

## Kiskérődzők termékenyítőanyagának vizsgálata a hűtve és mélyhűtve tárolás, illetve az ivarorientációs eljárás végrehajtása során

Németh Attila – Mihályfi Sándor – Szabados Tamás

PharmaGene-Farm Géntechnológiai Kutató, Fejlesztő és Szolgáltató Kft., Mosonmagyaróvár  
attanemeth@gmail.com

### ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataink során három biotechnikai eljárás – spermaadagok konzerválása 2-4 °C-on történő hűtéssel és mélyhűtéssel, illetve szedimentációs technológiával történő ivarorientáció – termékenyítőképességet befolyásoló hatását vizsgáltuk kosoknál és bakoknál. Összességében megállapítható, hogy a 2-4 °C-ra történő hűtéshez képest mindkét technológia rontotta a spermiumok fertilitását, amellett, hogy juhoknál az ivarorientált termékenyítőanyaggal végzett termékenyítések után kapott vemhesülési értékek a technológia tökéletesítésével jelentősen emelkedtek, illetve a mélyhűtött kosspermával végzett inszeminálások NR %-a meghaladta a szakirodalomban eddig közölt eredmények nagy részét. Érdekesség – és remélhetőleg a gyakorlatban is realizálható előny –, hogy a bakok vizsgált spermamintái mindhárom eljárásnál kedvezőbb képet mutattak, mint a kosok ugyanazon értékei.

**Kulcsszavak:** kiskérődzők, fertilitás, hűtés, mélyhűtés, ivarorientáció

### SUMMARY

The aim of this study was to examine the influence of cooling, deep-freezing and sex-orientation methods on fertility of ram and buck semen. It was pointed out that deep-freezing and sex-orientation methods had a more considerable destruction on both semen compared with the effect of cooling method. However, with the development of the sex-orientation method, the results of lambing had a significant increase in sheep. On the other hand, the NRR of the inseminations with deep-frozen ram semen exceeded most of previously published results. Being interesting, and hopefully useful benefit in practice that the analysed buck semen samples are shown more favourable results in all methods compared with the same results of rams.

**Keywords:** small ruminants, fertility, cooling, deep-freezing, sex-orientation

### BEVEZETÉS

Az általunk vizsgált kétféle – 2-4 °C-on történő és mélyhűtéses – spermakonzerválási eljárás, illetve az ivarorientációs technológia az ismert előnyeik mellett sajnos, eltérő módon és mértékben, de befolyásolják a spermiumok termékenyítőképességét, ezzel nagyban meghatározzák a módszerek gyakorlatban történő alkalmazhatóságát és elterjedését is.

Ahhoz, hogy a kiváló tenyésztékű apaállatok termékenyítőanyagát nagy területen, időbeli korlátok nélkül lehessen használni, meg kell oldani azok

konzerválását. Az egyes fajok spermasejtjeinek érzékenysége nagyon különböző az egyes konzerválási technológiákkal szemben. Sajnálatos módon a kosok, illetve kisebb mértékben a bakok ivarsejtjei is a legérzékenyebbek közé tartoznak. A kos- és baksperma mélyhűtésének technológiája a gyakorlatban nem terjedt el, mivel a mélyhűtött-felmelegített termékenyítőanyaggal történő inszeminálás után a termékenyülési eredmények erős romlást mutatnak. Így egyelőre nincs egy üzemi körülmények közt is megfelelően használható technológia az állattenyésztés kezében.

Az ivarorientált sperma előállításának, felhasználásának rendkívüli jelentősége lehet kiskérődző tenyésztésünk fejlesztésében és versenyképessé tételében. A hústermelő állományokban a hímivarú állatok nagyobb aránya kedvezőbb hústermelést eredményezhet. Specializált juhtej-termelő, de legfőképpen tejtermelő kecskeállományokban a született utódok között nagyobb arányban megjelenő nőivarú egyedek a tejtermelési tulajdonságok gyorsabb genetikai javítását, fokozott állományfejlesztést, nagyobb szelekciós nyomást tesznek lehetővé. Ily módon nagyon hasznos lehet ez az eljárás az állományváltás, illetve a specializáció gyors végrehajtása szempontjából. A tenyészállat-előállítás során fellépő igények (hím- vagy nőivar iránti kereslet) kielégítése jóval gördülékenyebben és gazdaságosabban történhet az ivarorientált sperma segítségével.

### SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

A termékenyítés sikeressége nagymértékben függ a termékenyítő anyag konzerválásának módjától (hűtés, mélyhűtés, alkalmazott hígító rendszerek) (Horváth és mtsai, 1982; Salamon és Maxwell, 1995, 2000). Bakok esetén a Cowper-féle mirigy olyan enzimet választ ki a spermaplazmába, mely koagulálja a tojássárgáját, így a tojássárgát tartalmazó hígítók használata kétségeket vet fel kecskék esetén (Roy, 1957; Iritani és Nishikawa, 1961). Mara és munkatársai (2007) három különböző hígító hatását vizsgálták a baksperma eltarthatóságára és fertilitására vonatkozóan. A fölözött tej esetén a vemhesült anyák aránya 71,4% volt, a szintetikus (TEMPOL) és a hialuronsavval kiegészített szintetikus (TEMPOL+HA) hígító esetén ez 61,4 és 48,8% volt.

A bakspermával végzett első mélyhűtések (Smith és Polge, 1950; Barker, 1957) során megállapították,

hogy a fertilitás túl alacsony volt a gyakorlati alkalmazáshoz. Azóta nagyon sok kutató foglalkozott a mélyhűtés technológiájának fejlesztésével, és számoltak be biztató eredményekről (Corteel, 1973, 1981; Ritar és mtsai, 1990; Ritar és Ball, 1991; Karatzas és mtsai, 1997). Juhoknál a vaginális és a cervikális termékenyítési technikák a mélyhűtött termékenyítő anyag használata során nem hoztak kielégítő eredményeket. A mélyhűtött sperma méh lumenébe juttatására alkalmasnak tűnő transzcervikális inszeminálás során szintén számolni kell a cervix termékenyítés szempontjából kedvezőtlen felépítésével. Halbert és mtsai (1990a, b) vizsgálataik során a nyakcsatorna hátrahúzásának módszerét alkalmazták, ezzel könnyítve meg a cervixen történő átjutást. Ez az eljárás egyrészt időigényes (Buckrell és mtsai, 1994), másrészt nagy gyakorlottságot igényel, illetve nem mellékesen állatvédelmi kétélyeket vet fel. A termékenyítő anyag a nyakcsatorna kikerülésével is a méh lumenébe juttatható. A laparotómia útján történő termékenyítéseket csak a kutatások korai szakaszában végeztek (Nehring és mtsai, 1989). Az első sikeres laparoszkópos termékenyítést Killeen és Caffery (1982) ismerteti. Magyarországon az eljárást Cseh és mtsai (1986) vezették be és alkalmazták először, majd üzemi méretű laparoszkópos inszeminálások eredményeit ismertetik Magyar és mtsai (1989), illetve Veress és mtsai (1995a, b). Az eljárás eléggé időigényes és költséges, de biztonságos. Főként nagy értékű mélyhűtött sperma használatakor javasolt. A laparoszkópos termékenyítés eredményességét számos tényező befolyásolja, mégis elmondható, hogy jelenleg a mélyhűtött kosspermával történő inszeminálás alkalmazására a legmegfelelőbb eljárás (McKalvey és mtsai, 1985; Sayre és Lewis, 1997).

Az ember már akkor gondolt az utódok nemének irányítására, amikor még a nemek öröklődésének a törvényeit sem ismerte. Az érdeklődésről feljegyzések tanúskodnak már Hippokratész (Kr. e. 460-370) korából is (Gordon, 1979; Amann, 1989).

Az ivarspecifikus termékenyítőanyag előállítását megcélzó kísérletek legnagyobb részt az X- és az Y-kromoszóma közt fennálló eltéréseken (morfológiai, sűrűségbeli, mozgásbeli, immunológiai, különböző kémhatású kezelésekre adott reakciójuk, eltérő DNS-tartalom) alapultak. Azonban az ondósejtek ivari dimorfizmusa – főképp a fejméretbeli különbségek – terén végzett kutatások között találhatunk egymásnak ellentmondó eredményeket. Ráadásul az elmúlt évek alatt kifejlesztett modern technológiák alkalmazása ilyen irányultságú kutatásokban egynéhány helyen felül is írták a régebbi tanokat (Cui, 1997; Chandler és mtsai, 1999; van Munster és mtsai, 1999; Hossain és mtsai, 2001; Nagy, 2003; Révay és mtsai, 2004; Nagy és mtsai, 2004).

A háziemlősök Y-kromoszómája mindig jóval kisebb az X-kromoszómánál, ez az eltérés okozza a hím-, illetve a nőivarú spermasejtek fizikai eltéréseit. A haszonállatok közül a két ivari kromoszóma méretbeli eltérése különösen kifejezett kecskében és

juhban (Kovács, 1984). Az erre a megfigyelésre alapozott ülepítés (szedimentáció) az a módszer, amivel talán a legtöbb kutató foglalkozott az ivarorientációs eljárások közül (Iváncsics, 1978). A szedimentációs eljárás, illetve annak alap gondolata, majd a módszer továbbfejlesztése Kampschmidt és munkatársainak (1951), illetve Bhattacharya (1958, 1962) és Bhattacharya és munkatársainak (1966) nevéhez köthető. Az 1970-es években hazai kutatók is végeztek szedimentációra alapozott ivarorientációs kísérleteket szarvasmarhánál. Iváncsics és Kovácsné Gaál (1973) 60,4%-os hímivarú, illetve 68,7%-os nőivarú arányt értek el kísérleteikben. A megkezdett kísérleteket folytatták, nagyobb egyedszámmal dolgozva (760 borjú) 61,8%-os arányt értek el nőivar esetén, hímivarnál pedig 61,6%-ot. A termékenyítőanyagok fertilitása 40 és 56% között mozgott (Iváncsics, 1978, 1979). Iváncsics (1981) egy későbbi közleményében beszámol arról, hogy a módszer széleskörű alkalmazását zavarja az a tény, hogy bikánként változóak az eredmények. Megállapítása szerint nem minden bika egyformán alkalmas arra, hogy spermájából a várt eredményt hozó ivarspecifikus spermát állítsunk elő szedimentációval.

Sarhaddi (1995) és mtsai (1996a, b, 1997) olyan, saját fejlesztésű szedimentációs módszerrel dolgoztak, amelyet könnyen be lehetett illeszteni a juh mesterséges termékenyítő állomások technológiájába. Kísérleteikben tejelő fajtákat (awassi és lacaune) használtak. A számukra fontos nőivarnál 61,2%-os arányt értek el 181 bárány átlagában, míg a kezeletlen spermával végzett kontroll termékenyítéseknél ez az érték csak 47,4% volt. Az ellési százalékok 30,43 és 54,42 között mozogtak.

Annak ellenére, hogy egyes szerzők szerint a szedimentációs eljárás károsítja legkevésbé a spermiumokat az ivarorientációs módszerek közül, a leírt eredmények alapján a szaporodásbiológiai mutatók így is elég alacsony szinten mozogtak.

A fertilitást csökkentő tényezők vizsgálatának egyik lehetséges módszere a termékenyítések előtt felhasznált, illetve az alkalmazott technológiák egyes lépéseiből származó spermaminták festése, értékelése. Azonban a különböző spermafestések, biológiai próbák eredményei alacsony korrelációt mutatnak a valós fertilitással, így a festésekből kapott eredmények gyakorlati alkalmazása nem túl perspektivikus (O' Meara és mtsai, 2008).

## SAJÁT VIZSGÁLATOK

Vizsgálatainkat a mosonmagyaróvári Biotechnikai Állomás – PharmaGene-Farm Kft. – lacaune törzsállományában, illetve egy izsáki kecsketenyészetben végeztük. Az állományok nőivarú egyedait minden év őszén, a fő tenyészszezonban a Magyaróvárott kidolgozott cerviko-uterinális technológia alkalmazásával mesterségesen termékenyítik. Juhok esetén az ivarzó kiválogatása minden nap reggel 7 órakor, vazektomizált kosokkal történt. Az ivarzó

anyakecskék kerestetése szintén a reggeli órákban zajlott, amelyet kötényes bakok végeztek. Az apaállatokat hetente háromszor ugrattuk, a műhüvely segítségével levett spermát minden esetben makro- és mikroszkopikus vizsgálatnak vetettük alá. A sperma hígítására a Biotechnikai Állomás kutatói által fajonként és eljárásonként kidolgozott hígítók szolgáltak. Az inszeminálások során Tasi-féle módosított Milovanov-katétert használtunk.

1. vizsgálat: az öt kostól származó, 1:8-1:10 arányban hígított, majd 2-4 °C-ra hűtött, folyékony termékenyítőanyagokkal napi két – délelőtti, illetve délutáni – cerviko-uterinális inszeminálást végeztünk. A termékenyített juhokra az ivarzás végéig vazektomizált kosokat helyeztünk, kecskék esetében erre nem került sor. Juhoknál a következő tényezők vizsgálatára került sor: a termékenyítőanyag kora, az első inszeminálás és a visszaivarzások után egymást követő termékenyítések sorszáma, illetve a termékenyítőkatéter penetrációja a nyakcsatornába összevetve a fogamzási eredményekkel. Kecskek esetében a technológia bevezetése jelenleg is folyik, így ennél a fajnál csak kevesebb paraméter került értékelésre, szerényebb elemszám mellett. A vizsgálatok végén kiértékeljük a termékenyítések után kapott NR, valamint ellési százalékokat.

2. vizsgálat: a mélyhűtött és felmelegített sperma előállításakor kétfázisos spermahígítást alkalmaztunk, így a frissen levett nyers spermát [I. fázis (labortechnikai okok miatt bakoknál ennek vizsgálatára nem került sor)] 1:2-1:3 arányban hígítottuk a hasonló hőmérsékletre melegített I. számú hígítóval, majd szobahőmérsékletre (II. fázis) és 2-4 °C-ra lehűtve (III. fázis) szakaszosan, 5 perces eltérésekkel hozzáadtuk a II. számú oldatot is, szintén 1:2 arányban (nyers sperma + I. számú hígítóhoz viszonyítva). Ezzel 1:5-1:6-os hígítási arányt értünk el (IV. fázis – ekvibráltatás előtt). A kísérleti folyamatot a vizsgálati anyag 1,5 órás ekvibráltatása követte (V. fázis – ekvibráltatás után). Ezután került sor a mélyhűtésre, mely két lépcsőben történt. Első lépésben a spermaadagokat -78 °C-ra hűtöttük szárazjég segítségével, majd második lépcsőben -196 °C-ra, folyékony nitrogénben. A spermaadagokat különböző hígító kombinációkban olvasztottuk fel [PBS (VI. fázis); PBS + spermaplazma (VII. fázis); PBS + vérplazma (VIII. fázis)]. Juhok esetében az inszeminálások a VII. és VIII. fázisból származó spermaadagokkal történtek az 1. vizsgálatban leírt módon, ivarzás-szinkronizálással kiegészítve [Chronogest CR 20 mg cronolone vag. spong. (Intervet); 500 NE PMSG i.m. (Werfaser)]. A kapott eredményeket NR%-ban adjuk meg, a termékenyítések után a 15-20. nap között, vazektomizált kosokkal végzett kerestetések eredményei alapján. A 2. vizsgálat során ellenőrző spermafestéseket is végeztünk. Kecskekénél a technológia bevezetés alatt áll, csak kis elemszámú kísérleti termékenyítéseket végeztünk, így eredményeink közlésénél esetükben csak a spermiumok festődéséből kapott adatokra támaszkodunk.

3. vizsgálat: az ivarorientált sperma vizsgálatával foglalkozó kísérleteinket 2005 óta folyamatosan végezzük. A technológia során a hígított sperma szobahőmérsékletre, majd 2-4 °C-ra történő hűtése után következik a szedimentáció végrehajtása. A termékenyítőanyag három frakcióra történő szétválasztását követően egy hímvarra (MA), egy nőivarra (FE) orientált és egy indifferens (IND) részt tartalmazó kémcső állt rendelkezésünkre az 1. vizsgálatban leírtak szerint végzett termékenyítések kivitelezésére. Juhoknál sor kerül a vemhesülési, illetve a spermafestési eredmények közlésére, kecskek esetén csak a spermiumok festődéséből kapott adatokra támaszkodunk.

A 2. és 3. vizsgálat során a *Jaškowski* által kifejlesztett hypoozmotikus sokk-kal kombinált eozin-nigrozin festést használtuk, amely a rutin labormunka során minden probléma nélkül használható, és egyszerűsége ellenére nagyon jó prognózisértékkel bír. Segítségével képet kapunk a különböző stádiumú termékenyítőanyagokban az élő-elhalt, illetve degenerációnak indult sejtek arányáról. A festékoldatok elkészítésénél vigyáznunk kellett arra, hogy az oldatok a spermához viszonyítva hipoozmotikusak legyenek. A hipoozmotikus sokk indukálásához 25%-os hígítóoldatot alkalmaztunk. A hipotóniás oldatot kétfelé osztottuk, az egyikhez eozin, a másikhoz nigrozin festéket adtunk 0,9 és 5,5%-os arányban. A spermiumokat öt kategóriába soroltuk festődésük alapján. Ezek a következők voltak: 1. Nem festődött, görbült farkú spermiumok; 2. Nem festődött, egyenes farkú spermiumok; 3. Festődött, egyenes farkú spermiumok; 4. Festődött, görbült farkú spermiumok; 5. Egyéb képletek. Ozmotikus sokk hatására az ép, élő spermium farka legtöbbször a mitokondriális hüvely végénél nagyon élesen visszahajlik, és a fej nem festődik (1.). Az elpusztult, illetve a farkánál már degenerálódott spermium ezt a visszahajlási reakciót már nem mutatja (2.), illetve a degeneráció fokától függően a feje festődhet (3.). A hárommértékes vizsgálatokba 5 kost és 5 bakot vontunk be, fázisonként 1-1 kenetet készítettünk, kenetenként pedig 500-500 spermiumot értékeltünk. Az adatok feldolgozásához Microsoft Excel 2007 és SPSS 13.0 for Windows programokat használtunk. Az ellési eredmények és a termékenyítő anyag kora, illetve a termékenyítések sorszáma, valamint a penetráció mértéke közötti statisztikai viszonyok kifejezésére korreláció analízist alkalmaztunk.

### **EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK, KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK**

1. vizsgálat: a kosok fertilitási értékei átlagosan 47 és 74% között mozogtak a tárolt napok számának függvényében, ez 4 nap átlagában 61%-os értéket jelentett. A hígított, 2-4 °C-ra hűtött kossperma tárolási ideje (kora) és a fertilitási százalék közötti szoros negatív összefüggésről tanúskodik. Az összes tenyészkos (n=12) eredményét figyelembe véve  $r=-0,926$  igen szoros,  $P<0,1$  szinten szignifikáns összefüggés állapítható meg négy tenyészszegen

átlagában. Azonban a 3. és 4. napos spermaadagok után kapott fertilitási értékek is még elfogadhatónak tekinthetők (1. táblázat). Kecskék esetében az első évben csak egyszeri inszeminálásra került sor, 1. napos termékenyítőanyag felhasználásával. Az 56 termékenyített és 48 ellett anya után kapott ellési arány (85,71%) kifejezetten jónak nevezhető, ráadásul ezt az értéket a technológia bevezetése során kaptuk, egy teljesen ismeretlen szaporodásbiológiai állapotú állományban. A második évben már 116 anyát termékenyítettünk (a juhoknál leírt ivarzás-szinkronizálás után), esetükben nem vizsgáltuk a hormonkezelés eredményességét, az anyákat „vakon” inszemináltuk. A következő ciklusban kapott visszaivarzási eredmények alapján az NR%=78,4. A következőkben juhoknál három tenyészszезon adatait értékeltük ki a visszaivarzások után egymást követő termékenyítések sorszáma és a fertilitás közti összefüggések, valamint az általunk használt technológiával elérhető ellési százalékok alapján (2. táblázat).

1. táblázat

**Az ellési százalékok változása a termékenyítő anyag korának függvényében juhoknál**

Termékenyítő- anyag kora (nap)(1)	Termékenyítések száma(2)	Ellések száma(3)	Ellési % (4)
1	477	356	<b>74,63</b>
2	498	289	<b>58,03</b>
3	273	130	<b>47,62</b>
4	105	50	<b>47,62</b>
Összesen(5)	1353	825	<b>60,98</b>

Table 1: Influence of preservation time of ram semen to lambing rates

Preservation time in days(1), number of inseminations(2), number of yeplings(3), lambing rate(4), total sum(5)

2. táblázat

**A termékenyítés sorszáma és az ellési százalékok közti kapcsolat juhoknál**

Évek(1)	Termékenyítések sorszáma(2)			Ellési % összesen(4)
	1.	2.	3.	
	termékenyítések száma/ellések száma=ellési % (3)			
2005/2006	143/91= 63,63%	47/25= 53,19%	19/9= 47,37%	143/125= <b>87,41%</b>
2006/2007	137/101= 73,72%	35/2= 62,86%	11/6= 54,54%	137/129= <b>94,16%</b>
2007/2008	155/108= 69,67%	45/26= 57,78%	15/8= 53,33%	155/142= <b>91,61%</b>
Összesen(5)	435/300= 68,97%	127/73= 57,48%	45/23= 51,11%	435/396= <b>91,03%</b>

Table 2: Connection between the serial number of the inseminations and the lambing rates in sheep

Years(1), serial number of the inseminations(2), number of inseminations/yeplings=lambing rate(3), total lambing rate(4), total sum(5)

Az első termékenyítésre az anyák közel 70%-a leellett, a következő két inszeminálásnál megközelítőleg 10 és 20%-kal rosszabb fogamzási eredményeket értünk el (57,5%, illetve 51,1%). Megállapítható, hogy az anyánkénti visszaivarzások számának növekedésével egyre csökken a vemhesülés esélye (r=-0,873).

Az ellési százalék és a penetráció mélysége között szoros pozitív korreláció (P<0,05) tapasztalható a vizsgált anyajuhok esetében (3. táblázat). Az ellések számának növekedésével a penetráció egyre mélyebb, illetve az egyes csoportokon belül a nagyobb mértékű penetráció magasabb ellési százalékot eredményez. Megfigyelhető, hogy azokban az esetekben, amikor a penetráció mélysége meghaladta a 3,5 cm-t, az ellési százalék mindhárom csoport esetében elérte, illetve meg is haladta a 80%-ot.

3. táblázat

**A penetráció mértéke és az ellési százalék közti korreláció juhoknál**

Penetráció (cm)(1)	Jerkék(2)		Egyszer ellett anyák(3)		Többször ellett anyák(4)	
	n	Ellési %(5)	n	Ellési %(5)	n	Ellési %(5)
< 1,01	69	47,8	10	60,0	12	16,7
1,01-1,50	81	60,5	66	50,0	35	48,6
1,51-2,00	98	79,6	76	61,8	72	63,9
2,01-2,50	65	78,5	65	72,3	84	65,5
2,51-3,00	32	84,4	48	89,6	80	56,3
3,01-3,50	7	71,4	33	81,8	42	78,6
3,51-4,00	7	83,3	13	84,6	23	82,6
4,00 <	-	-	-	-	9	66,7
<b>r</b>	<b>0,760</b>		<b>0,868</b>		<b>0,786</b>	

Table 3: Correlation between the depth of penetration and the lambing rate in sheep

Penetration(1), maiden ewes(2), primiparous ewes(3), multiparous ewes(4), lambing rate(5)

Kecskénél az első évben elvégzett vizsgálatok alapján elmondható, hogy az esetek döntő többségében sikerült a spermaadagot közvetlenül a méhbe deponálni (78,57%), míg a fennmaradó egyedeknél a cervix méh felé eső harmadába juttatni. Az első csoportnál első inszeminálásra leellett egyedek 86,36%-os aránya (44/38), illetve a második csoport 83,33%-os eredménye (12/10) szintén jónak nevezhető.

2. vizsgálat: A mélyhűtött és felmelegített, a VII. és a VIII. fázisból származó kosspermával történő termékenyítés után 57,69 (26/15) és 65,52 (29/19) NR%-ot kaptunk. Összességében 55 termékenyített egyedből 34 nem ivarzott vissza (NR%=61,82). A spermafestési eljárás eredményei szerint a bakok termékenyítőanyagának mélyhűthetősége sokkal jobb, mint a kosoké.

A legjobb eredményeket mind a kos-, mind a baksperma esetében a PBS+vérsavós visszaolvasztó folyadékkal sikerült elérnünk (4. táblázat).

3. vizsgálat: Az ivarorientált kosspermával végzett kísérleteink során a technológia tökéletesítésével sikerült a spermiumok fertilitását évről évre növelnünk. A 2005/2006-os szezonban kapott 25,73%-os ellési arány 44,44%-ra, majd 2008 tavaszán 61,30%-ra emelkedett (kontroll 63,63%, 73,72% és 69,67%). A spermafestési eljárás eredménye ebben a vizsgálatban is azt mutatta, hogy a bakspermiumok kevésbé érzékenyek az általunk használt technológiára, mint a kosspermiumok. Az 1. festődési kategóriába tartozó spermiumok – amelyektől a termékenyítést várhatjuk – százalékos aránya a különböző frakciók esetén a következőképpen alakult: 46,1/69,2 (MA); 48,3/71,9 (FE), 48,6/72,3 (IND) (kos/bak).

4. táblázat

**Spermfestési eredmények a mélyhűtés különböző fázisaiban**

Típus(1)	Festődési típusok vizsgálati fázisonkénti aránya (kos/bak) (%) (2)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1.	61,8 -	58,7 83,0	55,3 80,1	52,1 78,6	49,3 73,7	32,0 41,3	<b>35,0</b> <b>45,2</b>	<b>42,0</b> <b>51,5</b>
2.	32,2 -	34,3 11,8	35,9 13,3	36,2 14,7	37,4 20,1	26,2 20,3	<b>25,1</b> <b>20,8</b>	<b>20,2</b> <b>22,6</b>
3.	5,5 -	6,5 5,0	8,5 6,3	11,5 6,1	12,7 5,9	41,2 37,8	<b>39,3</b> <b>33,5</b>	<b>37,5</b> <b>25,3</b>
4.	0,3 -	0,2 0,2	0,2 0,2	0,1 0,3	0,4 0,1	0,3 0,2	<b>0,2</b> <b>0,1</b>	<b>0,1</b> <b>0,3</b>
5.	0,2 -	0,3 0,0	0,1 0,1	0,1 0,3	0,2 0,2	0,3 0,4	<b>0,4</b> <b>0,4</b>	<b>0,2</b> <b>0,3</b>

Table 4: Results of sperm staining according to the phases of deep-freezing

Type(1), rate of different types of stained sperm cells according to the phases of deep-freezing (ram/buck) (%) (2)

**IRODALOM**

Amann, R. P. (1989): Treatment of sperm to predetermine sex. *Theriogenology*, 31. 1. 49-60.

Barker, C. A. (1957): Some aspects of artificial insemination in swine and goats. *Proc. 10th Ann. Conv. National Assoc. Artif. Breeders*, Toronto, Canada, 127-132.

Bhattacharya, B. C. (1958): Sex control in mammals. *Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie: Organ der Reichsarbeitsgemeinschaft Tierzucht im Forschungsdienst*, 72. 250-254.

Bhattacharya, B. C. (1962): Die verschiedene Sedimentationsgeschwindigkeit der x- und y-Spermien und die Frage der willkürlichen Geschlechtsbestimmung. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie*, 166. 203-250.

Bhattacharya, B. C.-Bangham, A. D.-Cro, R. J.-Keynes, R. D.-Rowson, L. E. (1966): An attempt to predetermine the sex of calves by artificial insemination with spermatozoa separated by sedimentation. *Nature*, 211. 5051. 863.

Buckrell, B. C.-Buschbeck, C.-Gartley, C. J.-Kroetsch, T.-McCutcheon, W.-Martin, J.-Penner, W. K.-Walton, J. S. (1994): Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology*, 42. 4. 601-611.

Chandler, J. E.-Wilson, M. P.-Canal, A. M.-Steinholt-Chenevert, H. C. (1999): Bovine spermatozoal head size variation and evaluation of a separation technique based on this size. *Theriogenology*, 52. 6. 1021-1034.

Corteel, J. M. (1973): L'insemination artificielle caprine: Bases physiologiques, état actuel et perspectives d'avenir. *Word Rev. Anim. Prod.*, 9. 73-99.

Corteel, J. M. (1981): Collection, proceeding and artificial insemination of goat semen. In: *Goat Production*, Ed.: Gall, C., Academic Press, London, 171-191.

Cui, K. H. (1997): Size differences between human X and Y spermatozoa and prefertilization diagnosis. *Mol. Hum. Reprod.* 3. 1. 61-67.

Cseh S.-Bilton R. J.-Bényei B. (1986): Donor anyajuhok termékenyítése laparoszkóppal szuperovulációs kezelés után. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 41. 1. 55-57.

Gordon, H. (1979): Ancient ideas about sex differentiation. In: *Vallet, H. L.-Porter, I. H. (Eds.): Genetic mechanism of sexual development*. Academic Press, New York. 1-32.

Hossain, A. M.-Barik, S.-Kulkarni, P. M. (2001): Lack of significant morphological differences between human X and Y spermatozoa and their precursor cells (spermatids) exposed to different prehybridization treatments. *J. Androl.* 22. 1. 119-123.

Iritani, A.-Nishikawa, Y. (1961): Studies on the egg-yolk coagulating factors in goat semen: II Properties of the coagulating factor and influential conditions for coagulation. *Proc. Silver Jubilee Lab. Anim. Husbandry, Kyoto University*, 97-104.

Iváncsics J. (1978): Kísérletek az ivarspecifikus sperma előállítására és felhasználására a szarvasmarhatenyésztésben. *Kandidátusi értekezés*. Mosonmagyaróvár

Iváncsics J. (1979): Szarvasmarha ivarszabályozási kísérletek eredményei. *A Mosonmagyaróvári Mezőgazdaságtudományi Kar Közleményei*, 21. 1-8. 67-82.

Iváncsics J. (1981): Az ivarszabályozás fejlesztésének lehetőségei. *A Mosonmagyaróvári Mezőgazdaságtudományi Kar Közleményei*, 23. 1-11. 129-137.

Iváncsics J.-Kovácsné Gaál K. (1973): Vizsgálatok a szarvasmarha ivararányának befolyásolására (előzetes közlemény). *A Mosonmagyaróvári Mezőgazdaságtudományi Kar Közleményei*, 16. 2. 61-68.

Halbert, G. W.-Dobson, H.-Walton, J. S.-Buckrell, B. C. (1990a): The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology*, 33. 5. 977-992.

Halbert, G. W.-Dobson, H.-Walton, J. S.-Buckrell, B. C. (1990b): A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33. 5. 993-1010.

Horváth M.-Menger H.-Bogdan T. A. (1982): A juhok mesterséges termékenyítése, a kossperma mélyhűtése. In: *Tanulmányok a haszonállatok szaporításáról (Szerk. Becze J.) Mezőgazdasági Kiadó, Budapest*, 212-217.

Kampschmidt, R. F.-Mayer, D. T.-Herman, H. A.-Dickerson, G. E. (1951): Sedimentation of spermatozoa and settling of diluter

- solids and their effects upon survival of spermatozoa during storage. *Journal of Dairy Science* 34. 1. 21-27.
- Karatzas, G.-Karagiannidis, A.-Varsakeli, S.-Brikas, P. (1997): Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology*, 48. 6. 1049-1059.
- Killeen, I. D.-Caffery, G. J. (1982): Uterine insemination of ewes with the aid of laparoscope. *Aust. Vet. J.* 59. 95.
- Kovács A. (1984): A citogenetika alkalmazásának újabb területei („pozitív citogenetika”). In: Újabb genetikai és biotechnikai módszerek az állattenyésztésben (Szerk.: Fésüs L.) Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 112.
- Magyar K.-Kömlösi I.-Veress L. (1989): Juhok laparoszkópos intrauterin inszeminálása mélyhűtött spermával. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 8. 475-477.
- Mara, L.-Dattena, M.-Pilichi, S.-Sanna, D.-Branca, A.-Cappai, P. (2007): Effect of different diluents on goat semen fertility. *Animal Reproduction Science*, 102. 1-2. 152-157.
- McKalvey, W. A. C.-Robinson, J. J.-Aitken, R. P.-Henderson, G. (1985): The evaluation of laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology*, 24. 5. 519-535.
- Nagy Sz. (2003): Az ivarorientált sperma előállításának biológiai, fizikai és statisztikai kérdőjelei I. *Holstein Magazin*. 11. 3. 14-15.
- Nagy Sz.-Kovács A.-Révay T. (2004): Az ivarorientált sperma előállításának biológiai, fizikai és statisztikai kérdőjelei II. *Holstein Magazin*. 12. 1. 30-31.
- Nehring, H. P.-Reinhardt, P.-Fischer, P.-Peter, W.-Ehlert, F. (1989): Befruchtungsergebnisse beim Schaf nach Insemination gefrierkonservierten Spermas unter besonderer Berücksichtigung einer intrauterinen transmuralen Deponierung. *Mh. Vet. Med.* 44. 601-604.
- O' Meara, C. M.-Hanrahan, J. P.-Prathalingam, N. S.-Owen, J. S.-Donovan, A.-Fair, S.-Warda, F.-Wade, M.-Evans, A. C. O.-Lonergan, P. (2008): Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 69. 513-522.
- Révay, T.-Nagy, Sz.-Kovács, A.-Edvi, M. E.-Hidas, A.-Rens, W.-Gustavsson, I. (2004): Head area measurements of dead, live, X- and Y-bearing bovine spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 16. 7. 681-687.
- Ritar, A. J.-Ball, P. D.-O'May, P. J. (1990): Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2. 27-34.
- Ritar, A. J.-Ball, P. D. (1991): Fertility of young cashmere goats after laparoscopic insemination. *J. Agric. Sci.*, 117. 271-273.
- Roy, A. (1957): Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, 179. 318.
- Salamon, S.-Maxwell, W. M. C. (1995): Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* 38. 1-36.
- Salamon, S.-Maxwell, W. M. C. (2000): Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 18. 62. 1-3. 77-111.
- Sarhaddi, F. (1995): Evaluation of sex preselection of ovine offspring by biotechnical methods. Ph. D. Thesis. Mosonmagyaróvár
- Sarhaddi, F.-Iváncsics, J.-Gergátz, E. (1996a): Separation of ram spermatozoa into two fractions by sedimentation. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 45. 4. 341-348.
- Sarhaddi, F.-Iváncsics, J.-Gergátz, E. (1996b): Predetermination of offsprings sex-ratio by sedimentation of ram spermatozoa. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 45. 6. 575-580.
- Sarhaddi F.-Iváncsics J.-Gergátz E. (1997): Bárányok ivararányának befolyásolása szedimentált kossperma használatával. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 119. 1. 58-59.
- Sayre, B. L.-Lewis, G. S. (1997): Fertility and ovum fertilization after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxtocin-treated ewes. *Theriogenology*, 48. 2. 267-275.
- Smith, A. H.-Polge, C. (1950): Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature*, London, 166. 668-671.
- van Munster, E. B.-Stap, J.-Hoebe, R. A.-te Meerman, G. J.-Aten, J. A. (1999): Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-bearing spermatozoa: potentials and limitations. *Theriogenology*. 52. 8. 1281-1293.
- Veress L.-Bedő S.-Lovas L.-Mucsi I.-Lengyel A.-Zomborszky Z. (1995a): A pároztatás és a kosok használata. In: *Állattenyésztés I.* (Szerk.: Horn P.) Mezőgazda Kiadó, Budapest, 423.
- Veress L.-Magyar K.-Horváth V.-né-Kovács Z. (1995b): Egy juhtenyésztési program és eredményei, 1. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 44. 4. 301-305.