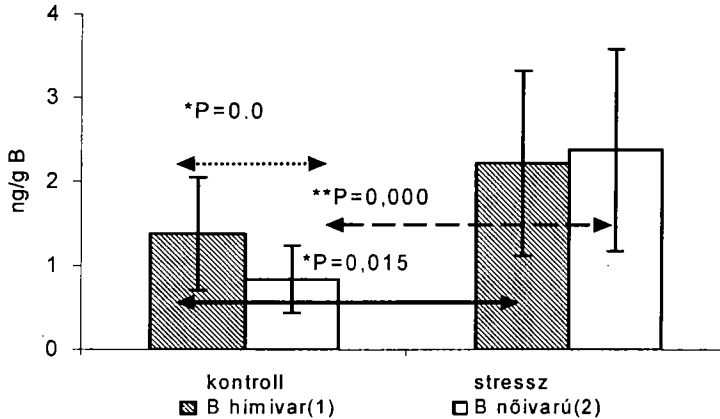


Fig. 5.: Yolk corticosterone (B) concentrations until 84th hour incubated eggs in both group B male(1), B female(2)

Érdekes ivari különbséget figyelhetünk meg a kontroll csoport tojásait illetően, ugyanis a hímivarú embrióot tartalmazó tojások szikanyagában magasabb kortikoszteron mennyiséget mértünk.

A kezelést követően a tojók bélsár mintáiban magasabb tesztoszteron koncentráció mérhető a vizsgálat 10. napjáig, majd a különbség eltűnik (6. ábra).

6. ábra: A tojók fekális tesztoszteron (T) koncentráció változásai a stresszkezelés alatt és azt követően

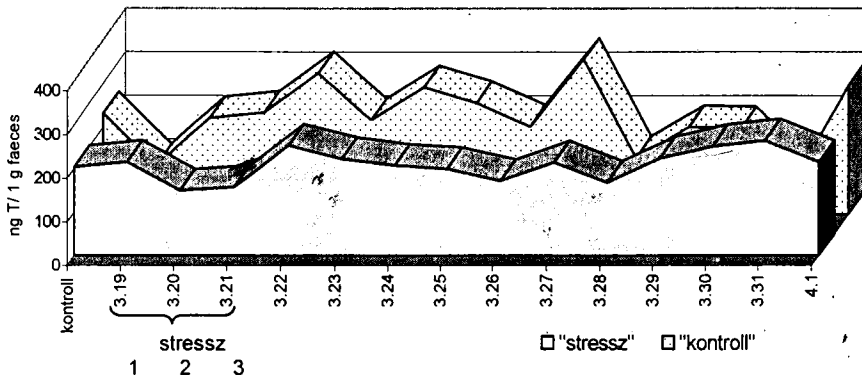
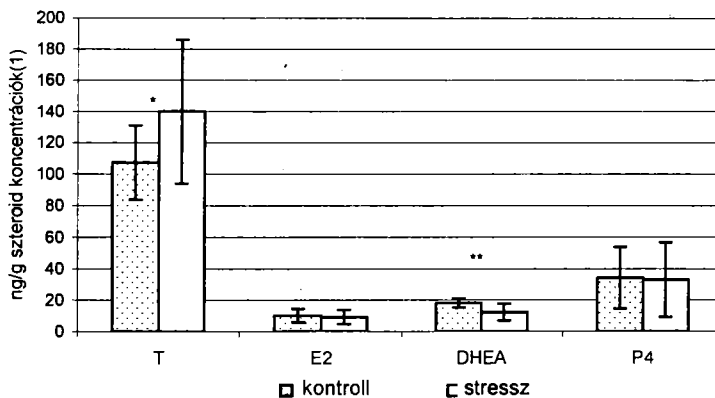


Fig. 6.: Changes of faecal testosterone level in females during and after the stress treatments

Ezt a megemelkedett androgén szintet csak a hímivarú embriót tartalmazó tojásszékben tudtuk kimutatni (7. ábra), míg a nőivarú embriót tartalmazó tojásoknál (8. ábra) a T koncentráció teljesen megegyezett.

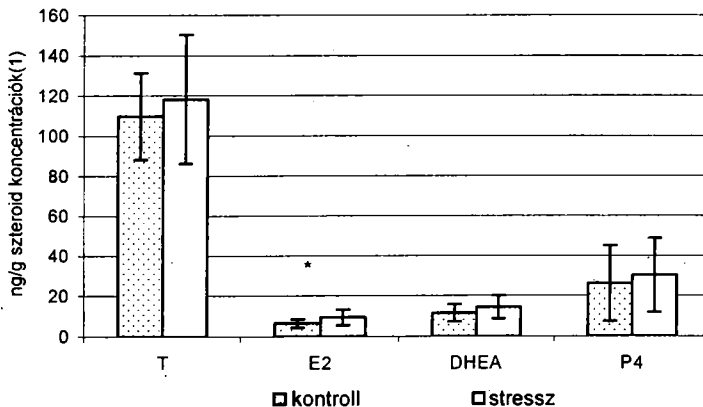
7. ábra: Szexuál szteroid koncentrációk a szikben (hímivarú embriót tartalmazó tojások)



* P=0,03 ** P=0,001

Fig. 7.: Yolk steroid concentrations in male embryo containing eggs
ng/g steroid concentrations(1)

8. ábra: Szexuál szteroid koncentrációk a szikben (nőivarú embriót tartalmazó tojások)



*P=0,02

Fig. 8.: Yolk steroid concentrations in female embryo containing eggs
ng/g steroid concentrations(1)

A kezelt 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 (2001) közlésével.

A fekális E2 koncentráció a kezelt csoportban mindvégig elmaradt a kontrollhoz képest (9. ábra), habár csak a kezelést követően 2–3 napig észleltünk visszaesést a produkcióban. A szikben mérhető ösztrogén tartalom a hím embrió tartalmazó tojásokban megegyezett, míg a nőivarúaknál (8. ábra) a kezelt csoportban mutat szignifikánsan magasabb értéket.

9. ábra: A tojók fekális ösztrogén (E2) koncentráció változásai a stresszkezelés alatt és azt követően

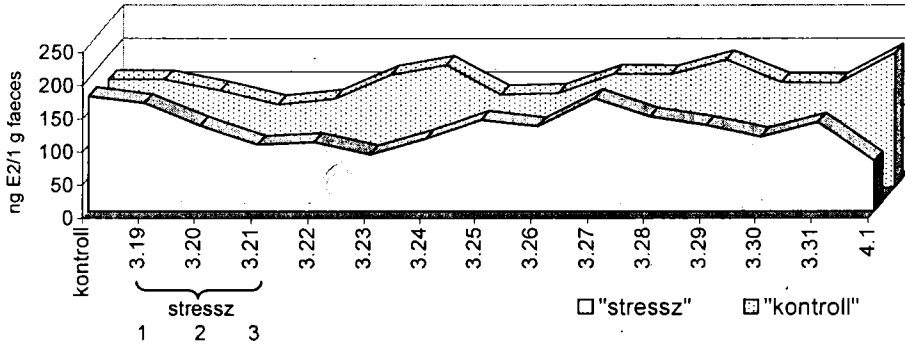


Fig. 9.: Changes of faecal oestrogen (E2) level in females during and after the stress treatments

A fekális DHEA szintek azonosan alakultak a kísérlet alatt (10. ábra), a kezelt csoportban a kezelés-sorozatot követő 2 napon találunk egy kiugró csúcserőértéket. A szikbe deponált DHEA koncentráció a hímivarnál (7. ábra) szignifikánsan alacsonyabb volt a kezelés hatására, nőivarnál (8. ábra) ez a szint azonosan alakult a két csoportban.

10. ábra: A tojók fekális dehydroepiandrosteron (DHEA) koncentráció változásai a stresszkezelés alatt és azt követően

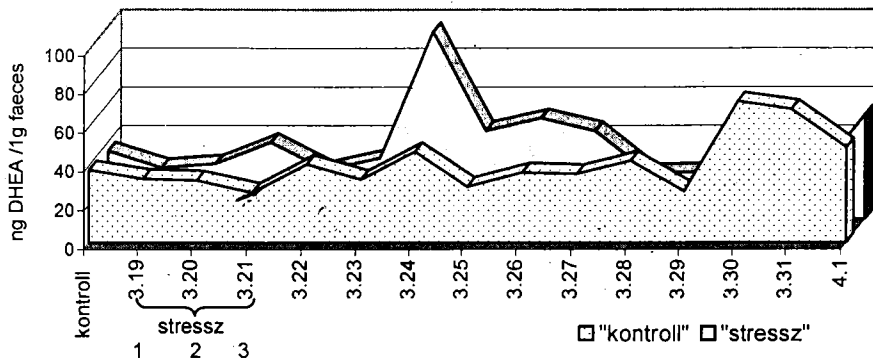


Fig. 10.: Changes of faecal dehydroepiandrosterone (DHEA) level in females during and after the stress treatments

A fekális P4 értékek a kezelést követő 9. napig elmaradnak a kontrollhoz képest, majd egy erőteljes szignifikáns növekedés látható, amely összefüggésben állhat a következő F1 tüsző nemzedékkel (11. ábra). A szikben nem található különbség (7. és 8. ábra).

11. ábra: A tojók fekális progeszteron (P4) koncentráció változásai a stresszkezelés alatt és azt követően

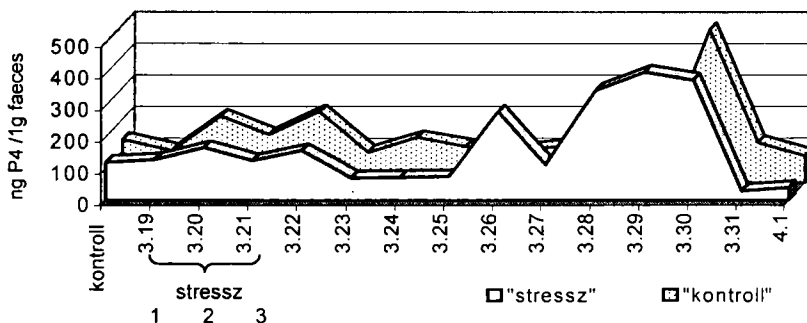


Fig. 11.: Changes of faecal progesterone (P4) level in females during and after the stress treatments

A kezelt csoport hímivarú embrióinál a T, míg a nőivarnál az E2 emelkedett meg szignifikánsan a stressz kezelés hatására. A DHEA koncentráció elmarad a kezelt csoport hímivarú embrióit tartalmazó tojásoknál.

Vizsgálataink a stressz válasz, illetve kortikoszteron forgalomváltozás, valamint a szik szexuál szteroid tartalma közti kölcsönhatásokra, továbbá a DHEA és T stresszt követő különböző típusú reakcióira hívják fel a figyelmet. A két androgén eltérő élettani szignifikanciája így ismét igazolást nyert.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom *Bara Sándornénak és Ladjanszky Veronikának* a kísérletekben-, valamint a szteroid analízisekben végzett lelkiismeretes munkájukért.

Külön köszönet jár *Barna Juditnak* a szakmai tanácsaiért.

IRODALOM

- Eising, C. – Eikenaar, C. – Schwabl, H. – Groothuis, T.G.G.(2001): Maternal androgens in black-headed gull (*Larus ridibundus*) eggs: consequences for chick development. Proc. R. Soc. Lond. 268. 839–846.
- Hayward, L.S. – Wingfield, J.C.(2004): Maternal corticosterone is transferred to avian yolk and may alter offspring growth and adult phenotype. Gen. Comp. Endocr., 135. 3. 365–71.
- 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. 315–321.

- Lipar, J.L.(2001): Yolk steroids and the development of the hatching muscle in nestling European Starlings. *J. Avian Biol.*, 32. 231–238.
- McCormick, M.I.(1999): Experimental test of the effect of maternal hormones on larval quality of coral reef fish. *Oecologia*, 118. 412–422.
- Morgan, M.J. – Wilson, C.E. – Crim, L.W.(1999): The effect of stress on reproduction in Atlantic cod. *J. Fish Biol.*, 54. 477–488.
- Ortinger, T.G. – Carrick, T.R.(2000): Indicators of reproductive performance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) selected for high and low responsiveness to stress. *Aquac. Res.*, 31. 367–375.
- 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 mechanism. *Molec. Cell. Endocrin.*, 185. 61–71.
- Strasser, R – Schwabl, H.(2000): Organizational effects of yolk testosterone in the house sparrow. *Soc. Neurosci. Abstracts*, 26. 1–2. 115. 5.
- Szőke, Zs.– Ferenczi, Sz.– Ádám, D. – Biczó, A – Péczely, P.(2003) Maternális stressz hatása a szikbe deponált szteroidokra és az utódok szomatikus tulajdonságaira tőkés récében (*Anas platyrhynchos*). *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 2. 180–188.
- Walsh, PS – 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.

Érkezett: 2005. január

Szerzők címe: Szőke, Zs.: Kisállattenyésztési- és Takarmányozási Kutatóintézet

Authors' address: Institute for Small Animal Research

H-2100 Gödöllő, Pf. 417.

Ferenczi, Sz.: Mezőgazdasági Biotecnológiai Kutatóközpont

Agricultural Biototechnology Center

H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi u. 4.

Biczó, A. – Péczely, P.: Szent István Egyetem, Szaporodásbiológiai Lab.

Szent István University, Lab of Reproductive Biology

H-2100 Gödöllő, Péter K. u.1.

ANYAJUHKOK SZAPORULATI MUTATÓINAK ALAKULÁSA ÉS AZOK ÉLETTELEJESÍTMÉNYRE GYAKOROLT HATÁSA A TENYÉSZTÉSBE VÉTELI IDŐ ÉS A SŰRÍTETT ELLETÉS FÜGGVÉNYÉBEN

NAGY LÁSZLÓ — PÓTI PÉTER — PAJOR FERENC — LÁCZÓ EDINA

ÖSSZEFOGLALÁS

A kísérletben 1995. január 1. és 1995. február 10. között született magyar merinó jerkebárányok szerepeltek. A jerekét 30–35 kg testsúly elérésekor 9,5–10,5 hónapos kor körül termékenyítették először. Az ekkor termékenyült jerek ($n=83$) egyedei alkották az I. csoportot. Az éves kor körül nem kellően fejlett állatokat, vagy először, vagy ismét termékenyítették, ezek alkották a II. csoportot ($n=65$). Az első ellést követően mind a két csoport egyedei átlagosan 8 havonta ellettek, tartásuk és takarmányozásuk azonos módon történt. A tavasz végi termékenyítési szezonban (április-május) ivarzás szinkronizálást alkalmaztak. Az I. csoport első ellése alkalmával 1,02 volt az átlagos bárányszám, a második ellés alkalmával 1,36, amely közel azonos a II. csoport első ellés kori bárányszámával (1,3). A további ellésenkénti átlagos bárányszám között alig volt különbség, az első csoportnál $1,37\pm 0,16$, a II. csoportnál $1,38\pm 0,11$ volt a bárányok száma. A vizsgálatok végeztek (2004. október) az I. csoport egyedei tizennégyszer, a II. csoport egyedei tizenháromszor ellettek. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a magyar merinó jerek 10–11 hónapos korban tenyésztésbe vehetők, és sűrítve (8 havonta) elletetők megfelelő felnevelési, tartási és takarmányozási körülmények között.

SUMMARY

Nagy, L. – Póti, P. – Pajor, F. – Láczó, E. Ms.: CHANGES OF PROLIFICACY TRAITS OF EWES AND THEIR EFFECTS ON LIFE PRODUCTION DEPENDING ON EARLY BREEDING AND FREQUENTED LAMBING

The study was carried out with ewe lambs of the Hungarian Merino breed, born between 1. January and 10. February 1995. Ewe lambs were first mated at a weight of 30–35 kg, in their age of 9.5–10.5 months. The individuals of ewe lambs successfully fertilized at this time constituted of group I. ($n=83$). Ewe lambs exhibiting an inadequate maturation or irregular oestrus were assigned into group II. ($n=65$) and these were mated first or repeatedly at their age of 15–20 months. After the first lambing, ewes of both groups were lambing at an interval of 8 months an average ensured similar keeping and feeding conditions. In the late-spring mating season (April-May) oestrus synchronization was applied. With group I., the average litter size was 1.02 during the first lambing and it was 1.36 on occasion of the second lambing. The latter figure was slightly higher the average litter size (1.30) produced by ewes in group II. in their first lambing. Subsequently, the average litter size was comparable between group I. and II. 1.37 ± 0.16 and 1.38 ± 0.11 , respectively. By the end of the experiments, the total number of lambing corresponded to 14 and 13, in group I. and II., respectively. In conclusion, ewe lambs of the Hungarian Merino breed can be introduced into breeding at their age of 10-11 months and used at a frequented littering (at an interval of 8 months) under adequate rearing than keeping and feeding conditions.

BEVEZETÉS

Magyarországon az árutermelő juhállományok jövedelmezőségét — a minőségi bárány előállításán kívül — a bárányszaporulat növelésével, valamint az időszakos piac igényeihez való alkalmazkodással lehet elérni. *Bedő* (1989) a mennyiségi és minőségi termék előállításra hívja fel a figyelmet. Hazánkban az évente egyszeri elletés terjedt el. Az olasz piac viszont három időszakban (húsvét, ferragusto, karácsony) igényel nagyobb mennyiségű bárányt. Így a magyar tenyésztőknek alkalmazkodni kell ezekhez az értékesítési időszakokhoz. *Nagy és mtsai* (1998) szerint szükséges a két ellés közötti idő csökkentése ahhoz, hogy minél jobban kielégítse az időszakos piac igényeit. Ennek egyik legkézenfekvőbb módja az anyajuhok sűrített osztott (átlagosan 8 havonkénti) elletése. Ez azért is indokolt, mert nemcsak több bárányunk lesz, hanem növeli az értékesítés biztonságát, illetve lehetővé teszi a jobb áron értékesíthető augusztusi és karácsonyi bárány előállítást is.

Annak ellenére, hogy a magyar merinó fajta számos más, a világon elterjedt fajttal ellentétben megfelelő tartási és takarmányozási körülmények között gyakorlatilag egész éven át termékenyíthető, mégsem használjuk ki ezt a lehetőséget. Jelenleg 900 ezer anyajuh található az országban ezek több mint 90%-a magyar merinó genotípusú. Hazánkban általában másfél éves életkorban veszik tenyésztésbe a jerekéket, holott a magyar merinó már 8 hónapos kora körül tenyészérett. A korai tenyésztésbevitellel kapcsolatban, a korábbi években már folytak vizsgálatok Magyarországon, melyek során nem egyértelmű eredményeket közöltek (*Gaál*, 1964, 1972; *Becze*, 1977). A juhtenyésztés jelenlegi helyzetére jellemző, hogy a szaporulati mutatók nagyon rossz értékeket mutatnak. Genetikailag a magyar merinó anyáktól ellésenként állományszinten megfelelő tartási és takarmányozási viszonyok között 1,2–1,3 élő szaporulat várható el. Ezt bizonyítja, hogy a '80-as években a magyar merinó állomány szaporulata e körül alakult. Napjainkban a hústermelésre szakosodott állományokban csaknem kizárólagos bevételi forrást a bárány értékesítése jelenti. Tehát központi kérdéssé vált a minél nagyobb mennyiségű és minőségben is kiváló bárány előállítása.

Ezért vizsgáltuk a magyar merinó anyák sűrítve elletését és korai tenyésztésbevitelét, valamint ezek életteljesítményre gyakorolt hatását.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatok egy Eger határában található árutermelő magyar merinó tenyészetben történtek. A kísérletben 1995. január 1. és 1995. február 10. között született magyar merinó jerekbárányok vettek részt. A jerekéket 30–35 kg testsúly elérésekor 9,5–10,5 hónapos kor körül termékenyítették először, hárembeli pároztatással. Az ivarzó jerek kiválogatása próbakossal történt. A megfelelő fejlettségű, a már rendszeresen ivarzott egyedek termékenyültek ($n=83$) és alkották az I. csoportot. Az ebben az időben nem termékenyült jerekéket másfél éves kor körül (15–20 hónapos) termékenyítették ismét, és ezek alkották a II. csoportot ($n=65$). Összesen 158 juh került a kísérletbe. Az első ellést követően mind a két csoport egyedei átlagosan 8 havonta ellettek. A tavasz végi termékenyítési szezonban (április-május) ivarzás-szinkronizálást

kenyítési szezonban (április-május) ivarzás-szinkronizálást végeztek. A takarmányozás és tartás mindkét csoport egyedei esetében azonos módon történt. A tenyészállatok takarmányozása évenként változott a takarmány táplálóanyag-tartalmának megfelelően, de nagyon fontos, hogy mindig optimális tenyész-kondícióban voltak. Az első elléstől kezdődően a következő adatok gyűjtése és értékelése történt: tenyésztésbe-vételi életkor, két ellés között eltelt időtartam, ellésenkénti megellett anyalétszám, ellésenkénti bárányszám (halva született bárányok száma is), és a tenyésztésből kiesés időpontja.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A korán tenyésztésbevetett jerekéknél az első ellés alkalmával az átlagos bárányszám 1,02 volt, hasonló eredményeket kapott Gaál (1964, 1972), Gáspár (1983), Mucsi (1998) is. A korai (9,5–10,5 hónaposan) tenyésztésbe vett jerek is elérik (22–24 hónapos korra) a kifejlett kori testsúlyt (Gaál, 1964). Az I. csoport második ellése alkalmával az átlagos bárányszám 1,36 volt, amely közel azonos a II. csoport első ellés alkalmával az átlagos bárányszámával 1,30. A további ellésenkénti átlagos bárányszám a két csoportnál közel azonos volt (1. ábra).

1. ábra: Az átlagos bárányszám változása ellésenként

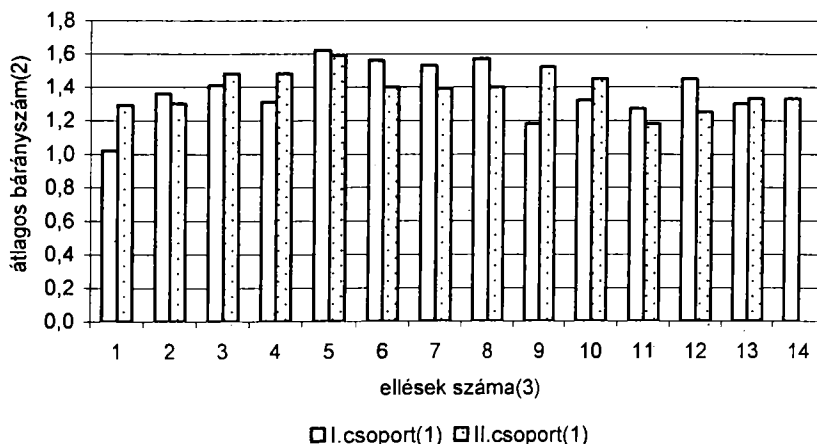


Fig. 1: Change of average number of lamb per lambing group(1), average number of lamb(2), number of lambing(3)

A vizsgálatok végezték az I. csoport egyedei tizennégyszer, a II. csoport egyedei tizenháromszor ellettek (2. ábra). Az átlagosan 9,5 éves anyajuhok bárány hozamának összehasonlításakor a kiinduló anya létszámra vetített bárányszámból megállapítható, hogy az ellésenkénti egy anyára jutó átlagos bárányszám hasonló volt (I. csoportnál $1,37 \pm 0,16$, a II. csoport $1,38 \pm 0,11$). Az egy anyára jutó átlagos összes bárányszámban az I. csoport eredményei jobbák voltak (I. csoport: 19,23, a II. csoport: 18,06).

2. ábra: A tenyésztésbe vételi időpont és két ellés között eltelt napok változása

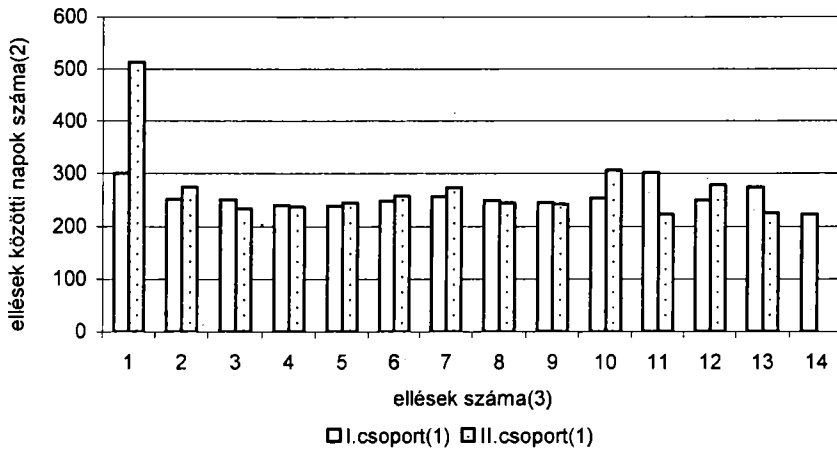


Fig. 2.: Change of time of introduced into breeding and change of interval of among two lambing group(1), interval of lambing(2), number of lambing(3)

A két ellés közötti idő 240 és 300 nap között változott mindkét csoport egyedénél, viszont egyes esetekben 240 nap alá is csökkent (2. ábra), hasonló következtetésekre jutott Veress (1974), Veress és mtsai (1991), Nagy és mtsai (1998) is. A szórás értékek megfelelnek a tenézszi időszak hosszának, ugyanis a kosok hathétig voltak a nyájban. A sűrített elletés esetén a két ellés közötti idő a korai tenézszi-bevételi csoportnál a második és ötödik ellés között csökkent hasonlóan, mint Nagy és mtsai (1998) kísérletében. A két csoport között szignifikáns különbség mutatható ki az első ellésnél a tenézszi-bevételi időben és az első ellés átlagos bányaszámában. A többi ellésnél nem mutatható ki szignifikáns különbség a két csoport egyedei között.

A korábban és átlagosan másfél évesen tenézszi-bevételt vett jerek is sűrített (8 havonta) elletethetők. Azonos megállapítást közölt Veress (1974, 1990), Látits (1981), Veress és mtsai (1989, 1991), Kádas (1998) is. A sűrített elletés csak korai (30–40 napos) bányaválasztás esetén képzelhető el, összhangban Veress (1974, 1990); Veress és mtsai (1989) eredményeivel. A sűrített elletés másik feltétele az anyajuhok megfelelő (2,5–3,0 pont) kondíciója. Ehhez elkerülhetetlen az anyák mindenkorai szükségletét kielégítő takarmányozás. Tehát a megfelelő tartás és takarmányozás, amelyre már korábban Schandl (1951a), Gaál (1964), Tangl (1971), Gáspár (1983), Látits (1987), Mucsi és Túri (1988), Bedő (1989), Veress és mtsai (1989), Veress (1990), Mucsi (1998, 2001), Mucsi és Benk (2002) is felhívta a figyelmet. Különös gondot kell fordítani a kiegészítő takarmányozásra is a tápanyag hiányos időszakokban, amint azt Bedő és mtsai (2002) hangsúlyozták.

A bányayelhullás a szoptatás ideje alatt közel azonos volt mindkét csoportban. A megellett anyalétszám a hatodik ellésig kis mértékben csökkent, majd nagyobb mértékű volt a csökkenés mindkét csoportnál. Az összes megellett anyajuh létszámot alapul véve (n=148) a nyolcadik ellést az anyák már csak közel fele élte meg (3. ábra).

3. ábra: A vizsgálati periódusban részt vett anyák aránya

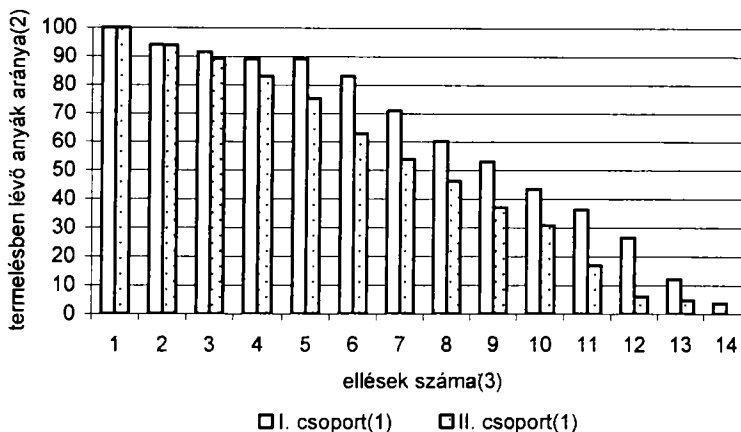


Fig. 3: Rate of ewes in experiment period group(1), rate of ewes(2), number of lambing(3)

Tehát az eredmények azt mutatják, hogy a magyar merinó jerekék 9,5–10,5 hónapos korban megfelelő tartás és takarmányozás esetén tenyésztésbe vehetők. Az első bárányt károsodás nélkül kihordják, problémamentesen ellenek, és az első bárányt fel tudják nevelni szervezetük károsodása nélkül. Hasonló eredményekre jutott Gaál (1964, 1972), Gáspár (1983), ezzel ellentétben Látits és Tury (1985) 7–8 hónapos korban nem javasolták a jerekék tenyésztésbevitelét. Az igényeket kielégítő ásványanyag ellátás is fontos, hasonlóan Tangl (1971), Veress (1974, 1990) véleményéhez. Az ivarzási szezonon kívül (április-május) csak ivarzás-szinkronizálással érhető el megfelelő termékenyülési eredmények hasonlóan Becze (1960), Mészáros (1970), Tangl (1971), Látits és Becze (1975), Látits (1981, 1983, 1987), Mucsi és Túri (1988), Veress (1990) közléseihez. A szinkronizálásnak ugyan többlet költsége van, de ha 70% körüli a termékenyülés és 1,2–1,3 az ellésenkénti átlagos bárányszám, tehát ha anyai bárány születik amennyi állatot szinkronizáltak, a kezelés már gazdaságos. Figyelembe kell venni azt, hogy abban az esetben, ha egész évben termel az állomány (vemhes vagy bárányt nevel) nehezen végezhető el az állategészségügyi kezelések és az oltások. A nyírás és trágyázás idejét is pontosan meg kell tervezni. Több jól betanított tenyészkosra van szükség, amelyek kézből is ugranak. A januári és februári születésű jerekéket célszerű tenyésztésre meghagyni, mert ezek érik el a kellő fejlettséget az őszi termékenyítési szezonra.

KÖVETKEZTETÉS

A vizsgálataink alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

— A magyar merinó jerekék 9,5–10,5 hónapos korban megfelelő tartás és takarmányozás, esetén tenyésztésbe vehetők, mivel az első magzatot káros-

dás nélkül kihordják, problémamentesen ellenek és az első bárányt fel tudják nevelni szervezetük károsodása nélkül.

— A korábban (9,5–10,5 hónapos korban) tenyésztésbe vett, és az átlagosan másfél évesen tenyésztésbe vett jerek is sűrítve (8 havonta) ellelhetők.

— A termelésből való kiesés aránya kisebb a korábban tenyésztésbe vett jerekénél, mint az átlagosan másfél évesen tenyésztésbe vett jereké esetében.

— A második elléstől az ellésenkénti bárányszám azonosnak tekinthető a korai (9,5–10,5 hónaposan) és hagyományos időben (15–20 hónaposan) tenyésztésbe vett egyedeknél.

IRODALOM

- Becze, J.(1960): A fésűs merinó és a cigája anyák nemikészülékének és endokrin szerveinek vizsgálata tekintettel a szaporulat növelésének biológiai lehetőségeire. Állattenyésztés, 9. 3. 253–256.
- Becze, J.(1977): A szaporaság (a reprodukciós kapacitás) növelésének alapjai és lehetőségei a juhtenyésztésben. Állattenyésztés, 26. 2. 119–125.
- Bedő, S.(1989): A hazai juhtenyésztés adottságai és lehetőségei, Állattenyésztés és Takarmányozás, 38. 4. 296–298.
- Bedő, S. – Póti, P. – Tózsér, J.(2002): A juhok tömegtakarmány ellátása. Magyar Juhászat, a Magyar Mezőgazdaság melléklete, 7. 4–5.
- Gaál, M.(1964): Báránnyak tenyésztésbevétele 8-12 hónapos korban. Állattenyésztés, 13. 2. 125–132.
- Gaál, M.(1972): Korszerűsített magyar fésűsmerinó báránnyak korai tenyésztésbevétele 7–9 hónapos korban. Állattenyésztés, 21. 1. 71–80.
- Gáspár, M.(1983): A juhok szelektálása ikerellősségre és koraérés a világ korszerű juhtenyésztési gyakorlatában. (Tanulmány), MFM Információs Központ, Budapest
- Kádas, A.(1998): Tenyésztési tartalekok (egy gyakorlati tenyésztő szemével). Magyar Juhászat, a Magyar Mezőgazdaság melléklete, 10. 6–7.
- Láti, Gy.(1981): A sűrített bárányoztatás eredményei modellkísérletben és nagyüzemi viszonyok között. Magyar Állatorvosok Lapja, 36. 11. 748–750.
- Láti, Gy.(1983): Az ovulatio lefolyásának vizsgálata anyajuhokban, tenyésztésben kívül indukált ivarzásban. Magyar Állatorvosok Lapja, 38. 9. 520–522.
- Láti, Gy.(1987): Néhány ciklusindukációs hormonpreparátum összehasonlító vizsgálata juhban. Magyar Állatorvosok Lapja, 42. 8. 479–481.
- Láti, Gy. – Becze, J.(1975): Az ovuláció időbeli lefolyása szezonon kívül indukált ivarzásban, tekintettel a termékenyítési idő megválasztására. Állattenyésztési Kutatóintézet Közleményei, II. kötet 1. 51–73.
- Láti, Gy. – Tury, E.(1985): Ivarérettség és tenyészérettség vizsgálata merinó jerekben. Magyar Állatorvosok Lapja, 40. 10. 591–595.
- Mészáros, I.(1970): A nagyüzemi juhtenyésztés szaporodásbiológiai problémái. Állattenyésztés, 19. 1. 9–13.
- Mucsi, I.(1998): A takarmányozás és a szaporodás kapcsolata a juhtenyésztésben, XXVII. Óvári tudományos napok. Állattenyésztési szekció, Mosonmagyaróvár, I. kötet, 131–133.
- Mucsi, I.(2001): A takarmányozás és a kondíció hatása a juhok szaporodására. Magyar Juhászat, a Magyar Mezőgazdaság melléklete, 11. 4–5.
- Mucsi, I. – Benk, Á.(2002): A merinó juh fajta ikerellési lehetősége. Magyar Juhászat, a Magyar Mezőgazdaság melléklete, 7. 8.
- Mucsi, I. – Túri, L.(1988): Ivarzásszinkronizált juhok vemhességi ideje. Állattenyésztés és Takarmányozás, 37. 5. 431–439.
- Nagy, I. – Veress, L. – Komlósi, I. – Horváth, V-né(1998): Két bárányozás közötti időt befolyásoló hatások. Állattenyésztés és Takarmányozás, 47. 3. 209–219.
- Schandl, J.(1951a): Kétévenkénti háromszori elletés a fésűsmerinó-juhászatokban. Magyar Mezőgazdaság, 8. 13.
- Schandl, J.(1951b): Milyen korban bocsáthatók kos alá a fésűsmerinó növendékek? Magyar Mezőgazdaság, 18. 17.

- Tangl, H.*(1971): A szinkronizálás lényege és felhasználhatósága az állattenyésztésben. *Állattenyésztés*, 20. 3. 211–216.
- Veress, L.*(1974): A szaporaság fokozásának lehetősége a juhtenyésztésben. *Állattenyésztés*, 23. 3. 23–28.
- Veress, L.*(1990): A juhok sűrített elletésének néhány biológiai és genetikai összefüggése. Tessedik Sámuel Tiszántúli Mezőgazdasági Tudományos Napok, DATE MTK, Debrecen
- Veress, L. – Komlósi, I. – Végh, J.*(1991): Fésűs és booroola F1 merinó sűrítve elletettségének vizsgálata. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 40. 2. 143–149.
- Veress, L. – Végh, J. – Komlósi, I.*(1989): Magyar merinók sűrítve elletésének tapasztalatai. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 38. 1. 37–46.

Érkezett: 2005. január

Szerzők címe: Nagy, L.: Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet

Authors' address: Institute for Small Animal Research
H-2100 Gödöllő, Pf. 417.

Póti, P. – Pajor, F. – Láczó, E.: SZIE, Mezőgazdaság és Környezetud. Kar
Szent István University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences
H-2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.

ÖSSZEFÜGGÉS A KUMULUSZ MORFOLÓGIAI VÁLTOZÁSA ÉS A PETESEJT ÉRÉS DINAMIKÁJA KÖZT FOLLIKULÁRIS SERTÉS PETESEJTEK *IN VITRO* MATURÁLTATÁSAKOR*

SOMFAI TAMÁS — KIKUCHI KAZUHIRO — ONISHI AKIRA —
IWAMOTO MASAKI — FUCHIMOTO DAI-ICHIRO — BALI PAPP ÁGNES —
DINNYÉS ANDRÁS — SATO EIMEI — NAGAI TAKASHI

ÖSSZEFOGLALÁS

Sertés petesejtek *in vitro* érlelése során a maturáltatás második felétől (a 20. órától) kumulusz-petesejt komplexek több csoportja különböztethető meg a kumulusz állomány morfológiája és expandáltsága alapján. Ismert, hogy a kumulusz jelentős szerepet játszik a petesejtek sejtmagi érésének indításában. A kísérletek célja az volt, hogy van-e különbség az eltérő morfológiai csoportok között a petesejtek sejtmagi érését, aktiválhatóságát és polispermia-ra való hajlamát tekintve. Az eredményeink azt mutatták, hogy azok a petesejtek, melyek kumulusz állománya a tenyésztőedény aljához csatlakozott, jóval gyorsabban átesetek a sejtmagi érésen, mint azok a petesejtek, melyek expandált kumulusszal körülvéve szabadon lebegtek a tápfolyadékban. A petesejtek parthenogenetikussá aktiválását követően a női előmag formálódás gyakorisága is magasabb volt a tenyésztőedényhez csatlakozott petesejtek esetében ($85,4 \pm 14,5\%$ vs $16,7 \pm 4,4\%$), ami az ilyen petesejtek korábbi citoplazmatikus érését feltételezi, melyet vélhetőleg azok előrehaladott idősődése okoz. A petesejtek *in vitro* termékenyítését követően a monospermikus termékenyülés aránya szignifikánsan magasabb volt a lebegő, expandált kumulusszal körülvelt petesejteknél ($44,1 \pm 4,1\%$), mint a tenyésztőedényhez tapadt oociták esetében ($21,2 \pm 4,4\%$). Ez is a letapadó petesejtek előrehaladott idősődésére utal. A kumulusz állomány viselkedése tehát hatással van a petesejtek sejtmagi és citoplazmatikus érésére és az eltérő kumulusz morfológia a petesejtek heterogén minőségére utal.

SUMMARY

Somfai, T. – Kikuchi, K. – Onishi, A. – Iwamoto, M. – Fuchimoto, D. – Bali Papp, Á.Ms. – Dinnyés, A. – Sato, E. – Nagai, T.: THE RELATIONSHIP BETWEEN THE MORPHOLOGIC CHANGES OF CUMULUS AND THE NUCLEAR PROGRESSION OF FOLLICULAR PORCINE OOCYTES DURING *IN VITRO* MATURATION

Based on the morphology and expansion of the cumulus cells, several different classes of porcine cumulus-oocyte complexes (COCs) can be distinguished, during their maturation *in vitro*. The goal of the present study was to find out the characteristics of their nuclear progression, cytoplasmic maturation and the frequency of monospermy after IVF. It was found that oocytes attached to the bottom of culture dish with dark, compact cumulus underwent nuclear maturation and acquired their ability to be activated earlier than floating oocytes showing normal cumulus expansion. The rate of monospermic fertilization after IVF of normal COCs showing normal cumulus expansion was higher than that of COCs attached to the dish.

These results suggest that diverse behaviour of cumulus cells during *in vitro* culture affects nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes, which also affects IVF results.

* A kutatást a NKTH OM-KMÜFA BIO-00086/2002 pályázata, valamint a német-magyar kétoldalú együttműködés (TÉT D6/01) és az OTKA T43131 projektek támogatták

BEVEZETÉS

Sertés petesejtek *in vitro* érlelése (IVM) alapanyagot szolgáltathat olyan reprodukciós technikákhoz, mint az *in vitro* termékenyítés (IVF), a spermium mikroinjektálás (ICSI) vagy a sejtmagátültetési klónozás. Az egyes petesejtek érése azonban eltérő időben kezdődik meg az *in vitro* tenyésztés során így a petesejtek érettségi állapota heterogén. A kumulusz sejtek jelentős szerepet játszanak a petesejtek érésében. Számos, a termékenyüléshez és embrionális fejlődéshez szükséges anyagot termelnek és juttatnak a petesejtbe (Nagai, 1994, 2001). Ezen kívül a kumulusz sejtek fontos szerepet játszanak a petesejtek érésének szabályozásában. A meiózis megkezdése előtt a kumulusz sejtek a petesejt érés gátlásáért felelősek (Eppig és Downs, 1984; Isobe és mtsai, 1996) és a petesejt érés indításában is szerepet játszanak bizonyos kumulusz sejtek által termelt faktorok (Guliang és mtsai, 1994; Xia és mtsai, 2000; Downs, 2001). Kumulusszal körülvett sertés petesejtek *in vitro* érlelése során a komplexek négy eltérő kategóriája különböztethető meg a kumulusz állomány morfológiája alapján. Tanulmányunkban a különböző morfológiai típusba tartozó petesejtek sejtmagi érését, aktiválhatóságát és polispermiára való hajlamát hasonlítottuk össze.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Petesejt gyűjtés és in vitro érlelés (IVM)

A kísérlet során felhasznált kumulusszal fedett petesejteket vágóhídon gyűjtött prepubertás korú sertések (lapály x nagy fehér sertés) petefészkeiből nyertük a 3–5 mm nagyságú tüszők disszekciójával. A gyűjtő folyadék M 199 air volt (Kikuchi és mtsai, 2002). A maturációs médium TCM 199 volt melyet 0.91 mM nátrium piruváttal (Sigma S-3362), 10 NE/ml PMSG-vel, 10 NE/ml hCG-vel, 20 ng/ml hámnövekedési faktoral (EGF Sigma, E-4127), 150 μ M ciszteaminnal (Sigma M-9768) 100 egység/ml penicillinnel (Sigma PEN-K), 0.1 mg/ml sztreptomocinnal (Sigma S-0890) és 10% sertés follikulusz folyadékkal egészítettünk ki. A petesejteket 48 órán át 500 μ l-es médium cseppekben, 25–30-as csoportokban 4 lyukű tenyésztő edényekben (Nunc Multidishes, Nalge Nunc International, Denmark) 5% CO₂, 5% O₂ és 90% N₂ tartalmú légtérben 39 °C-on érleltük.

A kumulusz-petesejt komplexek osztályozása

A kumulusz morfológiája alapján a következő típusok különböztethetők meg az *in vitro* maturáltatás 20. órájától:

1. típus: a petesejtet expandált kumulusz borítja, és szabadon lebeg a médiumban.
2. típus: a petesejt szabadon lebeg a médiumban, de a kumulusz állomány kompakt.
3. típus: a komplex a tenyésztő edény aljához tapadt, a kumulusz állomány kompakt.

4. típus: a komplex a tenyésztő edény aljához tapadt, a kumulusz kompakt, de a kumulusz állomány legalább 30%-a degradálódott

Az érett petesejtek partenogenetikus aktiválása

Az *in vitro* érlelést 42. órájában a petesejtek egy részéről eltávolítottuk a kumulusz sejteket 0,1% hyaluronidáz segítségével. A sarkitesttel rendelkező petesejteket ezt követően 0,28 M d-mannit, 0,05 mM CaCl₂, 0,1 mM MgSO₄, és 0,01% (w/v) BSA tartalmú aktivációs médiumban átmostuk majd egy alkalommal 1,0 kV/cm egyenárammal 100 µsec időtartamon át stimuláltuk. Ezt követően a petesejteket 8 órán át 500 µl cseppekben módosított NCSU-37 médiumban tenyésztettük (Petters és Wells, 1993) mely 4mg/ml BSA-t, 50 µM β-merkaptóetanolt, 2,73 mM nátrium laktátot és 0,165 mM nátrium piruvátot tartalmazott (Kikuchi és mtsai, 2002). Az embriótenyésztés 4 lyukú tenyésztő edényekben, 5% CO₂, 5% O₂ és 90% N₂ tartalmú légtérben 38,5 °C-on zajlott.

A petesejtek in vitro termékenyítése (IVF)

Az *in vitro* érlelés végén a petesejteket paraffin olajjal fedett 100 µl Pig-FM (Suzuki és mtsai, 2002) médium cseppekbe helyeztük és 1 x 10⁵/ml mélyhűtött mellékheréből származó sertés spermával ko-inkubáltuk (Kikuchi és mtsai 1998) három órán át 39 °C-on, 5% CO₂, 5% O₂ 90% N₂ tartalmú légtérben. Ezt követően a zona pellucida felszínéről egy üveg pipetta segítségével eltávolítottuk a spermiumokat, majd a zigótákat 8 órán át 500 µl cseppekben, módosított NCSU-37 médiumban tenyésztettük.

A petesejtek és embriók elbírálása

A petesejtek sejtmagi állapotának meghatározásához illetve az aktiváció és az IVF elbírálásához a petesejteket és zigótákat etanol-ecetsav keverékben (3:1) 3 napon át fixáltuk, majd 1%-os ecetsavas orceinnel festettük és fázis-kontraszt mikroszkóp alatt vizsgáltuk.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az *in vitro* maturáltatás 30. órájában az érett (M-II) petesejtek aránya a 4. típusba tartozó petesejtek esetében szignifikánsan magasabb volt (41,6±14,1%), mint az 1., 2., 3. csoportba tartozó petesejteknél (0–16,6%). Az IVM 36. órájában az M-II petesejtek aránya mind a 3. (50,0±2,5%) és a 4. (58,8±10,4%) típusú petesejtek esetében elérte a maximum értéket és szignifikánsan magasabb volt (P<0.05) mint az 1. és 2. típusba tartozó petesejteknél (21,0–31,6%). Az IVM 42. órájától nem volt statisztikailag igazolható különbség a petesejtek között (44,9–67,7%) tehát a sejtmagi érés korábban, az IVM 36. órájában befejeződött.

Amikor a petesejteket 42 óra IVM után aktiváltuk. A 3. és 4 csoportba tartozó oociták többségében (85,4±14,5% és 82,5±3,1%) női elömag fejlődött. Ez az

érték szignifikánsan alacsonyabb ($P < 0,05$) volt az 1 típusba tartozó petesejtek-nél ($16,7 \pm 4,4\%$). A 3. és 4. csoportba tartozó petesejtek tehát meglehetősen korán, már az érés 42. órájára átesnek az aktivációhoz szükséges citoplazmatikus változásokon.

Az *in vitro* fertilizációt követően nem volt különbség a négy morfológiai csoport között az összes termékenyült petesejt arányát tekintve (70,0–89,8%). A monospermikus termékenyülés arányát tekintve azonban az 1. típusba tartozó petesejtek ($44,1 \pm 4,1\%$) felülmúlták a 3. és a 4. típusba tartozó petesejteket ($21,2 \pm 4,4\%$ illetve $9,6 \pm 3,9\%$) de nem különböztek statisztikailag a 2. típusba tartozó petesejttől ($31,3 \pm 7,2\%$).

KÖVETKEZTETÉS

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy kumulusszal borított sertés petesejtek maturáltatása során azok a petesejtek, melyek a kumuluszállománya a tenyésztőedény aljához csatlakozik, hamarabb átesnek a sejtmagi (meiotikus) érésen, mint azok a petesejtek, melyek expandált kumulusszal borítva szabadon lebegnek a médiumban. A korábban befejezett sejtmagi érés egyrészt az aktivációhoz szükséges citoplazmatikus változásokat de a petesejtek időszédésével járó káros folyamatokat is korábbra hozza. Ez a letapadó petesejtek esetében a polispermia fokozott előfordulásában nyilvánul meg.

További kísérletek szükségesek a letapadó petesejtek optimális maturációs időtartamának meghatározásához, és ezen petesejtek fejlődési potenciáljának bizonyítására.

IRODALOM

- Downs, S.M.(2001): A gap-junction-mediated signal, rather than an external paracrine factor, predominates during meiotic induction in isolated mouse oocytes. *Zygote*, 9. 71–82.
- Eppig, J.J. – Downs, S.M.(1984): Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Bioi. Reprod.*, 30. 1–11.
- Guoliang, X. – Byskov, A.G. – Andersen, C.Y.(1994): Cumulus cells secreté a meiosis-inducing substance by stimulation with forskolin and cyclic adenosine monophosphate. *Mol. Reprod. Dev.* 39. 17–24.
- Isobe, N. – Fujihara, M. – Terada, T.(1996): Cumulus cells suppress meiotic progression in pig oocytes cultured *in vitro*. *Theriogenology*, 45. 1479–1489.
- Kikuchi, K. – Nagai, T. – Ikeda, H. – Noguchi, J. – Shimada, A. – Soloy, E. – Kaneko, H.(1998): Cryopreservation and ensuring *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology*, 50. 615–623.
- Kikuchi, K. – Onishi, A. – Kashiwazaki, N. – Iwamoto, M. – Noguchi, J. – Kaneko, H. – Akita, T. – Nagai, T.(2002): Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Bioi. Reprod.*, 66. 1033–1041.
- Nagai, T.(1994): Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. *Theriogenology*, 41. 73–78.
- Nagai, T.(2001): The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, 55. 1291–1301.
- Petters, R.M. – Wells, K.D.(1993): Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 48. 61–73.
- Suzuki, K. – Asano, A. – Eriksson, B. – Niwa, K. – Nagai, T. – Rodriguez-Martinez, H.(2002): Capacitation status and *in vitro* fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Int. J. Androl.*, 25. 84–93.

Xia, G.L. – Kikuchi, K. – Noguchi, J. – Izaike, Y.(2000): Short time priming of pig cumulus-oocyte complexes with FSH and forskolin in the presence of hypoxanthine stimulates cumulus cells to secrete a meiosis-activating substance. *Theriogenology*, 53. 1807–1815.

Érkezett: 2005. január

Szerzők címe: Somfai, T. – Dinnyés, A.: Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,

Authors' address:: Állatbiológiai Intézet

Agricultural Biototechnology Center, Institute for Molecular Genetics
H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi u. 4.

Kikuchi, K.- Onishi, A. – Fuchimoto, D.: Developmental Biology and
Genetic Diversity Departments, National Institute of Agrobiological Sciences
Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

Sato, E.: Animal Reproduction Unit, Graduate School of Agricultural Science,
Tohoku University, Sendai 981-8555, Japan

Iwamoto, M.: Prime Tech Ltd.

Tsuchiura, Ibaraki 300-0841, Japan

Bali Papp, Á.: Nyugat-Magyarországi Egyetem, Állattenyésztési Intézet

University of West Hungary, Institute for Animal Breeding

H-9200 Mosonmagyaróvár, Vár u. 4.

Nagai, T.: Department of Research Planning and Coordination,

National Institute of Livestock and Grassland Science,

Tsukuba, Ibaraki, 305-0901, Japan

MOLEKULÁRIS GENETIKAI MARKER SZELEKCIÓ (MAS) A SERTÉS SZAPORASÁGÁNAK NÖVELESÉRE

HOROGH GERGELY — ZSOLNAI ATTILA — KOMLÓSI ISTVÁN — FÉSÜS LÁSZLÓ

ÖSSZEFOGLALÁS

A kísérlet során 226 magyar nagyfehér koca összesen 869 fialási adatát elemezték annak megismerése céljából, hogy az ösztrogén receptor gén (ESR) polimorfizmus felhasználható-e az alomméret növelését célzó marker szelekcióra. A munka során a kocák első, második és későbbi fialásainak adatait értékelték. Az ESR genotípusok alapján számított allélfrekvencia értékek a vizsgált 226 egyedre vonatkozóan a következők: az A allél gyakorisága 0,55, a B allél gyakorisága 0,45. A genotípusok megoszlása: AA: 71 (69,14), AB: 108 (111,73) és BB: 47 (45,14) (zárójelben a várt értékek láthatók). A végső eredmények ismeretében kijelenthető, hogy a BB genotípusú kocák mind az összes született, az élve született, mind pedig a korrigált választáskori malacszámok vonatkozásában szignifikánsan jobbnak bizonyultak a másik két genotípusba tartozó társaiknál.

SUMMARY

Horogh, G. – Zsolnai, A. – Komlósi, I. – Fésüs, L.: MARKER ASSISTED SELECTION (MAS) TO IMPROVE THE REPRODUCTION OF PIG

In the experiment, 869 litter records of 226 Hungarian Large White sows have been analyzed to investigate the possible use of the estrogen receptor gene (ESR) as a marker to improve litter size. First, second and later parities have been evaluated separately. $A=0.55$ and $B=0.45$ frequencies have been calculated for the two ESR alleles, and the observed / expected number of the three genotypes were as it follows AA: 71/69.14, AB: 108/111.73 and BB: 47/45.14. BB type first and later parity sows were superior to AB and AA sows for number born alive (NBA), total number of born (TNB) and the corrected number of weaned piglets (CNW), respectively.

BEVEZETÉS

A molekuláris genetika fejlődésének és a genomkutatás jelentős fokozódásának köszönhetően számos új felfedezés, áttörő eredmény született, mind a humán, mind az állattenyésztési genetika, biotechnológia területén. Több gazdasági állatfaj, köztük a sertés géntérképezésében komoly előrelépés valósult meg az utóbbi időben. Gazdasági szempontból fontos tulajdonságokkal összefüggésben álló kromoszóma területeket és számos gént azonosítottak QTL vizsgálatokkal, valamint jelölt gén analízissel. Sertés fajban gazdasági szempontból az egyik legfontosabb, így a vizsgálatok középpontjában lévő tulajdonság, a szaporaság.

A reprodukciót befolyásoló tulajdonságok genetikai hátterének ismerete nélkülözhetetlen, mivel a hagyományos szelekciós módszerekhez képest, a markerek segítségével végzett szelekcióval (MAS) gyorsabb és eredményesebb előrehaladást érhetünk el (Brem, 1996).

A kvantitatív tulajdonságok genetikai szabályozásának felderítéséhez megfelelő módszer a jelölt gén analízis, mely során olyan géneket vizsgálnak, melyeknek termékei (pl. hormonok) részt vesznek az adott mennyiségi tulajdonság megjelenéséhez szükséges élettani folyamatok vezérlésében. Számos jelölt gén vizsgálata és értékelése folyik, úgymint az epidermisz növekedési faktor (EGF), prosztaglandin-endoperoxid szintáz 2 (PTGS2), retinol sav receptor gamma (RARG), melatonin receptor 1A (MTNRIA) és folliculus stimuláló hormon béta (FSHB), mely géneknek különböző hatásait írták le. A legjelentősebb gének azonban az ösztrogén receptor (ESR) (Rothschild és mtsai, 1996), a prolaktin receptor (PRLR) (Vincent és mtsai, 1998), valamint a retinol kötő fehérje 4 (RBP 4) (Rothschild és mtsai, 2000) gének, melyek bizonyos fajtákban pozitív hatással vannak az alomnagyságra.

Az ösztrogén receptor gén (ESR) magyar nagyfehér állományokban történő vizsgálatának megkezdését Rothschild és mtsai (1996), valamint Short és mtsai (1997) meishan, illetve nagyfehér fajtákban kimutatott pozitív eredményei ösztönözték.

Rothschild és mtsai (1996) az ESR gén alléljait direkt géntesztel azonosították, majd 50% meishan genetikai hátterű szintetikus kocaállományban, a három eltérő genotípus (AA, AB, BB) alomnagyságra gyakorolt hatását vizsgálták. Mind az első, mind a későbbi fialásokkor az összes született és az élve született malacszámok vonatkozásában a BB genotípusú kocák szignifikánsan jobb eredményeket mutattak, mint a másik két genotípus kocái. Az ESR lokusz polimorfizmusát nagyfehér állományokban is kimutatták. A BB homozigóták előnye itt is megmutatkozott.

Short és mtsai (1997) kísérletének célja az volt, hogy az ESR lokusz tényleges hatását értékeljék. Négy nagyfehér alapú kereskedelmi sertés vonalból 4200 első és több mint 4700 későbbi fialási adatot elemezve megállapították, hogy a BB homozigóták előnye az AA kocákhoz képest 0,8 malac/alom az első és megközelítőleg 0,7 malac/alom a későbbi fialások alkalmával.

Más szerzők azonban ellentétes eredményekről számoltak be. Korwin-Kossakowska és mtsai (1999) és Kmiec és mtsai (2002) vizsgálataik során az AA kocák fölényét tapasztalták (lengyel nagyfehér, valamint lengyel lapály állományokban), bár a kapott eredmény nem volt statisztikailag igazolható. Van Rens és mtsai (2002 a) nagyfehér x meishan F₂ állományban az A alléit találták

kedvezőbbnek a szaporasági tulajdonságok vonatkozásában. Kísérletükben az AB kocák a fialt malacszám eredményekben szignifikánsan meghaladták a BB kocák teljesítményét.

Bizonyos szerzők, pedig semmilyen összefüggést nem találtak az ESR polimorfizmus, valamint az alomméreték között (*Legault és mtsai, 1996; Drögemüller és mtsai, 1999, 2001; Depuydt és mtsai, 1999; Isler és mtsai, 1999ab; Linville és mtsai, 2000; Gibson és mtsai, 2002*).

A kísérletünk célja volt meghatározni, hogy a magyar nagyfehér kocaállományokban az ESR gén polimorfizmusa hatással van-e az alomméretre. Továbbá a vizsgált egyedek genotípusának és fialásonkénti alomnagyságának ismeretében megbecsülni a gén, mint alomméretet befolyásoló fontos QTL értékét.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A munka során 226 magyar nagyfehér koca vérmintájának vizsgálatát végeztük el, melyhez összesen 869 fialási adat tartozott, ezeket alapul véve következtettünk az ösztrogén receptor gén polimorfizmusának hatására a magyar fajtában (1. táblázat).

1. táblázat

Az értékelt fialások száma a három ESR genotípusban (n)

Genotípus(1)	Fialások(2)			Összesen(4)
	1.	2.	3. és későbbi(3)	
AA	68	49	140	257
AB	101	89	219	409
BB	45	40	118	203

Table 1.: Number of litters by ESR genotype and parity genotype(1), parity(2), third and more(3), total(4)

A statisztikai elemzéseket a SAS program (SAS, 1992) MIXED modellel végeztük (*Horogh és mtsai, 2005*).

Az összes született malacszám értékeket az élve és halva született malacszámok összegéből számítottuk, míg a korrigált választáskori malacszámok képlete a következő volt: 21. napos malacszámok – kapott + adott malacok száma.

A vérminták tárolása, a DNS kivonásáig, -20 °C-on történt, az ESR genotípusokat pedig PCR-RFLP módszerrel határoztuk meg.

A láncreakcióban felhasznált primerek *Short és mtsai* (1996) által leírt szekvencia alapján készültek. A felhasznált primerek a következők voltak:

1. primer : ESR SF 5'-CCTGTTTTTACAGTACTTTTTACAGAG-3'

2. primer : ESR SR 5'-CACTTCGAGGGTTCAGTCCAATTAG-3'

A PCR reakcióra a következő körülmények között került sor (Perkin Elmer DNA thermal cycler): 1 ciklus: 94 °C 4 perc, 55 °C 1 perc, 70 °C 1 perc; 31 ciklus: 94 °C 1 perc, 55 °C 1 perc, 70 °C 1 perc; és az utolsó ciklus: 70 °C 8 perc.

Az amplifikációt követően a terméket 5 U PvuII restriktions endonukleázzal történő éjszakai emésztésnek vetettük alá 37 °C -on. Az elektroforézist 2x8 perc időtartam alatt 5, illetve 10 V/cm térerősségen végeztük, horizontális Power Pac 1000 készülék segítségével, egyfázisú puffer rendszert (1xTBE) tartalmazó Maxi H 3000 plexikádákban. Az etidium-bromiddal festett gélen a DNS-sávok kiértékelését UV lámpa segítségével, átvilágítással végeztük (Horogh és mtsai, 2004).

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

A magyar nagyfehér fajtára a genotípusok alapján számított allélfrekvencia értékek a vizsgált 226 egyedre vonatkozóan a következő: az A alléli gyakorisága 0,55, a B alléli gyakorisága pedig 0,45. Az ESR genotípus értékeket és ezek százalékos megoszlását a teljes vizsgálati állományra a 2. táblázat szemlélteti. Zárójelben a várt genotípus értékek láthatók, melyeket a Hardy-Weinberg szabálynak megfelelően számítottuk ki.

2. táblázat

Az ESR genotípusok megoszlása

Fajta(1)	n	AA	AB	BB	χ^2
Magyar nagyfehér(2)	226 100%	71 (69,14) 31,4%	108 (111,73) 47,8%	47 (45,14) 20,8%	0,25

Zárójelben a várt értékek láthatók, df=2, P=0,5(3)

Table 2.: Distribution of ESR genotypes breed(1), Hungarian Large White(2), the expected values are presented in brackets, df=2, P=0.5(3)

A várt és tényleges értékek közötti eltéréseket, a χ^2 próba alapján elemeztük, melynek eredményét szintén a 2. táblázat tartalmazza. Szignifikáns eltérést a várt és számított értékek között nem találtunk, tehát a genetikai egyensúly fennáll.

Az átlagos élve született malacszámokat szemlélteti a 3. táblázat. Az első fialásokat vizsgálva megállapítható, hogy az AA és AB genotípusú kocák között statisztikailag alátámasztható különbség nincs, ellenben a BB homozigóta kocák mind a heterozigótáktól, mind az AA homozigóta kocáktól szignifikánsan különböznek.

3. táblázat

Átlagos élve született malacszámok a három ESR genotípusban

Genotípus(1)	Fialások(2)			Összesen(4)
	1.	2.	3. és későbbi(3)	
AA	9,34±0,95 ^a	9,40±0,97 ^a	10,49±0,93 ^a	9,74±0,92 ^a
AB	9,83±0,92 ^a	10,36±0,95 ^b	10,50±0,93 ^a	10,23±0,91 ^b
BB	10,32±0,98 ^b	10,04±1,00 ^{ab}	11,37±0,95 ^b	10,58±0,94 ^b

^{ab} means with different letter are differ at P<0.05 within a column(5)

Table 3.: Least squares means and standard error for number born alive piglets by ESR genotype and parity genotype(1), parity(2), third and more(3), total(4), ^{ab} means with different letter are differ at P<0.05 within a column(5)

A második fialások esetén az AB heterozigóták mutatták szignifikánsan a legmagasabb értékeket. A BB homozigóták a nagy standard hiba miatt statisztikailag nem különböztek az AA kocáktól; míg a harmadik és későbbi fialások esetén újból a BB kocák teljesítménye volt a legmagasabb. Ha pedig az összes fialás átlagát elemezzük, kitűnik az ESR B allél hordozóinak fölénye az élve született malacszámok tekintetében.

Az összes született malacszámokat tekintve (4. táblázat), az első fialások során a két homozigóta genotípus mutatott szignifikáns eltérést. A második, valamint harmadik és későbbi fialásokat értékelve az élve született malacszámok esetén megfigyelhető tendencia jelentkezett. Az összes fialást együttesen vizsgálva, a BB homozigóta kocák szignifikáns fölénye mutatkozik mindkét másik genotípushoz viszonyítva. Az átlagosan halva született malacszámok 0,62, 0,23 és 0,78 volt az AA, AB és BB genotípusban, ami az AB kocák esetében a magzati élet során fellépő heterózis hatásra enged következtetni.

4. táblázat

Átlagos összes született (élő+holt) malacszámok a három ESR genotípusban

Genotípus(1)	Fialások(2)			Összesen(4)
	1.	2.	3. és későbbi(3)	
AA	9,90±0,96 ^a	9,88±0,98 ^a	11,08±0,93 ^a	10,36±0,92 ^a
AB	10,28±0,93 ^{ab}	10,90±0,96 ^b	11,05±0,94 ^a	10,46±0,94 ^a
BB	10,88±0,99 ^b	10,59±1,01 ^{ab}	11,96±0,96 ^b	11,36±0,93 ^b

^{ab} means with different letter are differ at P<0.05 within a column(5)

Table 4.: Least squares means and standard error for total number born piglets by ESR genotype and parity as in Table 3.(1–5)

Az első fialások esetén a BB és AA kocák teljesítménye közötti különbség 0,98 malac/alom mind az összes, mind az élve született malacszámok vonatkozásában (P<0,05). A későbbi fialások alkalmával a BB homozigóta kocák több mint 1 malac/alom összes született és 0,84 malac/alom élve született malacszámmal múltak felül AA genotípusú társaikat (4. és 5. táblázat).

5. táblázat

Átlagos korrigált választási malacszámok a három ESR genotípusban

Genotípus(1)	Fialások(2)			Összesen(4)
	1.	2.	3. és későbbi(3)	
AA	9,07±0,95 ^a	9,50±0,98	10,35±0,94	9,54±0,92 ^a
AB	9,51±0,92 ^{ab}	10,29±0,96	10,32±0,94	9,92±0,94 ^a
BB	10,04±0,99 ^b	10,05±1,00	10,79±0,96	10,48±0,93 ^b

^{ab} means with different letter are differ at P<0.05 within a column(5)

Table 5.: Least squares means and standard error for corrected number of weaned piglets by ESR genotype and parity as in Table 3.(1–5)

A felnevelt malacok száma és testsúlya, valamint a malacok kiegyenlített fejlettsége alapján következtethetünk a koca malacnevelő-képességére. E

komplex tulajdonság összetevői közül, jelen kísérletben a felnevelt (21 napos) malacszámot vizsgáltuk.

A 21. napos (korrigált választási) malacszám a BB genotípusú kocák esetében átlagosan 10,48 malac/alom, míg az AB genotípusú kocák esetében már csak 9,92 malac/alom. Az AA genotípusú állatok esetében további csökkenés figyelhető meg, hiszen az átlagos malacszám 9,54 malac/alom. Szignifikáns különbség BB és AB genotípusú kocák között átlagosan 0,56 malac/alom, míg BB és AA genotípusú kocák között átlagosan 0,94 malac/alom ($P < 0,05$).

KÖVETKEZTETÉSEK

Az ESR-ről alkotott korai véleményyt, mely szerint az ESR nagyhatású gén (*Rothschild*, 1994, 1995), a témával foglalkozó szerzők egyértelműen elutasították (*Legault és mtsai*, 1996; *Korwin-Kossakowska és mtsai*, 1999; *Drögemüller és mtsai*, 1999; *Depuydt és mtsai*, 1999; *Linville és mtsai*, 2000; *Van Rens és mtsai*, 2000, 2002). Azonban a magyar nagyfehér fajtában mégis sikerült a kapott pozitív eredményeket (*Rothschild és mtsai*, 1996; és *Short és mtsai*, 1997) rekonstruálni, mely szerint az ESR BB genotípusú kocák szignifikánsan több malacot fialnak, és több malacot választanak, mint az AA, vagy AB genotípusú társaik.

A bemutatott eredmények az összes koca teljesítményének átlagát mutatják, tehát a származási helyeket figyelmen kívül hagyva tájékoztatnak minket egy átlagos eredményről. Az eredmények és tendenciák azonban nem feltétlenül egyeznek meg minden állományban, ami arra utal, hogy az ESR polimorfizmus egy, az alomméretet befolyásoló *marker*, míg a tényleges hatás egy másik mutációnak köszönhető talán magában az ESR génben, vagy pedig egy közeli kapcsolt génben. Ebből következik, hogy a polimorfizmus hatása függhet a fajtától, sőt a fajtán belüli vonalak között is eltérések lehetnek a genetikai háttértől függően.

Arra a kérdésre, hogy az esetlegesen megfigyelt ESR gén polimorfizmus, illetve alomméret különbségek a meishan fajtán kívül miért csupán nagyfehér sertésekben és nagyfehér háttérű vonalakban jelentkezett, *Rothschild* (1996) a fajta származásával adta meg a magyarázatot. Az 1800-as éveket megelőzően ugyanis kínai sertésfajtákat importáltak Angliába, melyek később részt vettek a nagyfehér fajta kialakításában.

A magyar nagyfehér hússertésfajta kialakítására irányuló tényleges tenyésztői tevékenység 1960-tól számítható. Ekkor kezdődött meg a fehér hússertés addig főként középnagy (middle white) jellegű állományának újabb importok révén való átalakítása. Az importált állomány származása alapján az angol és svéd nagyfehér (60%, illetve 20%) aránya meghatározó volt a fajta értékmerőinek javulásában, és a jelenlegi teljesítmény elérésében (*Baltay*, 1983).

Véleményünk szerint eredményeink, valamint *Rothschild és mtsai* (1996), továbbá az idézett szerzők eredményei közötti nagyfokú hasonlóság az angol nagyfehér fajta nagymértékű magyarországi jelenlétének köszönhető. Ez a feltételezés a különböző országok nagyfehér populációi genetikai szerkezeté-

nek összehasonlító analizisével (Maudet és mtsai, 2002) lenne igazolható (Horogh és mtsai, 2005).

Mivel e tulajdonság genetikai hátterét még nem ismerjük pontosan, nagyon fontos, hogy az ESR génre történő szelekció előtt, minden egyes genetikai vonalban legyen megállapítva a polimorfizmus tényleges hatása (Van Rens és mtsai, 2002b), a témában pedig további vizsgálatok szükségesek a pontos megismerés céljából.

A magyar nagyfehér állományokban kimutatott eredményeket tekintve azonban kijelenthető, hogy a BB genotípusú állatok teljesítményében mutatkozó főlény szignifikáns, és a polimorfizmus egyes vonalakban megnyilvánuló hatását pontosan megállapítva, az ESR gén marker szelekcióval hatékonyan használható az alomméret növelésére.

IRODALOM

- Baltay, M.(1983): Magyarországi sertésfajták és hibridek. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
- Brem, G.(1996): A molekuláris diagnosztika és a genomvizsgálás alkalmazásának lehetőségei az állattenyésztésben. Állattenyésztés és Takarmányozás, 45. 433–445.
- Depuydt, J. – De Smet, S.T. – Grijspeerdt, K. – Herman, L.(1999): Association study of an Aval and PvuII polymorphism at the porcine estrogen receptor (ESR) gene, with litter size. Arch. Tierz., 42. 172–174.
- Drögemüller, C. – Hamann, H. – Distl, O.(2001): Candidate gene markers for litter size in different German pig lines. J. Anim. Sci., 79. 2565–2570.
- Drögemüller, C. – Hamann, H. – Thieven, U. – Krieter, J. – Distl, O. – Harizius, B.(1999): Influence of the genome region surrounding the estrogen receptor (ESR) gene on litter size in a German Landrace population. Arch. Tierz., 42. 175–177.
- Gibson, J.P. – Jiang, Z.H. – Robinson, J.A.B. – Archibald, A.L. – Haley, C.S.(2002): No detectable association of the ESR PvuII mutation with sow productivity in a Meishan × Large White F₂ population. Anim. Gen., 33. 448–450.
- Horogh, G. – Zsolnai, A. – Komlósi, I. – Nyíri, A. – Anton, I. – Fésűs, L.(2005): Oestrogen receptor genotypes and litter size in Hungarian Large White pigs. J. Anim. Breed. Genet., 122. 56–61.
- Isler, B.J. – Irvin, K.M. – Neal, S.M. – Moeller, S.J. – Davis, M.E. – Meeker, D.L.(1999a): Examination of the relationship between the estrogen receptor gene and reproductive tract components in swine. Research and Reviews published by The Ohio State University Dept. of Anim. Sci., 54–59.
- Isler, B.J. – Irvin, K.M. – Neal, S.M. – Moeller, S.J. – Davis, M.E. – Meeker, D.L.(1999b): The effect of the estrogen receptor gene on litter traits in swine. Research and Reviews published by The Ohio State Univ. Dept. Anim. Sci., 50–53.
- Kmiec, M. – Dvorak, J. – Vrtková, I.(2002): Study on a relation between estrogen receptor (ESR) gene polymorphism and some pig reproduction performance characters in Polish Landrace breed. Czech. J. Anim. Sci., 47. 5. 189–193.
- Korwin-Kossakowska, A. – Kuryl, J. – Pierzchala, M.(1999): An analysis of relations between the polymorphism of estrogen receptor gene and some reproduction traits in Zlotnicka Spotted x Polish Large White pigs. Anim. Sci. Papers and Reports, 4. 155–161.
- Legault, C. – Gruand, J. – Lebost, J. – Garreau, H. – Ollivier, L. – Messer, Lori A. – Rothschild, M.F. (1996): Frequency and effect on prolificacy of the ESR gene in two French Large White lines. J. Rech. Porc. France, 28. 9–14.
- Linville, R.C. – Pomp, D. – Johnson, R.K. – Rothschild, M.F.(2000): Candidate gene for loci affecting litter size and ovulation rate in swine. J. Anim. Sci., 79. 60–67.
- Maudet, C. – Miller, C. – Bassano, B. – Breitenmoser-Würsten, C. – Gauthier, D. – Obexer-ruff, G. – Michallet, J. – Taberlet, P. – Luikart, G.(2002): Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex *Capra ibex* (ibex). Molec. Ecology, 11. 421–436.
- Rothschild, M.F. – Jacobson, C. – Vaske, D. – Tuggle, C. – Short, T. – Sasaki, S. – Eckardt, G. – McLaren, D.(1994): A major gene for litter size in pigs. Proc. 5th Wld Congr. Gen. Appl. Livest. Prod., 21. 225–228.

- Rothschild, M.F. – Jacobson, C. – Vaske, D. – Tuggle, C. – Wang, L. – Short, T. – Eckardt, G. – Sasaki, S. – Vincent, A. – McLaren, D. – Southwood, O. – Van Der Steen, H. – Mileham, A. – Plastow, G.(1996): The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 93. 201–205.
- Rothschild, M.F. – Messer, L. – Day, A. – Wales, R. – Short, T. – Southwood, O. – Plastow, G.(2000): Investigation of the retinal-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs. Mamm. Genom., 11. 75–77.
- Rothschild, M.F. – Vaske, D. – Tuggle, C. – Messer, L. – McLaren, D. – Short, T.(1995): Estrogen receptor locus is a major gene for litter size in pig. Proc. 46th Ann. Meet. EAAP, G5.2. 53.
- SAS(1992): SAS/STAT User's Guide Release 8.2 SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Short, T.H. – Rothschild, M.F. – Southwood, O.I. – McLaren, D.G. – De Vries, A. – Van Der Steen, H. – Eckardt, G.R. – Tuggle, C.K. – Helm, J. – Vaske, D.A. – Mileham, A.J. – Plastow, G.S.(1997): Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. J. Anim. Sci., 75. 3138–3142.
- Van Rens, B. T.T.M. – De Groot, P.N. – Van Der Lende, T.(2002a): The effect of estrogen receptor genotype on litter size and placental traits at term in F₂ crossbred gilts. Theriogenology, 57. 1635–1649.
- Van Rens, B. T.T.M. – Hazeleger, W. – Van Der Lende, T.(2000): Periovulatory hormone profiles and components of litter size in gilts with different estrogen receptor (ESR) genotypes. Theriogenology, 53. 1375–1387.
- Van Rens, B. T.T.M. – Van Der Lende, T.(2002b): Piglet and placental traits at term in relation to the estrogen receptor genotype in gilts. Theriogenology, 57. 1651–1667.
- Vincent, A. – Evans, G. – Short, T. – Southwood, O. – Plastow, G. – Tuggle, C. – Rothschild, M.F. (1998): The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs. Proc. 6th Wld Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Armidale, Australia, 15–18.

Érkezett: 2005. január
Szerzők címe: Horogh, G. – Zsolnai, A. – Fésüs, L.: Állattenyésztési és Takarmányozási
Authors' address: Kutatóintézet
Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.
Komiósi, I.: Debreceni Egyetem, Agrártudományi Centrum
Debrecen University, Centre for Agricultural Sciences
H-4032 Debrecen, Böszörményi út 138.

GÉNEXPRESSZIÓS KÜLÖNBSEGEK KIMUTATÁSA KINETIKUS PCR-REL KORAI EGÉREMBRIÓK EGYEDI BLASZTOMER SEJTJEIBEN*

BAJI GÁL ÁRPÁD — BODÓ SZILÁRD — BOONKUSOL DUANGJAI —
GÖRHÖNY BOTOND — BALOGH EMESE — DINNYÉS ANDRÁS

A tanulmány célja egy érzékeny módszer kifejlesztése volt génexpressziós különbségek kimutatására embriók egyedi blasztomerjeiből. A vizsgálatra két ICM-specifikus gént (Oct-4, Nanog), egy trophectoderma specifikus gént (Glut-3) és referenciának egy „háztartási gént” (β -aktin) választottak. A 4 és 8 sejtjes embriókat a hCG oltás után 58 és 66 órával mosták ki a petevezetőkől, majd eltávolították a zona pellucida-t, és mechanikusan szétválasztották a blasztomer sejtjeiket egymástól. Az mRNS-t izolálás után azonnal átírták hagyományos reverz transzkripció reakcióban. Az így készült cDNS-ből végeztek kinetikus PCR méréseket. A 4 sejtjes embriók blasztomerjeiben az Oct-4 expressziójában 10-szeres, a Nanog expressziójában 9-szeres különbségek voltak mérhetőek. A 8 sejtjes embriók sejtjeiben kisebb Oct-4 expressziós különbségeket kaptak (2–8-szoros), a Nanog expressziója 28-szoros, a Glut-3 expressziója 12-szeres különbségeket mutatott. Eredményeinkből megállapítható, hogy a vizsgálatokban kifejlesztett módszer pontos és érzékeny, így alkalmas egyedi embrionális sejtek génexpressziójának mennyiségi mérésére. Jelentős egyedi különbségek voltak kimutathatók az embriók blasztomerjei között az Oct-4 és Nanog expressziójában.

SUMMARY

Baji Gál, Á. – Bodó, Sz. – Boonkusol, D. – Görhöny, B. – Balogh, E. Ms. – Dinnyés, A.: DIFFERENT GENE EXPRESSION OF INDIVIDUAL BLASTOMERES IN EARLY MOUSE EMBRYO DETECTED BY REAL TIME PCR1,2

The objective of this study was to determine gene expression differences among blastomeres from 4- and 8-cell stage mouse embryos by a sensitive method. In earlier studies gene expression was determined in pooled or single embryos. With the higher levels of precision afforded by the method there could be quantify mRNA in single cells of embryos. For comparison of gene expression, different ICM specific (Oct-4, Nanog), TE specific (Glut-3) genes and the house keeping β -actin gene (for reference) were chosen. Late 4- and early 8-cell stage embryos were flushed from oviducts 58 and 66 hr post-hCG, respectively. The embryos were collected in CZB-Hepes and the zona pellucida was dissolved by use of acid Tyrode. Blastomeres were separated mechanically from each other with gentle pipetting with a fire polished ending capillary. Messenger RNA isolation was performed from the frozen blastomeres using the *Dynabeads® mRNA DIRECTTM Micro Kit* following the manufacturer's protocol. The reverse transcription reactions were incubated at 25 °C for 10 min, then at 42 °C for 1 hour followed by 99 °C for 5 min. Real-time PCR was performed in an iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories). The reaction mixture consisted of QuantiTect iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories), 500 nM of each primer, and 1/8 aliquot of the blastomere cDNA. The cDNA template was denatured by heating to 95 °C for 2 min and amplified by 50 cycles of 95 °C for 20 sec, 60 °C for 20 sec, and 72 °C for 20 sec with a single fluorescence measurement at each cycle. When the reaction was finished, melting curves were plotted to confirm product purity. With this procedure there could be measured expression level of four genes in six 4-cell and 8-cell stage embryos. In blastomeres of 4-cell stage embryos there was no detectable Glut-3 expression. Compared to the 1.3–1.5-fold technical error, Oct-4 and Nanog showed 10-fold and 9-fold differences, respectively. In 8-cell stage embryonic cells Oct-4 expression showed slight differences (2–8-fold), Nanog and Glut-3 showed 28-fold and 12-fold differences, respectively. Between the blastomeres of the same embryo, one of the four cells showed notable high expression of Oct-4, and two of the eight cells showed notable high expression of Nanog. In

* A tanulmányt az NKTH BIO-00017/2002, a kétoldalú TÉT együttműködés magyar-osztrák (A 10/02), magyar-brit (GB 52/01), magyar-cseh (CZ 13/2002) és a Bio-Rad Laboratories támogatták

conclusion, the results showed that the method be used is accurate and sensitive to measure expression of different genes in single embryonic cells. It was found that Oct-4 and Nanog mRNA levels has remarkable discrete differences within the blastomeres of a single 4-cell stage embryo. At blastomeres of 8-cell stage embryos expression of Nanog gene showed notable differences between them. These differences might be a very early sign of cell faith determination.

BEVEZETÉS

A megtermékenyítés utáni első néhány sejtosztódás alatt a beágyazódás előtti embrióban nagyfokú génexpressziós változások zajlanak le. A petesejtben tárolt „anyai” RNS-ek és fehérjék lecserélődnek az embrionális genomról átíródó termékekre, és a differenciálódás ez után kezdődik meg (Zernicka-Goetz, 2004). Az egér egyedfejlődésben ez az átmenet korán, már a késői kétsejtes állapotban lezajlik. Az embriók életképességbeli és fejlődési készségbeli minősítését morfológiai vizsgálatok mellett a génexpressziós mintázatok vizsgálatával végzik az általában használt reverz transzkripcióval kombinált polimeráz láncreakció (RT-PCR) módszerével: RNS izolálás után azt cDNS-sé írják át, majd PCR-rel amplifikálják és mérik a képződött termék mennyiségét, mely arányos a kiindulási RNS mennyiségével (Niemann és Wrenzycki, 2000; Lonergan és mtsai, 2003). Ez a módszer nem elég érzékeny, ezért 5–15 egybegyűjtött embriót (Zhang és mtsai, 1994; Gutierrez-Adan és mtsai, 1997; Lighten és mtsai, 1997; Wrenzycki és mtsai, 1998; Edashige és mtsai, 2000), ritkábban egyedi embriókat használnak fel a mérésekhez (Steuerwald és mtsai, 1999). Így csak a csoport átlagos génexpressziós értéke kapható meg, az egyedi különbségeket nem lehet vizsgálni. Jelen munkánkban egy olyan érzékeny módszer kifejlesztésére vállalkoztunk, amely segítségével génexpressziós aktivitásukat tudjuk vizsgálni mRNS szinten egyedi sejtekben, valamint génexpressziós különbségek kimutatására beágyazódás előtti néhány sejtes egér embriók blasztomer sejtjei között. Humán vizsgálatokban már találtak különbségeket egyedi blasztomer sejtekben az Oct-4 expressziójában (Hansis és mtsai, 2001). Jelen tanulmányunkban 4, illetve 8 sejtes stádiumú embriókban vizsgáltuk meg a blasztocisztákban ICM-specifikus gének (Oct-4, Nanog), egy trophectoderma specifikus gén (Glut-3) és referenciaként egy folyamatosan expresszáló kontroll (β -aktin) gén expresszióját.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Blasztomer sejtek kinyerése: Az embriókat szuperovuláltatott, termékenyített 6–8 hetes ICR egerek petevezetőiből mostuk ki a hCG oltás után 58 órával (késői 4 sejtes állapot) és 66 órával (korai 8 sejtes állapot). A zona pellucida-t savas Tyrod médiummal (Sigma) távolítottuk el az embriókról. A blasztomer sejteket tompa végű kapillárisal való finom pipettázással, mechanikusan választottuk el egymástól. Az ép, szétválasztott sejteket egyenként fagyasztottuk 2 μ l desztillált vízben és tároltuk -80 °C-on PCR csövekben a későbbi felhasználásig.

Az mRNS izolálás, reverz transzkripció (RT): Az mRNS izolálást a Dynabeads® mRNA DIRECT Micro Kit-tel végeztük a fagyasztott egyedi blasztomerekből: 10 perces lizis pufferes kezelés után a sejt mRNS molekuláit mágneshoz kapcsolt oligoT szekvenciához kapcsoljuk, majd többszöri átmosás után rövid hőkezeléssel leválasztjuk róluk. A kapott tiszta mRNS oldatot használtuk fel templátként a reverz transzkripció reakcióban: 2 µl 10x puffer oldat, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 2,5 µM random hexamer primer, 20 U RNáz inhi bitor (Fermentas), 50 U M-MLV reverz transzkriptáz enzim (Sigma) és RNáz mentes desztillált víz 20 µl végtérfogatban. A reakcióelegyet 10 percig 25 °C-on (primer feltapadás), 60 percig 42 °C-on (cDNS szintézis), 5 percig 99 °C-on (inaktiválás) inkubáltuk. A sejtekből átírt cDNS-t -20 °C-on tároltuk a későbbi felhasználásig.

Kinetikus PCR: A kvantitatív kinetikus PCR méréseket az iCycler iQ Real-Time PCR Detektáló Készüléken (Bio-Rad Laboratories) végeztük. A reakcióelegy a QuantiTect iQ SYBR Green Supermix-et (Bio-Rad Laboratories), 500-500 nM specifikus primert, és az egy blasztomerekből átírt cDNS 1/8-át tartalmazta. A PCR program elején a cDNS-t 2 percig 95 °C-on denaturáltuk, majd 50 ciklusban sokszoroztuk: 95 °C 20 másodperc, 60 °C 20 másodperc, és 72 °C 20 másodperc. Minden ciklus végén mértük a kétszálú DNS termék fluoreszcens jelét. A reakció végén olvadáspontméréssel ellenőriztük a specifikus termék tisztaságát.

Gének, primerek: Actb: citoplazmatikus β-aktin fehérjét kódoló gén. A fehérje minden eukarióta sejtben megtalálható nagy számban. A sejt alakjának fenntartásában és mozgásképességében játszik szerepet. Általában használják referenciának, mint háztartási gén (Alonso és mtsai, 1986; Kreuzer és mtsai, 1999).

Pou5f1: a POU domén 5 fehérjecsalád 1-es tagja, egy transzkripció faktor, közismert neve Oct-4. Expresszióját korai embriókban, embrionális őssejtekben, az érett petesejtben, és a csírarsejt-vonalban mutatták ki. A blasztociszta állapotú embrióban csak a belső sejtsomóban (ICM) van jelen, azok pluripotenciáját tartja fenn (Palmieri és mtsai, 1994).

Nanog: újonnan felfedezett homeobox transzkripció faktor. Expresszióját korai embrionális embriókban, embrionális őssejtekben, és többféle szövetben kimutatták. A blasztociszta állapotú embrióban csak a belső sejtsomóban (ICM) van jelen, azok pluripotenciáját tartja fenn, valamint gátolja az extraembriionális endodermává differenciálódását (Mitsui és mtsai, 2003).

Slc2a3: plazmamembrán transzportfehérje, mely a glükóz szállítást elősegítő fehérjecsalád 3-as tagja (izoformája), közismert neve Glut-3. Felnőtt egérben főként az agy neuronsejtjeiben található meg, és ez az egyik első embrionálisan kifejeződő glükóz-transzporter fehérje a korai blasztociszta állapotú embrió trophectoderma sejtjeiben (Pantaleon és mtsai, 1997).

A kiválasztott génekre tervezett specifikus primerek jellemzőit az 1. táblázat tartalmazza.

Kiértékelés: A mért értékeket (küszöb ciklusszám) relatív mRNS mennyiségekre a standard görbe módszerrel számítottuk ki. Ennek lényege, hogy meg-

mértük ismert mennyiségű RNS mintából készített hígítási sor küszöb ciklusszám értékeit minden génre, melyből megállapítható volt a két mennyiség közti összefüggés. A mért ciklusszámokból ezzel ki tudtuk számítani az RNS mennyiségeket. Ezeket az értékeket normalizáltuk a mért Actb gén, mint háztartási gén értékeivel: az egyes sejtekben mért különböző gének mRNS mennyiségét elosztottuk az Actb mennyiségével. Ezeket a relatív mRNS mennyiségeket tüntettük fel az ábrákon (Kreuzer és mtsai, 1999).

1. táblázat

A kiválasztott gének és specifikus primerek jellemzői

Gén(1)	NCBI RefSeq	1. primer		2. primer		Fragment méret(4)
		szekvencia(2)	pozíció(3)	szekvencia(2)	pozíció(3)	
β-aktin	X03672	GTGCTGTCCTGT ATGCCTCTGGTC	495	GATGTCACGCACG ATTTCCCTCTCA	692	222 bp
Oct-4	M34381	CCACCATCTGTCG CTTCG	573	CACCAGGGTCTCC GATTTG	709	155 bp
Nanog	XM_132755	TGGTTGAAGACTA GCAATGGT	664	GTCTGGCTGCC CACAT	794	147 bp
Glut-3	AK045328	CTTCTGAGAGCGG CTTCTG	29	CAACAGTCACGGC GAACA	180	168 bp

Table 1.: Selected genes and specific primers
gene(1), sequence(2), position(3), fragment size(4)

EREDMÉNYEK

Az új módszerrel sikerült négy gén expresszióját megmérni 6 darab 4 sejtes embrió (az 1. ábrán A, B, C, D, E, F jelű embriók 1, 2, 3, 4 számú sejtjei) és 6 darab 8 sejtes embrió (a 2. ábrán G, H, I, J, K, L jelű embriók 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 számú sejtjei) egyedi blasztomer sejtjeiben. Abban a 3 (E/1; F/1; F/2), illetve 4 (I/8; J/7; J/8; K/7) mintában, amikből nem tudtuk kimutatni sem a három specifikus gén, sem a referencia gén expresszióját, X jellel különböztettük meg a pozitív mintáktól (1ab., 2abc. ábra). Egy 8 sejtes mintánál két sejtet nem sikerült szétválasztani, ott két sejtből (G/1-2) történtek a mérések.

1a. ábra: Négysejtes embriók blasztomerjeiben mért relatív génexpressziós értékek

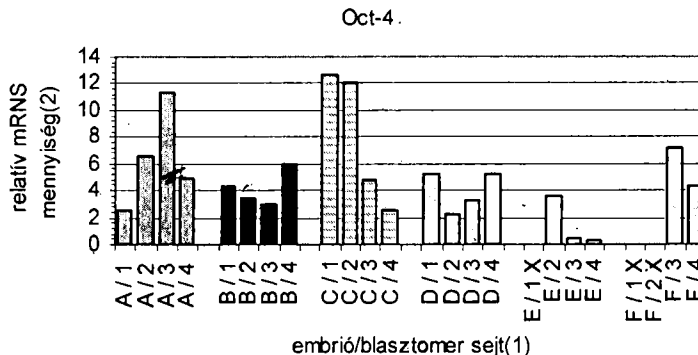


Fig. 1a.: Relative gene expression values of 4-cell stage embryos
embryo/blastomere cell; X: lost mRNA sample(1), relative mRNA amount(2)

A 4 sejtes embriók blasztomerjeiben nem találtunk Glut-3 expressziót, az Oct-4 és a Nanog esetében azonban már ebben a stádiumban is kimutatható volt az mRNS: az Oct-4 expressziójában 10-szeres, a Nanog expressziójában 9-szeres különbségeket mértünk egyazon embrió sejtei között (1. ábra).

1b. ábra: Négysejtes embriók blasztomerjeiben mért relatív génexpressziós értékek

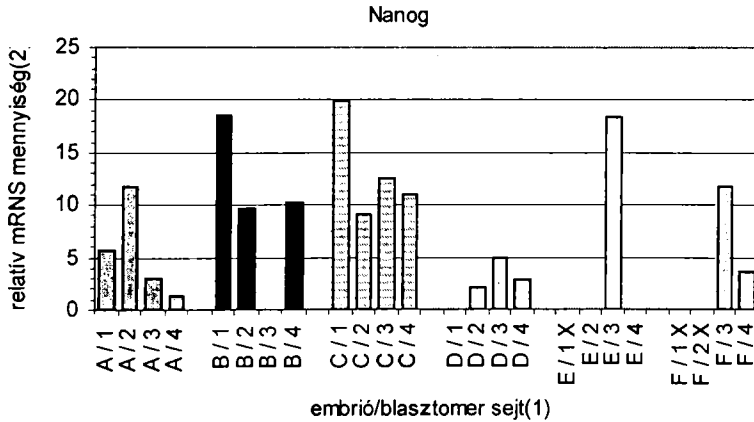


Fig. 1b.: Relative gene expression values of 4-cell stage embryos embryo/blastomere cell; X: lost mRNA sample(1), relative mRNA amount(2)

A 8 sejtes embriók sejteiben kisebb Oct-4 expressziós különbségeket kaptunk (2–8-szoros), a Nanog expressziója 28-szoros, a Glut-3 expressziója 12-szeres különbségeket mutatott (2abc. ábra).

2a. ábra: Nyolcsejtes embriók blasztomer sejteiben mért relatív génexpressziós értékek

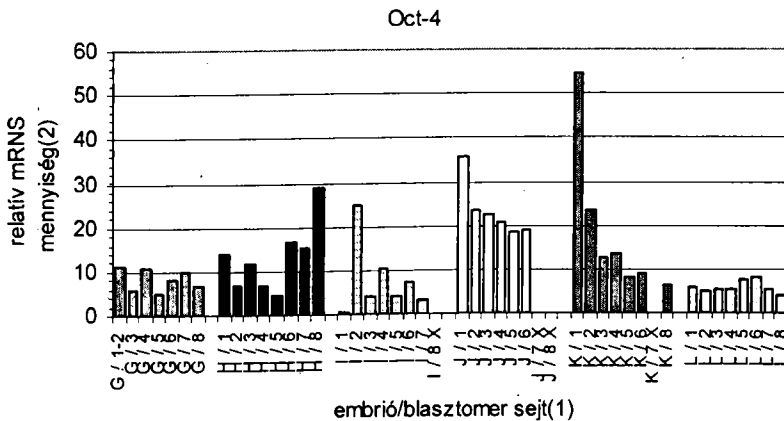


Fig. 2a.: Relative gene expression values of 8-cell stage embryos embryo/blastomere cell; X: lost mRNA sample(1), relative mRNA amount(2)

2b. ábra: Nyolcsejtes embriók blasztomer sejtjeiben mért relatív génexpressziós értékek

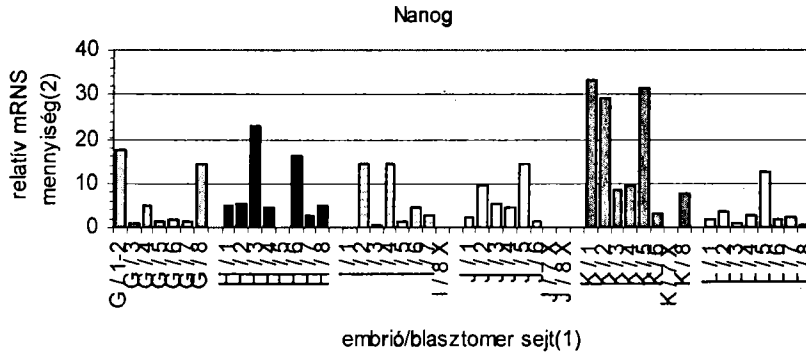


Fig. 2b.: Relative gene expression values of 8-cell stage embryos embryo/blastomere cell; X: lost mRNA sample(1), relative mRNA amount(2)

2c. ábra: Nyolcsejtes embriók blasztomer sejtjeiben mért relatív génexpressziós értékek

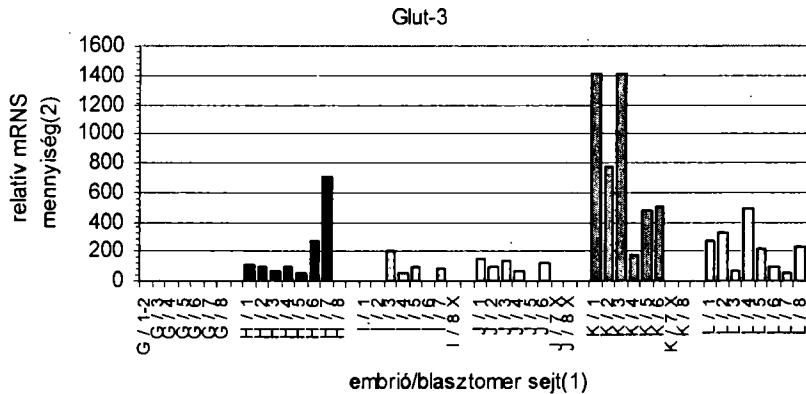


Fig. 2c.: Relative gene expression values of 8-cell stage embryos embryo/blastomere cell; X: lost mRNA sample(1), relative mRNA amount(2)

Egyazon embrió blasztomer sejtjei között egy a négyből kiemelkedően magas Oct-4 expressziót mutatott a 4 sejtes embriókban.

A 8 sejtes embriók nyolc sejtje közül kettőben kiemelkedően magas Nanog expressziót találtunk.

KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeinkből megállapítható, hogy a kifejlesztett módszer precíz, érzékeny, így alkalmas egyedi embrionális sejtek génexpressziójának mérésére. Az mRNS izolálás, és reverz transzkripció kombinálva a kinetikus PCR-rel gyors, viszonylag egyszerűen kivitelezhető módszer, mindamellett megbízható és

reprodukálható mennyiségi meghatározásokat lehet vele végezni. Kísérletünkben a 24 darab 4 sejtes blasztomer közül 21-ből (87,5%), a 47 darab 8 sejtes blasztomer közül 43-ból (91,5%) sikerült az mRNS mennyiségeket meghatározni. Azokban a mintákban, amikből nem tudtuk kimutatni sem a három specifikus gén, sem a referencia gén expresszióját, feltehetően az mRNS lebomlott, vagy elveszett. Az egy sejtben található mRNS mennyisége olyan kevés, hogy más ellenőrző méréssel nem lehet kimutatni. Számos lépés lehet, ahol az mRNS elveszhet, mint például a sejt sérülésekor a szétválasztás és gyűjtés során, valamint az mRNS izolálásakor.

Jelentős egyedi különbségeket tudunk kimutatni 4 sejtes embriók blasztomerjei között az Oct-4 és Nanog expressziójában, valamint a 8 sejtes embriók blasztomerjei között a Nanog expressziójában. Mindkét gén a később kialakuló blasztociszta állapotú (beágyazódás körüli) embrió belső sejtsomójában (ICM) kifejeződő transzkripciós faktor. Amennyiben konzekvensen tapasztalható a későbbiekben ICM specifikus génextpressziós különbség a blasztomer sejtek között, feltehető, hogy ezek a különbségek nagyon korai jelei lehetnek a sejtek egy bizonyos fejlődési irányban való elköteleződésének. Bizonyítása további kutatásokat igényel.

IRODALOM

- Alonso, S. – Minty, A. – Bourlet, Y. – Buckingham, M.(1986): Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates. *J. Mol. Evol.*, 23. 1. 11–22.
- Edashige, K. – Sakamoto, M. – Kasai, M.(2000): Expression of mRNAs of the aquaporin family in mouse oocytes and embryos. *Cryobiology*, 40. 171–175.
- Gutierrez-Adan, A. – Behboodi, E. – Murray, J.D. – Anderson, G.B.(1997): Early transcription of the SRY gene by bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 48. 246–250.
- Hansis, C. – Tang, Y.X. – Grifo, J.A. – Krey, L.C.(2001): Analysis of Oct-4 expression and ploidy in individual human blastomeres. *Mol. Hum. Reprod.*, 7. 2. 155–161.
- Kreuzer, K.A. – Lass, U. – Landt, O. – Nitsche, A. – Laser, J. – Ellerbrok, H. – Pauli, G. – Huhn, D. – Schmidt, C.A.(1999): Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. *Clin. Chem.*, 45. 2. 297–300.
- Lighten, A.D. – Hardy, K. – Winston, R.M. – Moore, G.E.(1997): Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 47. 134–139.
- Lonergan, P. – Rizos, D. – Gutierrez-Adan, A. – Fair, T. – Boland, M.P.(2003): Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim.*, 38. 259–267.
- Mitsui, K. – Tokuzawa, Y. – Itoh, H. – Segawa, K. – Murakami, M. – Takahashi, K. – Maruyama, M. – Maeda, M. – Yamanaka, S.(2003): The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.*, 113. 5. 631–642.
- Niemann, H. – Wrenzycki, C.(2000): Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*, 53. 21–34.
- Palmieri, S.L. – Peter, W. – Hess, H. – Scholer, H.R.(1994): Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.*, 166. 1. 259–267.
- Pantaleon, M. – Harvey, M.B. – Pascoe, W.S. – James, D.E. – Kaye, P.L.(1997): Glucose transporter GLUT3: ontogeny, targeting, and role in the mouse blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94. 8. 3795–3800.

- Steuerwald, N. – Cohen, J. – Herrera, R.J. – Brenner, C.A.(1999): Analysis of gene expression in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Mol. Hum. Reprod.*, 5. 1034–1039.
- Wrenzycki, C. – Hermann, D. – Carnwath, J.W. – Niemann, H.(1998): Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. *J. Reprod. Fertil.*, 112. 387–398.
- Zernicka-Goetz, M.(2004): First cell fate decisions and spatial patterning in the early mouse embryo. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 15. 5. 563–572.
- Zhang, X. – Kidder, G.M. – Zhang, C. – Khamsi, F. – Armstrong, D.T.(1994): Expression of plasminogen activator genes and enzymatic activities in rat preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 101. 235–240.

Érkezett: 2005. január

Szerzők címe: Baji Gál, Á. – Bodó, Sz. – Görhöny, B. – Balogh, E. – Dinnyés, A.:

Authors' address: Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Állatbiológiai Intézet
Agricultural Biotechnology Center, Institute of Animal Biology
H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.

Boonkusol, D.: Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University
Bangkok, Thailand

KAKASSPERMIUMOK ÉLETKÉPESSÉGÉNEK ÉS TERMÉKENYÍTŐ-KÉPESSÉGÉNEK ALAKULÁSA A MÉLYHŰTÉSI PROTOKOLL SORÁN

VARGA ÁKOS — VÉGI BARBARA — SZŐKE ZSUZSA — LIPTÓI KRISZTINA —
VÁRKONYI ESZTER — LENNERT LÁSZLÓNÉ — BARNA JUDIT

ÖSSZEFOGLALÁS

A kísérletek során első ízben vizsgálták parlagi magyar kakasok spermiumainak mélyhűthetőségét. A mélyhűtést és a tartósítást *Lake és Stewart* (1978) által leírt lassú, programozott, glicerinnel történő fagyasztási módszer módosított változatával végezték. A spermiumok életképességét az élő/holt sejtarány, valamint a morfológiai rendellenességek arányának meghatározásával (anilin-eozinfestés) vizsgálták a mélyhűtési eljárás egyes szakaszaiban. A kísérlet során két-három napos időközökkel tizenegy termékenyítést hajtottak végre, mélyhűtött sperma esetében 110–500 millió, friss sperma esetében 200 millió élő, ép morfológiájú spermiummal.

Az ondóminták minősége a fagyasztási protokoll minden lépésénél romlott. A legdrasztikusabb változás az élő sejtarányban az ondóminta lefagyasztása, majd újbóli felolvasztása (81,5%-ról 48,5%-ra csökkenés) és a glicerinnel eltávolítását célzó centrifugálás (48,5%-ról 36,5%-ra csökkenés) során következett be. Az inszeminált ondóminták összes élő sejt aránya átlagosan 36,4%, míg az élő ép sejtek aránya 24,8% körül mozgott.

A termékeny tojások aránya a harmadik termékenyítéstől a kísérlet végéig gyűjtött tojások össz eredményét tekintve 51,1%, míg a kelési arány 37,5% volt.

A harmadik termékenyítéstől az inszeminált élő, normális morfológiájú spermiumok száma korrelációt mutatott mind a termékenységgel, mind pedig, a kelési eredményekkel ($r=0,57$ mindkét esetben).

Az embrionális rendellenességek előfordulásának vizsgálatakor erős szignifikáns különbség ($P<0,001$) volt kimutatható a petevezetében történő korai elhalások (DO) és gyenge ($P<0,1$) a pozitív fejlődésű csírákorongok (PD) előfordulási arányában a mélyhűtött spermával és a kontroll friss spermával termékenyített csoport között. A kísérleti csoportban lényegesen nagyobb arányban fordult elő mindkét rendellenesség. Az DO előfordulási aránya különösen az első termékenyítéseknél volt rendkívül magas (a termékeny tojások 75, 60, 37,5%-a) majd a kontrollcsoportéhoz hasonló alacsony (10% alatti) értékre csökkent.

Gyenge ($P<0,1$) szignifikancia volt kimutatható a kromoszóma-rendellenességek előfordulásának gyakoriságában. Ebben az esetben is a kísérleti csoportban fordult elő több rendellenesség.

SUMMARY

Varga, Á. – Végi, B.Ms. – Szőke, Zs.Ms. – Liptói, K.Ms. – Várkonyi, E.Ms. – Lennert, L-né Ms. – Barna, J.Ms.: ALTERATION IN COCK SPERM VIABILITY AND FERTILIZING ABILITY DURING CRYOPRESERVATION PROCEDURE

Semen was collected twice weekly from 10 roosters, and frozen by a modification of Lake's method. Hens were inseminated with $110-500 \times 10^6$ live, intact frozen/thawed spermatozoa 11 times at 2–3 days intervals. The viability of spermatozoa was checked at every step of freezing procedure. The most dramatic decreases of live cell ratio (from 81.5% to 48.5%) were found after freezing and thawing processes and after removing the harmful glycerol from the samples (from 48.5 to 36.5%). The fertility and the hatchability were found to be 51.1 and 37.5%, respectively. In the first half of the experiment the rate of the very early embryo deaths (death in the oviduct = DO) was significantly higher in the group inseminated with frozen/thawed spermatozoa, than in the control group ($P<0.001$) but in the second half of the experiment it decreased to the level of the control group. In the chromosome anomalies there was only a slight significant difference between the experimental and control groups. It was the first and successful trial to freeze spermatozoa of Hungarian rural cockerels.

BEVEZETÉS

A genetikai erózió megakadályozása érdekében világszerte, így nálunk is, génbankokat hoztak és hoznak létre, ahol viszonylag kisebb állományokban próbálják fenntartani a helyi fajtákat. Az őshonos magyar tyúkfajták még fellelhető egyedeinek felkutatása és egy stabil génbanki állomány kialakítása több fajta esetében jelenleg is folyamatban van (Szalay, 2002). A fajták hosszú távú fenntartása céljából *in situ* génmegőrzéssel párhuzamosan, a hímivarsejtek mélyhütéses tartósításával *ex situ* génbank létrehozása is szükséges. Az *in situ* génbank hiányában kisebb génbanki állományokban tartás során, a fajtán belül, bizonyos vonalak akár teljes mértékben eltűnhetnek nem várt események (betegség, tűzvész, ragadozók) vagy tenyésztési problémák következtében (Bodó, 1991; Barna és Varga, 2002). Laboratóriumi és intenzív fajtákkal történő telepi kísérletek adatai alapján a kakasspermiumok folyékony nitrogénben korlátlan ideig tárolhatók, *ex situ* génbank kialakítására felhasználhatók (Donoghue és Wishart, 2000). A spermiumok mélyhűthetősége fajtánként eltérő, őshonos magyar tyúkfajtnál pedig még nem végeztek ondo mélyhütési kísérleteket.

Előkísérleteink során a házityúk fajra kidolgozott spermamélyhütési eljárások közül Lake és Stewart (1978) által leírt lassú, glicerines fagyasztási módszert találtuk a legeredményesebbnek, amelyet az újabb eljárásoknál (Wishart, 1995a; Seigneurin és Blesbois, 1995) tapasztalt megfigyeléseknek megfelelően néhány helyen módosítottunk.

Jelen kísérlet célja laboratóriumunkban továbbfejlesztett mélyhütési eljárás gyakorlatban történő kipróbálása, a spermiumok mélyhütés során bekövetkező életképesség és termékenyítőképesség-változásának nyomon követése, és így a spermamélyhütés, mint *ex situ* génmegőrzési módszer e fajtánál történő alkalmazhatósága volt. Vizsgáltuk továbbá az embrióelhalások idejét, és az embriónális és kromoszomális rendellenességek előfordulásának gyakoriságát.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Állatok, ondóminták gyűjtése

A spermavétel Burrows és Quinn (1937) módszere alapján heti kétszer történt, 20, egyedi ketrecekben elhelyezett, parlagi magyar kakastól. Inszemináláshoz a termelési ciklus kezdetén levő 30 parlagi magyar tyúkot használtunk, amelyek mélyalmon, fülkés elrendezésben voltak. Az állatok 13 órás megvilágítás mellett, kereskedelmi forgalomban levő tojótapot fogyasztottak *ad libitum*.

Mélyhütési protokoll, inszemirálás

A mélyhütésre szánt mintákat 20 °C-on 1:1 arányban glicerint nem tartalmazó hígítóval (Lake 1) (Lake és Stewart, 1978) hígítottuk, ampullákba szétmértük (0,3 ml/ampulla), és 5 °C-os hűtődobozban, 20 percig hűtöttük. A glicerint is tartalmazó (2,78 g/2,2 ml glicerin 10 ml oldatban) krio-oldattal történő további 1:1 hígítást egy hideg (5–8 °C-os) helységben végeztük úgy, hogy a glicerin végkoncentrációja a hígított ondómintákban 11%-körüli érték legyen. Az

ampullákba való szétmérést és az 5 °C-on történő hígítást a gyorsaság érdekében automata pipettákkal végeztük. A mintákat ezután további 10 percig 5 °C-on inkubáltuk, majd egy programozható fagyasztókészülék (Planer Kryo 10, Planer Products Ltd, UK) segítségével 7°C/perc, majd -35°C-tól 20°C/perc sebességgel hűtöttük -140 °C-ig. A mélyhűtött ondómintákat végül folyékony nitrogénbe helyeztük.

Az ondóminták felolvasztása 5 °C-os vízfürdőben történt. A felolvasztott ondómintákat 1:8 arányban hígítottuk glicerinentes hígítóoldattal (Lake és Stewart, 1978) 6 lépésben (0,08, 0,22, 0,40, 0,73, 1,5 és 1,9 ml hígító), majd 5 °C-on centrifugáltuk 700g-n 20 percig. A felülúszó eltávolítása után a visszamaradó pelletet a 0,1 ml hígítóoldattal elkevertük, majd 20 percen belül kloákakifordítással, mélyen intravaginálisan inszemináltuk. A frissen termékenyítésre szánt ondómintákat, eredeti koncentrációjuk fotométerrel történő meghatározása után, megfelelő mértékben hígítottuk és inszemináltuk.

Ondóminősítés

Jelen kísérletben a spermiumok életképességét anilin-eozin festést követően az élő/holt sejtarány, valamint a morfológiai rendellenességek arányának meghatározásával Leitz Diaplan mikroszkópban immerzió alatt végeztük a mélyhűtési eljárás egyes szakaszaiban:

- közvetlen gyűjtés után,
- 5 °C-ra hűtést követően,
- glicerines hígítóval történő hígítás után,
- felolvasztást követően, a glicerint eltávolítását célzó centrifugálás előtt,
- centrifugálás, és a sejtek reszuszpendálása után, közvetlenül inszeminálás előtt.

Ezeket a vizsgálatokat valamennyi mélyhűtés során elvégeztük, majd az eredményeket átlagoltuk.

A spermiumok motilitását közvetlenül az inszeminálás előtt ellenőriztük, egy hordozható mikroszkóp (200x nagyítás) segítségével, mind a kísérleti mind, pedig a kontroll csoportnál. Az ondómintákat a spermiumok motilitása alapján szubjektív becsléssel 0-tól 5-ig pontoztuk a következőképpen:

0: nincs motilitás;

1: motilitás van, de az előrehaladó mozgást végző spermiumok száma kevesebb, mint 5%;

2: a spermiumok negyede (10–35%-a) előrehaladó mozgást végez;

3: a spermiumok fele (40–60%-a) előrehaladó mozgást végez;

4: a spermiumok többsége (70–80%) előrehaladó mozgást végez;

5: A spermiumok mindegyike élénk előrehaladó mozgást végez.

Friss sperma esetében csak a 4-es vagy 5-ös, míg a mélyhűtött/felolvasztott spermánál a legalább 2-es motilitási értékkel rendelkező mintákat inszemináltuk.

A friss és a mélyhűtött ondóminták termékenyítőképességét a begyűjtött tojások keltetésével, vizsgálatával hasonlítottuk össze. 20 tyúkot mélyhűtött-felengedett, 10-et pedig kontroll friss spermával termékenyítettünk. A kísérlet során két-három napos időközökkel tizenegy termékenyítést hajtottunk végre mélyhűtött sperma esetében 110–500 millió, friss sperma esetében 200 millió

élő, ép morfológiájú spermiummal. A tojásokat az első termékenyítés után 24 órával kezdtük gyűjteni, és a gyűjtést az utolsó termékenyítést követő negyedik napon fejeztük be. Egy-egy termékenyítés eredményességét a termékenyítést követő 25–72/96 óra között lejtő tojások keltetésével, illetve a kilámpázott tojások vizsgálatával mértük fel.

Embrióvizsgálatok

A keltetés ötödik napján végzett lámpázás után azokat a tojásokat törtük fel, amelyekben normális embrionális fejlődés nem volt megfigyelhető. A mintákat a következő csoportokba soroltuk:

- „Szemre terméketlen”;
- PD (positive development): pozitív fejlődés;
- BWE (blastoderm without embryo): embrió nélküli blasztoderma;
- „D1–4” (embryos died on the 1st-4th day of the incubation): 1–4 napos korban elhalt embrió.

A szabad szemmel terméketlennek tűnő csírákorongokat kimetszettük, 0,9%-os NaCl oldatba helyeztük. Bonctüvel sztereomikroszkóp alatt a csírákorong sejtjeit leválasztottuk a szikhártyáról, tárgylemezre helyeztük, és propidium joddal (PI) (P4170, Sigma) megfestettük, majd fluoreszcens mikroszkóppal (Leica, 500x nagyítás) vizsgáltuk. A csírákorong fluoreszcens vizsgálata alapján a szemre terméketlen csírákorongú tojásokat valódi terméketlen tojásokra (I, infertile), vagy olyan termékeny tojásokra osztottuk, amelyben az embrió korán, feltehetően még a petevezetőben elhalt (DO, embryos died in the oviductus) (Liptói és mtsai, 2004).

Kromoszóma-vizsgálat

Az 5. napon végzett lámpázás során kieső tojásokat feltörtük és az esetlegesen elhalt embriókból mintát vettünk kromoszóma vizsgálatra. Az embriók fenotípusának meghatározása után a mintákat 0,56%-os KCl oldatba (hipotonizálás) helyeztük és 1–2 csepp 0,1%-os colchicint cseppentettünk a mintákhoz a mitózisok arányának növelésére. A mintákat 37,5 °C-on inkubáltuk 20 percig. és cc. ecetsav:abszolút etanol 1:3 arányú keverékének háromszori cseréjével fixáltuk. A fixált mintákból egy kis részt kimetsztünk és 50%-os ecetsavval óraüvegen finn pipetta segítségével szuszpendáltuk. 30 µl szuszpenziót 40–50 °C-ra melegített és ezen a hőfokon tartott tárgylemezre cseppentettünk. A csepp szélének száradása után a maradék mintát visszaszívtuk és a pipetta segítségével továbbvittük a tárgylemezen, így lemezenként nyolc kört kaptunk. A lemezeket a minták egy napos, levegőn történő szárítása után 5%-os Giemsa-törzsoldat foszfát pufferes oldatával festettük meg. Lemezenként legalább 20 osztódást értékeltünk. (Zeiss Axioscop, Jena, Germany; Hidas és mtsai, 1996)

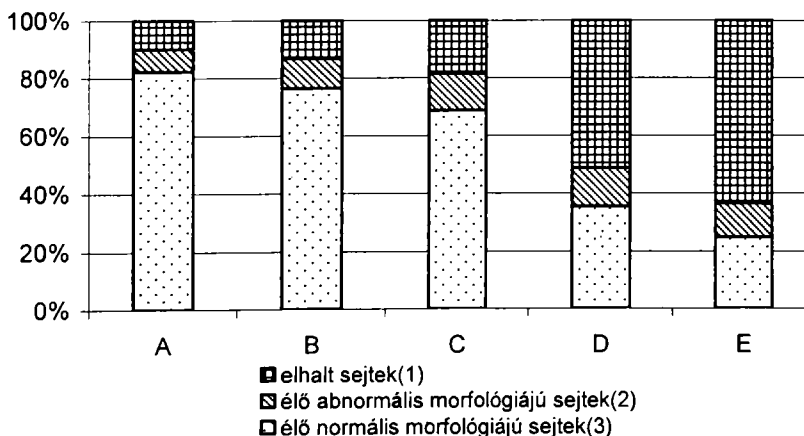
Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai értékelését varianciaanalízissel, Chi² próbával (Statgraph program) végeztük.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az ondóminták minősége a fagyasztási protokoll minden lépésénél romlott, a legdrasztikusabb változás az élő sejtarányban az ondóminta lefagyasztása, majd újbóli felolvasztása (81,5%-ról 48,5%-ra csökkenés) és a glicerinnel történő centrifugálás (48,5%-ról 36,5%-ra csökkenés) során következett be (1. ábra). A mélyhűtési eljárás teljes tartama alatt a spermiumok életképessége az eredeti 90,1% érték 40%-ára csökkent. Közvetlenül az inszeminálás előtt az élő sejtek 32%-a volt rendellenes (E). Míg kevéssel gyűjtés után a spermium rendellenességek elsősorban éretlen sejtek vagy más fejlődési rendellenességek közül kerültek ki, az inszeminálás előtti ondómintákban az akroszóma és a sejtmembrán mechanikai károsodása miatt fellépő közepdarab rendellenességek domináltak.

1. ábra: Spermiumok életképességének változása a mélyhűtés során



A=gyűjtés után közvetlenül; B=5 °C-on hűtött; C= glicerinnel hígított; D=kiolvasztott; E=inszeminálás előtt közvetlenül

Fig. 1.: Changes in sperm viability during cryopreservation procedure
dead spermatozoa(1), live, abnormal spermatozoa(2), live, normal spermatozoa(3), A=just after collection, B=cooled to 5 °C, C=diluted with glycerolized diluent, D=thawed, E=just before insemination

Inszeminálás előtt a mélyhűtött/felolvasztott ondóminták összes élő sejt aránya 25–49%, míg az élő ép sejtek aránya 12–40% között mozgott.

A kísérleti csoportban a harmadik termékenyítéstől a kísérlet végéig gyűjtött tojások átlagos termékenysége 51,1%, az átlagos keltethetőség 37,5%, a kontroll, friss spermával termékenyített csoportban ugyanez 91,4%, illetve 73,5% volt. A kontroll csoport termékenységi és kelési százaléka szignifikánsan ($P < 0,001$) magasabb volt, mint a kísérleti csoportban.

Az első két inszeminálás utáni napokban gyűjtött tojások termékenysége 35%, kelési eredménye 10% alatt volt (2., 3. ábra). A további termékenyítések-nél az inszeminált élő, normális morfológiájú spermiumok száma korrelációt mutatott mind a termékenységgel, mind pedig a kelési eredményekkel ($r=0,57$

mindkét esetben). A termékenység 44–58%, míg a keltethetőség 25–50% között váltakozott. Kísérletünkben 50%-os termékenység eléréséhez 300 millió, míg 50% kelési eredmény eléréséhez 400 millió élő, ép mélyhűtött/felolvasztott spermium bejuttatása volt szükséges.

2. ábra: Összefüggés a termékenység és az élő, ép mélyhűtött/felolvasztott spermiumok száma között

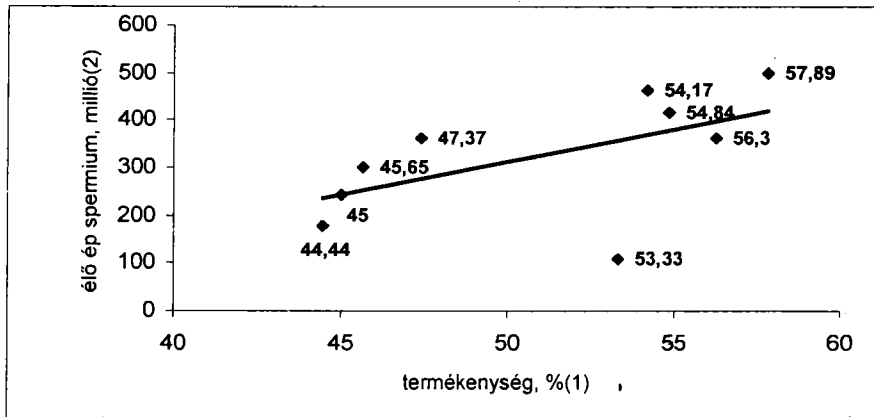


Fig. 2.: Correlation between fertility and the number of inseminated live, intact frozen/thawed spermatozoa
fertility(1), number of live, intact spermatozoa, million(2)

3. ábra: Összefüggés az élő embriók és az inszeminált, élő, ép, mélyhűtött/felolvasztott spermiumok száma között

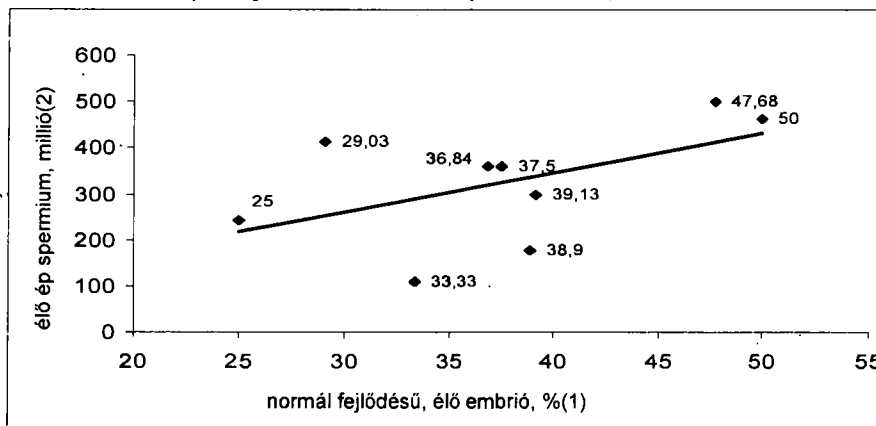
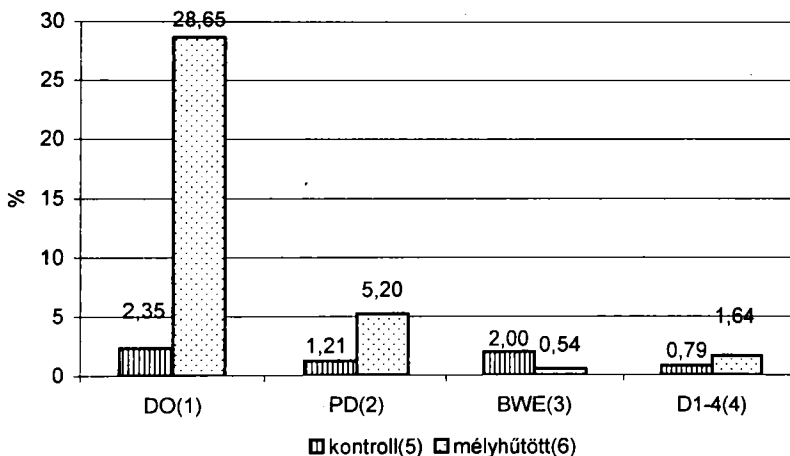


Fig. 3.: Correlation between hatched embryos and the number of inseminated live, intact frozen/thawed spermatozoa
number of embryos showing normal development(1), number of live, intact spermatozoa, million(2)

Az embrionális rendellenességek előfordulásának vizsgálatakor erős szignifikáns különbség ($P < 0,001$) volt kimutatható a petevezetőben történő korai elhalások (DO) és gyenge ($P < 0,1$) a pozitív fejlődésű csirakorongok (PD) előfordulási arányában a kísérleti és a kontroll csoport között (4. ábra). A kísérleti csoportban lényegesen nagyobb arányban fordult elő mindkét rendellenesség.

4. ábra: Embrionális rendellenességek termékeny tojásokhoz viszonyított aránya



DO=petevezetékben elhalt; PD=pozitív fejlődés; BWE=blasztoderm embrió nélkül; az inkubáció 1–4 napja között elhalt embrió

Fig. 4.: The rates of embryonal abnormalities / fertile eggs embryos died in the oviductus(1), positive development(2), blastoderm without embryo(3), embryos died on the 1st–4th day of the incubation(4), control(5), intact frozen(6)

Az igen korai (még a petevezetőben történő) elhalás (DO) aránya az első hat, mélyhűtött spermával történő inszeminálás során magas volt (5. ábra). A petesejt megtermékenyült, és osztódásnak indult, de a fejlődés korai szakaszában az embrió elhalt. A hetedik termékenyítéstől a DO aránya a mélyhűtött és friss spermával való inszeminálás esetében hasonló értékeket mutatott.

5. ábra: A korai embrióelhalások (DO-k) termékeny tojásokhoz viszonyított arányának alakulása

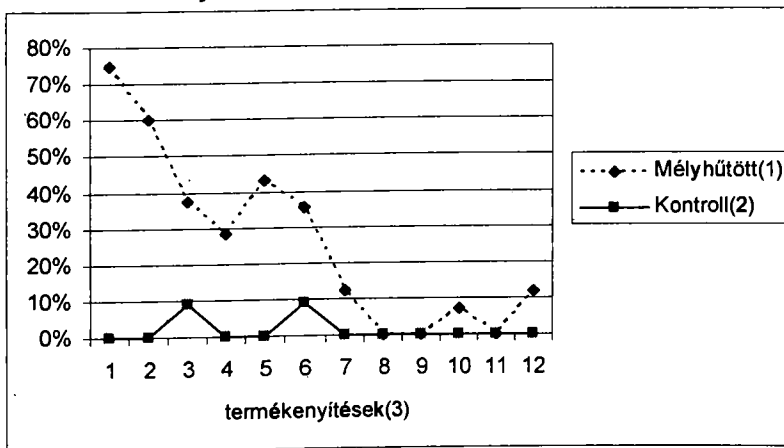


Fig. 5.: The variation of the rates of deaths in the oviducts (DO)/fertile eggs inseminated with frozen/thawed semen(1), control(2)

Kromoszóma rendellenességek vizsgálata céljából a kilámpázott tojásokból a kontroll csoportból 15 mintát, a kísérleti csoportból pedig 12 mintát gyűjtöttünk. A kontroll csoportban, kettőben találtunk 1AZ/2AZW típusú haploid/diploid mozaikosságot (6–7. ábra), egyben, pedig haploid (1AZ) rendellenességet. A kísérleti csoportban, kettőben találtunk haploid (1AZ) típusú, négyben, pedig 2AZ/4A típusú diploid/tetraploid mozaikosságot. A két csoportban előforduló kromoszóma rendellenességek arányát tekintve a két csoport között szignifikáns különbség volt kimutatható, bár ez, valószínűleg a kis mintaszámnak köszönhetően, nem erős ($P \leq 0,067$).

6. ábra: Haploid osztódás (1AZ)



Fig. 6.: Haploid cell division (1AZ)

7. ábra: Diploid osztódás (2AZW) ugyanazon az egyedben belül



Fig. 7.: Diploid cell division (2AZW)

KÖVETKEZTETÉS

Az élő/holt spermiumok aránya és az élő normális morfológiájú spermiumok száma mind fagyasztás előtt, mind fagyasztás/felolvasztás után elmarad az intenzív fajták eredményeitől. Ugyanez mondható el a termékenységi és keltezési eredményekről is (Chalah és mtsai, 1999). Ennek oka lehet, hogy az őshonos fajtákban a küllemi szelekción túl semmi egyéb irányú szelekció nem történhet, tehát a hímivarhoz kötődő pozitív tulajdonságok, mint ondótermelő-képesség, ondóminőség, mélyhűtéssel szembeni ellenálló-képesség, termékenyítőképesség, stb. nem kerülnek előtérbe. Tehát már a friss ondó minősége sem tökéletes és ismert, hogy a mélyhűtés sikerességéhez a kiváló minőségű ondóminták használata elsődleges. Annak ellenére, hogy a legjobb ondóminták használatára törekedtünk, a gyakori, heti 2–3-szor történő, egy-egy alkalommal lehetőleg 300 millió élő, ép spermium bejuttatásával 50% feletti termékenységet, és a 40% körüli kelési arányt sikerült csak elérnünk. A módszer, bár nagyüzemi brojler-tenyésztésben nem lenne gazdaságos, *ex situ* génbank kialakítására, egyes tyúkfajták génállományának biztonsági tartalékként történő fenntartásának céljából — véleményünk szerint — alkalmas.

Kísérletünkben először vizsgáltuk a termékenyítéskor bejuttatott élő, ép mélyhűtött/felolvasztott spermiumok száma és a tojások termékenysége, keltehetősége közötti kapcsolatot. Vizsgálataink alapján a kritikus 50%-os termé-

kenység eléréséhez legalább 300, 50%-os kelési arány eléréséhez legalább 400 millió élő, ép mélyhűtött/felolvasztott spermium szükséges. Eredményeink igazolják azt a korábbi megfigyelést, hogy a mélyhűtés/felolvasztás során az ondóminták termékenyítőképessége az élő normális sejtek arányánál nagyobb mértékben csökken (*Wishart, 1985*).

A madarak esetében a bejuttatott spermiumoknak csupán 1%-a tárolódik a petevezető spermatároló tubulusaiban. A petesejt megtermékenyülésének esélye egyenesen arányos a spermiumtároló tubulusok spermiumokkal való telítettségének mértékével (*Wishart, 1995b*). Az első két inszeminálás során kapott gyenge termékenységi és kelési eredmény a hiányosan feltöltődött spermiumtároló tubulusokkal és így a termékenyítőképes spermiumok kis számával magyarázható. Az egymást követő inszeminálások során a tubulusok feltöltöttsége egyre teljesebbé válik, ennek köszönhető, hogy a későbbi inszeminálásokat követően kezdett emelkedni a termékeny tojások aránya. A termékenységi (kelési) eredmények alakulásába tehát nem csak a bejuttatott spermiumok száma, hanem a spermatároló tubulusok feltöltöttsége is szerepet játszik.

A petevezetőben történő nagyon korai elhalás (DO) nagy arányú előfordulásáról *Ogasawara és Lorenz, 1964* számoltak be, azonban nem a kevés, hanem éppen a túl sok, közvetlenül a magnumba bejuttatott spermium miatt. Eredményeink szerint a korai embrióelhalások (OD-k) száma nem csak a túl sok, hanem a túl kevés termékenyítőképes spermium esetében is megnőhet. Kísérletünkben a DO-arány alakulásának az oka az lehet, hogy a mesterséges termékenyítés kezdetén nincs a normális embrionális fejlődéshez elegendő mennyiségű élő, termékenyítőképes spermium a petevezetőben. Tehát a petesejt megtermékenyül, az osztódási folyamatok megindulnak, azonban a normális embriófejlődés még a petevezetőben elakad. Feltételezhető tehát, hogy a normális embriófejlődéshez létezik egy optimális spermiumszám, amire a sejtosztódás megindulásán túl az embriófejlődés során zajló anyagcsere folyamatokhoz is szükség van. A további inszeminálásokat követően a spermatároló tubulusok telítődnek, így a gyengébb minőségű mélyhűtött spermiumokból is elegendő számú termékenyítőképes spermium juthat el az infundibulumba.

Az elhalt embriókból történő kromoszómavizsgálataink eredménye arra utal, hogy a mélyhűtés okozta esetleges elváltozás a spermiumban, vagy egyéb, a mélyhűtött/felolvasztott spermával történő termékenyítésnél előforduló tényező (keves termékenyítőképes spermium, krioprotektáns-maradék) növelheti a kromoszóma rendellenességek gyakoriságát az elhalt embriókban. A kis mintaszám miatt biztos következtetések levonásához további kísérletek szükségesek.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönjük a KÁTKI Agrárökológiai és Génmegőrzési Osztályának a vizsgálatainkhoz szükséges őshonos baromfifajták biztosítását.

IRODALOM

- Barna, J. – Varga, Á.(2002): Ondósejtek mélyhütéses tárolása baromfiféléknél, mint *ex situ* génmegőrzési módszer. Génmegőrzés; kutatási eredmények régi háziállatfajták értékeiről. Tud. Úlés kiadványa, Debrecen, 227–232.
- Bodó, I.(1991): A géntartálékok megőrzése az állattenyésztésben. MTA Doktori Disszertáció, Budapest
- Burrows, W.H. – Quinn, J.P.(1937): The collection of spermatozoa of domestic fowl and turkey. *Poult. Sci.*, 16. 19–24.
- Chalah, T. – Seigneurin, F. – Blesbois, E. – Brillard, J.P.(1999): *In vitro* comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility *in vivo*. *Cryobiology*, 39. 185–191.
- Donoghue, A.M. – Wishart, G.J.(2000): Storage of poultry semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 63. 213–232.
- Hidas, A. – Szalay, I. – Liptói, K. – Várkonyi, E.(1996): Cytogenetic analysis of early dead embryos in chicken breeding stocks. *Cytogen. Cell Genet.*, 74. 3. 233.
- Lake, P.E. – Stewart, J.M.(1978): Preservation of fowl semen in liquid nitrogen- an improved method. *Br. Poult. Sci.*, 19. 187–194.
- Liptói, K. – Varga, Á. – Hidas, A. – Barna, J.(2004): Determination of the rate of true fertility in duck breeds by the combination of two *in vitro* methods. *Acta Vet. Hung.*, 52. 227–233.
- Ogasawara, F.X. – Lorenz, F.W.(1964): Early mortality in chicken embryos following intramaginal insemination. *Poult. Sci.*, 43. 1373.
- Seigneurin, F. – Blesbois, E.(1995): Effects of the freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. *Theriogenology*, 43. 1351–1358.
- Szalay, I.(2002): Régi magyar baromfifajták. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Wishart, G.J.(1985): Quantitation of fertilizing ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa. *Br. Poult. Sci.*, 26. 375–380.
- Wishart, G.J.(1995a): Cryopreservation of avian spermatozoa. In: *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Ed.: Day, J.G. – McLellan, M.R., Meth. Molec. Biol., 38. 167–177. Humana Press Inc.
- Wishart, G.J.(1995b): New approaches to evaluating male and female fertility. In: *Proc. First Int. Symp. Artificial Insemination of Poultry*. Ed.: Bakst, M.R. – Wishart, G.J., *Poult. Sci. Assoc.*, Savoy, Illinois, 207–223.

Érkezett: 2005. január
Szerzők címe: Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Authors' address: Insitute for Small Animal Research
H-2101 Gödöllő, Pf. 417.

ÚTMUTATÓ A KÉZIRATOK ELKÉSZÍTÉSÉHEZ

Az Állattenyésztés és Takarmányozás kéthavonta megjelenő tudományos folyóirat, foglalkozik az állattermék-előállítás valamennyi ágával, beleértve az összes állatfajt, azok tenyésztését, tartását, takarmányozását és az életfolyamatokkal kapcsolatos minden kérdéskört. Közül elsősorban eredeti tudományos közleményeket, de egyes esetekben a tárgykörhöz tartozó szakirodalmi áttekintéseket és szükség szerint időszerű termeléspolitikai koncepciókat, szemle cikkeket. Tájékoztató céllal ismertet disszertációkat, beszámolókat tudományos rendezvényekről, összefoglalókat az egyetemek és a kutatóintézetek kiadványaiból. A cikkeket magyar vagy angol nyelven, az összefoglalókat, a táblázatokat és az ábraszövegeket mindkét nyelven közli.

A kéziratokat kettő példányban, nem szerkesztett változatban, írógéppel, vagy nyomtatóval jól olvashatóan leírva kell a szerkesztőség címére megküldeni. Csatolandó valamennyi szerző nyilatkozata arról, hogy hozzájárul a közlemény megjelenéséhez, és egyet ért annak tartalmával. A beérkezett kéziratokat a szerkesztőség (anonim) lektorálta, és amennyiben szükséges (ugyancsak anonim) visszaküldi a szerző(k)nek a végleges változat elkészítése érdekében.

Az elfogadott közlemények végső változatát elektronikus verzióban (3,5 HD/DD floppy vagy e-mail) és egy kinyomtatott példányban kell a szerkesztőség címére beküldeni. A közlés költségmentes, az első szerző 50 különlenyomatot kap.

Felvilágosítás a közléssel kapcsolatban, a szerkesztőségben:

Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, 2053 Herceghalom, Gesztenyés u. 1.,
Tel.: 23-319-133/225; FAX: 23-319-133/120; E-mail: jgundel@atk.hu vagy szerk@atk.hu

Az útmutató teljes szövege, az Állattenyésztés és Takarmányozás, 2004. 53. 2. számában a 193–195. oldalon olvasható, illetve az Internetről letölthető:

<http://www.atk.hu/magyar/MagyHaszUt.htm>

GUIDE FOR AUTHORS

The Hungarian Journal of Animal Production is a bimonthly scientific journal dealing with all of the branches of animal production, including all of the species, their breeding, keeping and feeding, and the whole sphere of questions connected to their vital processes. Mainly original scientific papers, but in some cases also review articles and up-to-date production political conceptions are published. Information is given on dissertations, scientific meetings and on reports of universities and research institutes. Articles are published in Hungarian or English, summaries, texts of tables and figures in both languages.

Manuscripts should be sent in two copies, written in well readable in non-reduced form by typewriter or printer to the address of the editorial office. All authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Manuscripts are anonymously reviewed, and if necessary (also anonymously) returned to the author(s) for the formation of the final version.

The final versions of the accepted publications should be submitted in electronic version (3.5 HD/DD floppy or E-mail) plus in one printed copies to the address of the editorial office. Publishing is free of charge, 50 reprints are sent to the first author.

Publication related information may be obtained from the editorial office: Research Institute for Animal Breeding and Nutrition, H-2053 Herceghalom, Gesztenyés u. 1.,
Phone: +36-23-319-133/225; FAX: +36-23-319-133/120; E-mail: jgundel@atk.hu or szerk@atk.hu

Full text (in English) of guide for authors see on the Internet:

<http://www.atk.hu/english/AngHaszUt.htm>

ÁLLATTENYÉSZTÉS és TAKARMÁNYOZÁS

Főszerkesztő (Editor-in-chief): GUNDEL János (Herceghalom)

Szerkesztő (Editor): REGIUSNÉ MÖCSÉNYI Ágnes (Herceghalom)

A szerkesztőség tanácsadó testülete (Editorial advisory board):

Elnök (President): BODÓ Imre

BREM, G. (Ausztria)	BALTAY Mihály (Budapest)	KOVÁCS József (Keszthely)
HABE, F. (Szlovénia)	DEMETER János (Budapest)	MARTON István (Budapest)
HAN, In K. (Korea)	DOHY János (Budapest)	MÉZES Miklós (Gödöllő)
HODGES, J. (Ausztria)	FÉSÜS László (Herceghalom)	MIHÓK Sándor (Debrecen)
JUST, A. (Dánia)	HORN Artúr (Budapest)	RAFAI Pál (Budapest)
KRÄUSSLICH, H. (Németország)	HORN Péter (Kaposvár)	SCHMIDT János (Mosonmagyaróvár)
MARTIN, T.G. (USA)	INCZE Kálmán (Budapest)	SZABÓ Ferenc (Keszthely)
VERSTEGEN, M.W.A. (Hollandia)	KÁRPÁTI József (Kaposvár)	SZAKÁLY Sándor (Pécs)
	KESERŰ János (Budapest)	SZALAY István (Gödöllő)
		VERESS László (Debrecen)

**Szerkesztőség,
kiadóhivatal
(Editorial and
publisher office):**

Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.
T/F: (36) 23–319–133 E-mail: szerk@atk.hu <http://www.atk.hu>

Felelős kiadó (Publisher):
HU ISSN: 0230 1814

RÁTKY József, főigazgató

A lap a Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium tudományos folyóirata
This is a scientific bimonthly journal of the Ministry of Agriculture and Regional Development

A kiadást támogatja: Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium
(Sponsored by)

Megjelenik évente hatszor

Előfizetési díj: 1 évre 4400,- Ft (ÁFA-val)

Kiadja és terjeszti Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet

Előfizethető a kiadónál, vagy átutalással az MNB 232–90174–0808 pénzforgalmi jelzőszámmal

Külföldön terjeszti a Batthyány Kultur-Press Kft., 1011 Budapest, Szilágyi Dezső tér 6.

T/F: 1–201–8891; 1–212–5303 E-mail: batthyany@kultur-press.hu.

Orders may be placed with Batthyány Kultur-Press Ltd., Szilágyi Dezső Square 6. H-1011 Budapest,
or with any of its representatives abroad

Készült az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézetben, Herceghalom (11/25.)

A nyomda felelős vezetője: Kurucz István
