

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 5

Issue 4

Különszám

Gödöllő
2009



SZAPORA MERINÓ ÉS CIGÁJA ANYAJUHOK PETEFÉSZEK- MŰKÖDÉSÉNEK HORMONANALITIKAI ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATA TAVASZI-NYÁRI HÓNAPOKBAN

Novotniné Dankó Gabriella, Árnysai Mariann, Magyar Károly

Debreceni Egyetem Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma, Állattenyésztés-tudományi Intézet,
4032 Debrecen, Böszörményi u. 138

novotnine@agr.unideb.hu

Összefoglalás

A szerzők két juh fajta petefészek működését vizsgálták hormonanalitikai és laparoszkoós módszerekkel tavaszi-nyári eleji, tehát a klasszikus tenyészszezonon kívüli hónapokban. Az endokrinológiai vizsgálatok mellett az egyedek genetikai hátterét is meghatározták a melatonin receptor1a-génre vonatkozólag, mely a szezonon kívüli ivarzási készséggel van kapcsolatban. A tavaszi termékenyülési eredmények általában rosszabbak, mint az őszié, ezért szaporodásbiológiai befolyásoló módszereket, ciklusindukciót, mesterséges termékenyítést alkalmaztak. Vér-progeszteron vizsgálattal követték nyomon a vizsgált populációk petefészek működését a szaporodásbiológiai szempontból kritikus időszakban. Hormonalitikai módszerekkel és laparoszkoós ovuláció ráta méréssel vizsgálták, hogyan reagálnak a fajták a ciklusindukciós módszerekre. Laparoszkoós mesterséges termékenyítéssel, illetve természetes fedeztetéssel végezték az állomány termékenyítését. Eredményük szerint a ciklusindukció mind a szapora merinó, mind a cigája fajtánál igen hatékony, a mesterséges termékenyítés jobb eredményt hoz a természetes fedeztetésnél ebben az időszakban, ennek ellenére a vemhesülési eredményeket sok külső tényező, főképpen takarmányozási és időjárási hatások befolyásolhatják. A vizsgált melatonin receptor-1a receptor gén mutációja (MnII) markergénként ígéretes eszközként kínálkozik e két fajtában az egész évben ciklikus petefészek-működés képességére történő szelekciós munkában.



Endocrinological and molecular genetic examination of the ovarian function of Prolific Merino and Tzigai ewes in out-of –season period

Abstract

The authors examined the ovarian function of two sheep breeds by hormon-analytical and laparoscopic methods between April and June. Molecular genetic examination of melatonin_{1a} -receptor gene, as a potential marker of ability for continuous ovarian cyclicity, was also done. The fertility of spring and early summer breeding is usually lower; this imposes the need for alternative methods, such as hormonal treatments and biotechnological practices, to increase the conception rate. For following up the ovarian function and examine the reaction of ewes for cyclus induction methods blood progesterone level and ovulation rate was measured. Laparoscopic artificial insemination and natural mating were applied. According to results the cyclus induction was very effective for Prolific Merino and Tzigai breeds, respectively. The artificial insemination was more effective than natural mating in this period; however the conception rate mightily depends on feeding and weather conditions. The MnII RFLP site seems to be a promising candidate for detection of ability for cyclic ovarian activity out of the breeding season in Hungarian Prolific Merino and Tzigai ewes as well.

Anyag és módszer

A petefészek-működés vizsgálatát a Debreceni Egyetem Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma (DE AMTC) juh tenyésztő-telepén végeztük az évnek szaporodásbiológiai szempontból kritikus időszakában, vegyes életkorú és tápláltsági állapotú, szapora merinó anyajuhokon és cigája jerekén 2005 és 2006 években.

Hormonanalitikai vizsgálatok

A kutatómunka keretén belül 54 szapora merinó anya és 30 cigája jerke petefészek működését követtük nyomon április-június hónapokban (*lsd.1-es táblázat*). A petefészek-működés monitorozása céljából, vérplazma mintákból határoztuk meg az egyedek progeszteron szintjét. A vérmintákat a torkolati véna (vena jugularis) punkciójával, heparinózott csövekbe gyűjtöttük, centrifugálás után 1-1,5 ml-t Eppendorf csőbe fejtve a plazmamintákat feldolgozásig -20 C^o-on tároltuk. A vérplazma minták progeszteron szintjének meghatározása ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) módszerrel történt a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Endokrinológiai laborjában. A kísérleti állatok



tél végén ellettek (január-március), vegyes életkorúak (2-7 év), súlyúak (37-64 kg) és kondíció pontszámúak (3,3-4,6) voltak. Az anyákat illetve jéréket a tél folyamán lucernaszéna és búzaszalma ad libitum etetése mellett karámozták, április elejétől pedig legeltették. A 84 kísérleti állat közül 75 anyánál ivarzásszinkronizációt (illetve ivarzás indukciót) végeztünk, 40 mg fluorogeszton acetát tartalmú Chronogest hüvelyszivacs (Intervet, Boxmeer, Hollandia) és 500 IU PMSG-hatású Folligon injekció i.m. (Intervet, Boxmeer, Hollandia) alkalmazásával. Az állatok termékenyítése laparoszkópos mesterséges termékenyítéssel, illetve természetes fedeztetéssel történt.

Vérmintákat 7 alkalommal vettünk a kísérleti állatoktól. Tamponálás előtt 14, illetve 28 nappal kezdtünk el a vizsgálatokat, mely progeszteron-szint értékekből az állatok ciklikus, illetve acikliás petefészek- működését regisztráltuk. A tamponálás utáni vérminta értékekből az ivarzás-indukció hatékonyságáról kaptunk képet. A gesztagén megvonás, illetve a PMSG kezelés után 60 órával – 24 óras koplaltatást követően- laparoszkópos mesterséges termékenyítést végeztünk mélyhűtött spermával, az anyák másik csoportját pedig természetes úton, kossal fedeztettük. A képződött sárgatestek (CL) számának meghatározása céljából laparoszkópos ovulációs ráta (OR) vizsgálatot végeztünk a mesterségesen termékenyített és a kossal fedeztetett cigája anyáknál (összesen 75 állat). A nem tamponált csoportnál (9 db állat), ellés után 31-46 nappal kezdve hetente 7 hétig folyt a vérminta vétel azzal a céllal, hogy megnézzük, ellés után, szezonon kívül ciklikussá válik-e a petefészek működés ivarzásindukció nélkül is. Ezt a csoportot kossal fedeztettük a kora nyári időszakban.

Ciklikusnak ítéltük a petefészek működését, ha a tamponálás előtti három, illetve öt vérplazma-mintából legalább az egyikben CL jelenlétére utaló, emelkedett ($\geq 3,18$ nmol/L) progeszteron szintet találtunk. Tamponkivétel után 9 és 16 nappal újabb vérmintákat vettünk, amelyből arról kaptunk információt, hogy a gesztagén + PMSG kezelés hatására ciklusba lendültek-e az előzőleg acikliás állatok.

Mel1 gén polimorfizmus vizsgálata

A genotípus vizsgálatokhoz minden állattól EDTA véralvadásgátlót tartalmazó csőbe gyűjtöttünk vérmintát, melyet feldolgozásig -20 fokon tároltunk. A vérből kisózásos módszerrel izoláltunk DNS-t, melynek koncentrációját NanoDrop 1000 spektrofotométer segítségével határoztuk meg. A genotípus-vizsgálatok két mutáció kimutatására irányultak. Mindkettő a melatonin-1a receptor gén II. exonjában következett be, a 606. és 612-es pozícióban azonosított két mutáció vizsgálatát PCR-RFLP módszerrel végeztük el. A II-es exon amplifikálásához a *Notter és mtsai* (1997) által javasolt primereket és reakciókörülményeket használtuk.

A PCR termékeket (824 bázis) külön-külön emésztettük az MnlI (612-es mutáció kimutatásához) és RsaI (606-os mutáció kimutatásához) enzimekkel. Az inkubálás mindkét esetben 37°C -on történt, 4



órán át. Ezt követően a mintákat 2.5%-os agaróz gélen futtattuk. Az MnII emésztés után várható polimorfizmus eredményeként 286 és 236 bázis hosszúságú fragmenteket kaptunk. Az RsaI esetében 290 és 295 bázis hosszúságú fragmentek megléte illetve hiánya mutatja az egyes allélokot. A kísérletben futtatott egyedek között egyaránt találtunk 286/286, 286/236, 236/236, valamint 290/290, 290/295 és 295/295 genotípusú egyedeket. Az egyes fragment hosszokhoz az alábbi allél elnevezést adtuk:

RsaI: 295 bázis = A allél (itt timin van a DNS láncban)
290 bázis = B allél (itt citozin van a DNS láncban)
MnII: 286 bázis = A allél (itt adenin van a DNS láncban)
236 bázis = B allél (itt guanin van a DNS láncban)

Az eredmények statisztikai értékelését a SAS 9.1 softwer segítségével végeztük. Mivel két évben is folytattunk megfigyelést és két fajtát vontunk be a kísérletbe a statisztikai értékelésnél ezt figyelembe vettük. A „proc genmod” eljárást alkalmaztuk annak megállapítására, hogy az év, a fajta és a vizsgált polimorfizmusra meghatározott genotípusok befolyásolják-e a szezonon kívüli spontán ivarzást. Néztük továbbá azt is, hogy a két fajtában megfigyelt genotípus gyakoriságokban van-e különbség. Ehhez a „proc freq” eljárást alkalmaztuk. Mind a „proc genmod”, mind a „proc freq” Chi² próbán alapul.

Eredmények

Hormonanalitikai és laparoszkópos vizsgálatok

2005 évben a tamponálás előtti (április közepén - május elején vett) vérminták progeszteron szintje alapján a szapora merinó anyák 45%-a volt ciklusban, a cigája jerkéknél hasonló, 43%-os volt a ciklusos petefészek-működésű egyedek aránya. (1. táblázat). 2006 évben csak szapora merinó anyákat vizsgáltunk, ekkor sokkal alacsonyabb, 25, illetve 22 % volt a tamponálás előtt ciklusban lévő anyák száma a két vizsgált csoportban (1. táblázat).

A képződött sárgatesteknek a termékenyítés utáni 7. napon laparoszkópos technikával meghatározott számából következtettünk az ovulált tüszők számára. Az OR mérés eredményeit az 1. és 2. ábra mutatja.

1. táblázat: A vizsgált állatok évenként és a ciklus állapota tamponálás előtt és ivarzásindukció után

Év/Anyák száma(n)(1)	SZAPORA MERINÓ(2)				Év/Anyák száma(n)(2)	CIGÁJA(3)			
	Tamponálás előtt ciklikus (4)		Tamponálás után ciklusba lendült(5)			Tamponálás előtt ciklikus(4)		Tamponálás után ciklusba lendült(5)	
	db	%	db	%		db	%	db	%
2005					2005				
n=29	13	45	24	83	n=30	13	43	28	93
2006									
n=16	4	25	16	100					
n=9	2	22	Nem tamponált						

Table 1: The examined animals in different years and the ovarian function before and after oestrus induction
 Year/Nr of ewes (n)(1); Prolific Merino(2); Tzigaia(3); Cyclic before oestrus induction(4); Cyclic after oestrus induction(5);

1. ábra: Ovulációs ráta vizsgálatok eredménye a szapora merinó anyáknál

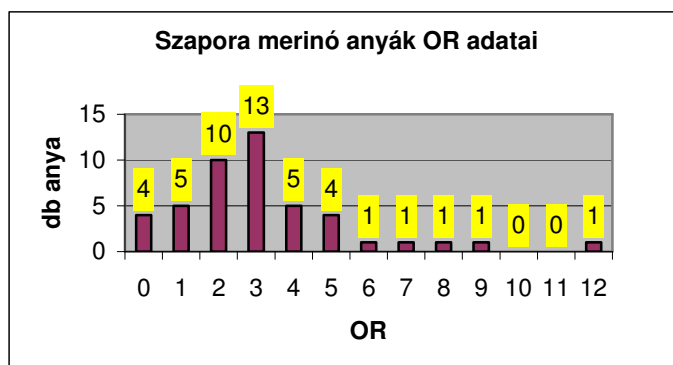


Figure 1. Ovulation rate dates of Prolific Merino ewes

2. ábra: Ovulációs ráta vizsgálatok eredménye a cigája jerkéknél

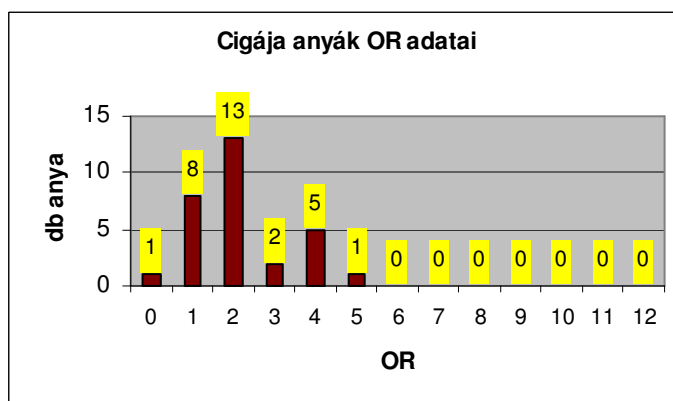


Diagram 2. Ovulation rate dates of Tzigaia ewes

A laparoszkópos vizsgálat a cigáják többségénél (70%) 1-2 sárgatest, a szapora merinók többségénél (56%) 2-3 CL kifejlődését igazolta. A cigájáknál a legmagasabb OR 5 volt (1 állatnál), a szapora merinóknál 12 (szintén 1 állatnál, mely végül 3 bárányt ellett). A szapora merinó anyáknál 43 %-ban, a cigájáknál 25 %-ban esett egybe az ovulált petesejtek és az ellett bárányok száma (egy esetben több volt a vehemszám, mint a mért OR).

Az OR értékek alapján 4 állat nem ovulált, 1 állatot nem vizsgáltunk összenövés miatt (OR=0 5db állatnál). A progeszteron vizsgálatok eredménye alapján 8 állat nem lendült ciklusba az alkalmazott gesztagén+eCG kezelés ellenére sem.

A progeszteron vizsgálatok a merinóknál 5 esetben azt mutatták, hogy nem lendült ciklusba az állat, de 4-nél ezek közül 1-3 sárgatest jelenlétét mutatta az OR mérés és 3 közülük meg is ellett. A cigájáknál a hormonanalitikai és a laparoszkópos vizsgálatok eredménye egybeesik: 28 állat ciklusban volt a kezelés után, 1 nem lendült ciklusba és az OR-ja is 0 volt.

Az 1-es táblázatban láthatóan a ciklusindukciós technika minden kezelt állatcsoportnál és mindkét évben hatékony volt, összevetve az ovulációs ráta és hormonális vizsgálatokat, az állatok 92%-ánál eredményes volt a ciklusindukciós kezelés.

Termékenyülési eredmények

Laparoszkópos mesterséges termékenyítést 2005. május 27-én és 2006. május 25-én végeztük, a természetes fedeztetésre a kosok mindkét évben május-június hónapokban voltak az anyák között. A két vizsgált évben jelentős eltérés volt a termékenyülési eredmények között, melyet a 2. táblázat mutat.

2. táblázat: A vizsgált anyajuhok termékenyülési eredményei 2005. és 2006. évben

Év(3)	Mesterséges termékenyítés(1)			Természetes fedeztetés(2)		
	Termékenyített anya (db)(4)	Leellett anya (db)(5)	*Ellési arány % (6)	Termékenyített anya (db)(4)	Leellett anya (db)(5)	* Ellési arány % (6)
2005	29	16	55	30	8	27
2006	16	4	25	9	2	22

Table 2. Fertilization rate of examined ewes in 2005, vs. 2006 years

Artificial insemination(1); Natural mating(2); Year(3); Mated ewes (nr)(4); Lamed ewes (nr)(5); Lambing rate (%) (6)

*(leellett/termékenyített anya)

*(lamed/mated ewes)



A 2006-os termékenyülési eredmények több év távlatában szokatlanul rosszak voltak. Ennek oka lehet az akkori szélsőségesen meleg időjárás. Az „origo” internetes híre szerint szokatlan légköri hullámok hatására 2006. júliusában minden eddigit túlszárnyaló folyamatossággal érkezett a forró levegő hazánkba. A hónap eleji nyolc napos kánikula is a ritka esetek közé tartozik, a hónap második felében azonban az ország nagy részén 15 napon át 30 fok felett tetőzött a hőmérséklet, ami páratlannak mondható. Ennek hatására valószínűleg az esetleg termékenyült egyedeknél sem történt meg az embrió megtapadása, vagy korai vetélés következett be.

A két vizsgált évben a tamponálás utáni első ciklusból 17 szapora merinó és 8 cigája ellett meg. A mesterségesen termékenyített anyák közé 14 nappal a termékenyítés után kost raktunk, így azok is vemhesülhettek, amelyeknél az inszemináció nem volt sikeres. Ennek hatására a második ciklusból még 3 állat vemhesült, cigájáknál a következő ciklusból szintén még 3 állat, tehát összesen a szapora merinók 42 %-a (20 db anya), a cigáják 36 %-a (11 db anya) vemhesült az ivarzás-indukció hatására. Összességében a tamponált állomány 41%-a ellett meg (75 állatból 31 db).

A nem tamponált állatok (9db) közül (2006-ban) a vizsgált 7 hét alatt június közepéig kettő lendült ciklusba, de ezek nem termékenyültek a hárembeli fedeztetés során. Két másik állat viszont termékenyült június végén (november végén ellettek), ezek valószínűleg a hormonvizsgálatok befejezése után lendültek ciklusba. Összességében tehát a nem tamponáltak közül 4 db-nak (44 %) vált ciklikussá a petefészek működésű még a nyár folyamán és 2 db, azaz 22 % ellett meg belőlük.

Genetikai vizsgálatok

Mindkét vizsgálat fajtában valamennyi genotípus variáció előfordult a két mutációra vonatkozólag (3. táblázat). A legnagyobb számban a heterozigóta egyedek fordultak elő. Az egyes fajták között nem volt statisztikailag kimutatható különbség a genotípus gyakoriságokat illetően.

3. táblázat: A vizsgált genotípusok fajtánkénti megoszlása

Genotípus(1)	Szapora merinó(2) (n=53)	Cigája(3) (n=28)
<i>RsaI</i>		
AA	12 (22,6%)	3 (10,7%)
AB	30 (56,6%)	17 (60,7%)
BB	11 (20,8)	8 (28,6%)
<i>MnII</i>		
AA	10 (19%)	4 (14,3%)
AB	27 (51%)	15 (53,6%)
BB	16 (31%)	9 (32,1%)

Table 3. Distribution of *RsaI* and *MnII* genotypes in the two examined breeds

Genotype(1); Prolific Merino(2); Tzigaiia(3);

A szapora merinó fajta esetén néztük az év hatását is, mely szintén nem mutatott szignifikáns hatást a ciklikusságra sem akkor, amikor a két fajtát külön, illetve együtt vizsgáltuk. Bár a kapott P érték közel volt a már szignifikáns hatást jelentő 0,5-höz ($P=0,0863$). Mindemellett a fajta sem volt befolyásoló tényező ($P=0,7881$)

A ciklikus és aciklikus petefészek működésű szapora merinó és cigája anyák egyes genotípus csoporton belüli %-os megoszlását a 3. ábra szemlélteti.

3. ábra: A Melatonin1a receptor gén RsaI és MnlI genotípus csoportjai és az eltérő petefészek működésű anyák csoportonkénti megoszlása (a szapora merinó és cigája anyák összesített adata alapján)

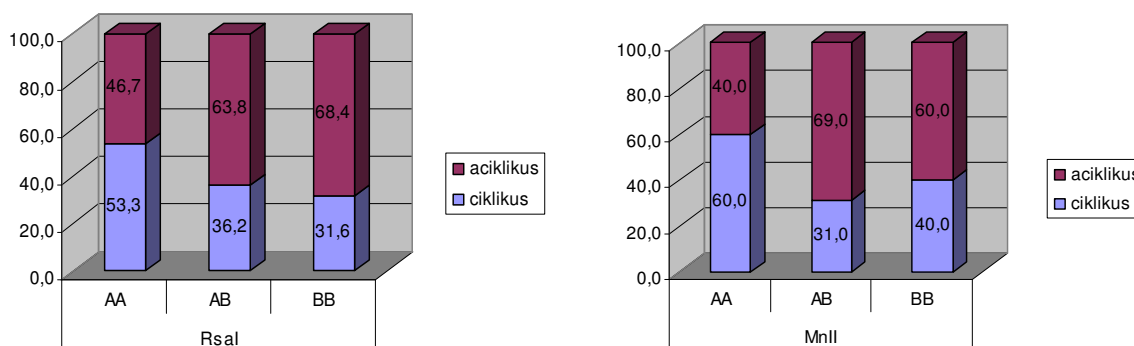


Figure 3. Distribution of the ewes with cyclic ovarian activity within each RsaI and MnlI genotype

„Proc genmod” program segítségével vizsgáltuk a genotípusok befolyásoló hatását a ciklikusságra. Az RsaI genotípus hatása közel volt a $p<0,05$ szignifikancia szinthez ($P=0,058$), de nem érte el. Az MnlI genotípus esetében a kapott P érték 0,032 volt, tehát 5%-os hibahatár mellett szignifikánsan befolyásolta az anyák ciklikusságát.

Az egyes genotípus csoportokat nézve az AA genotípusú egyedek ciklikusságban szignifikánsan különböztek az AB és BB genotípus csoporttól. Az AB és BB csoport között nem volt szignifikáns különbség.

Következtetések

Eredményeink szerint a tavaszi, tenyészszezonon kívüli időszakban a vizsgált szapora merinó és cigája fajtáknál 40% feletti a ciklikus petefészek-működést mutató egyed. Az alkalmazott ciklusindukcióra (gesztagén+PMSG kezelésre) az acikliás egyedek is jól reagálnak, a vizsgált juhok több mint 90%-ánál következett be tüszőrepedés a ciklusindukciós kezelés után. A mesterséges termékenyítés jobb eredményt hoz a természetes fedeztetésnél ebben az időszakban, ennek ellenére a vemhesülési



eredményeket sok külső tényező, főképpen takarmányozási és időjárési hatások befolyásolhatják. A vemhesülési arányok jobbak voltak a ciklusindukció alkalmazása után (41 %), mint a nem kezelt állatoknál (22%).

A tenyészszezonon kívüli vemhesülést egyéb tényezők is akadályozhatják, mint a szélsőséges időjárás vagy a nem megfelelő takarmányellátottság. További vizsgálatokban az állatok valós igényeit kielégítő energiaellátás, az energetikai státusz megítéléséhez értékes információt szolgáltatató egyes metabolikus hormonok (leptin, IGF-1) meghatározására kerülhet sor.

Hasonlóan más szerzők korábbi tapasztalataihoz úgy gondoljuk, hogy a vizsgált melatonin receptor-1 α gén két mutációja markergénként ígéretes eszközként kínálkozik ebben a két fajtában is az egész évben ciklikus petefészek-működés képességére történő szelekciós munkában. Tapasztalataink megerősítése azonban további vizsgálatokat igényel.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki a DEAMTC juh tenyésztelep dolgozóinak a kísérletek elvégzéséhez nyújtott fizikai segítségükért és a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Kar Szülészeti és Szaporodásbiológia Tanszék Endokrinológiai Laborjának (vezető: Dr. Kulcsár Margit) a hormonanalitikai vizsgálatokért. A vizsgálatok anyagi fedezetét az OMFB 01153/2004 pályázat biztosította.