



Szarvassperma mélyhűtési módszereinek vizsgálata¹

¹Nagy Sz., ²Harcosfalvi Sz., ¹Kovács A., ²Zomborszky Z.

¹Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, Sejtbiológiai Osztály, Herceghalom, 2053 Gesztenyés út 1.

²Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Sertés és Kisállattenyésztési Intézet
Hal- és Társállattenyésztési Tanszék, Kaposvár, 7400 Guba Sándor u. 40.

ÖSSZEFOGLALÁS

Hazánk gím- és dámszarvas-állományának (Cervus elaphus hippelaphus, Dama dama) genetikai potenciálja világszerte elismert. Ezen kiváló genetikai állomány megőrzése a vadvédelem, a vadgazdálkodás és vadtenyésztés számára egyaránt rendkívül fontos. A kutatás célja a különböző módszerrel mélyhűtött szarvassperma vizsgálata volt. A termékenyítőanyagot elejtett bikák mellékheréiből nyertük. A visszaolvasztott sperma minőségét Kovács- Foote festési eljárással végeztük. Eredményeink szerint, mind a kétfázisú Tris-tojássárgájú, mind az egyfázisú Triladyl hígító, valamint programozható és kézi mélyhűtési eszköz alkalmas a szarvassperma fagyasztva tárolásához.

(Kulcsszavak: gímszarvas, dámszarvas, génbank, spermamélyhűtés)

ABSTRACT

Investigations on different methods of deer sperm cryopreservation

Sz. ¹Nagy, Sz. ²Harcosfalvi, A. ¹Kovács, Z. ²Zomborszky

¹Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, Sejtbiológiai Osztály, Herceghalom, H-2053 Gesztenyés út 1.

²University of Kaposvár, Faculty of Animal Science, Institute of Swine and Small Animal Breeding
Department of Fish and Pet Animal Breeding, Kaposvár, H-7400 Guba Sándor u. 40.

The genetic potential of the red deer (Cervus elaphus hippelaphus) and fallow deer (Dama dama) populations in Hungary are well known. Conserving the variability in this excellent genetic material for game preservation and breeding is one of our most important tasks. The aim of this study was to investigate different methods of deer sperm cryopreservation. Sperm samples were collected from the epididymides of shot males. The qualitative evaluation of post-thawed sperm samples performed by Kovács and Foote staining procedure. As results showed, both tris-yolk and Triladyl diluters, and both programmable and handling freezers are suitable of the deer sperm cryopreservation. Moreover, our plan is to develop a deer frozen sperm bank.

(Keywords: deer, sperm bank, sperm cryopreservation)

BEVEZETÉS

Hazánk gím- és dámszarvas-állományának genetikai potenciálja világszerte elismert. Ezen kiváló genetikai állomány változatosságának, heterozigotitásának megőrzése a vadvédelem, a vadgazdálkodás és vadtenyésztés számára egyaránt fontos feladat.

¹Az I. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencián (Sopron, 2002. november 14-17.) bemutatott poszter bővített anyaga.

Vadállományaink genetikai anyagának biotechnológiai eszközökkel való megővését szorgalmazza többek között az urbanizációs infrastruktúra rohamos fejlődése, amely óhatatlanul csökkenti a vadon élő állatok életterét, az új úthálózatok hozzájárulhatnak egyes populációk egymástól való végleges elszigetelődéséhez. Emellett a mezőgazdaság szerkezetváltása újabban szorgalmazza a vadkárók enyhítésére nagyvadaink létszámának csökkentését. A kilőtt bikák genetikai anyaga azonban megőrizhető a mellékheréből *post mortem* kinyert ondósejtek mélyhűtve tárolásával. Így lehetőség adódik a jövő számára a mai genetikai állomány hosszú távú, biztonságos megőrzésére egy hazai szarvas spermabank létrehozásával.

Magyarországon, a Kaposvári Egyetemen történtek vizsgálatok a bikák halála után gyűjtött spermiumok fagyasztásával kapcsolatban. 1991 szeptemberében gyűjtöttek mintákat vadászat során elejtett 11 bika mellékheréjéből, 2-18 órával a kilövés után. A hígított és fagyasztva tárolt spermaminták felengedését követően a sejtek 40%-a mutatott folyamatos mozgást, az életképes spermiumok száma pedig műszalmánként (0,25 ml) $8,6-26,7 \times 10^6$ között változott. Két évvel később 3 gímszarvas tehenet szinkronizálás után ezekkel a spermamintákkal inszemináltak, és a kimosott embriókat lefagyasztották. Majd újabb 2 év múlva a felolvasztott embriók közül kettőt beültettek szinkronizált tehenekbe. Az egyik tehen 1996 júniusában egy teljesen normális, életképes bikaborjúnak adott életet. Az eredmények hozzásegítettek annak kimutatásához, hogy a vadászat során lelőtt kiváló bikáktól nyert sperma nagyon hasznos lehet a genetikai anyag megőrzésében (Zomborszky és mtsai., 1999). Ebben a kísérletben az optimális tárolás feltételeinek kidolgozása érdekében elejtett bikák mellékheréből *post mortem* kinyert termékenyítő anyag tárolhatóságát különböző spermahígítási és mélyhűtési módszerekkel vizsgáltuk a szarvas fajokra korábban sikerrel adaptált fénymikroszkópos spermafestési eljárással (Nagy és mtsai., 2001).

ANYAG ÉS MÓDSZER

A spermamintákat dél-nyugat magyarországi vadászterületeken kilőtt gímszarvas és dämvad bikák mellékheréiből gyűjtöttük, az elejtéstől számított 2 és 18 órán belül.

Az első kísérletben (I.) kettő-kettő gímszarvas és dämvad bika kétfázisú, Tris-tojássárgája hígítóval kezelt, 0,25 ml-es műszalmába felszívott és programozható mélyhűtővel fagyasztott spermamintáit értékeltük. A gímszarvas spermiumok (1. és 2. számú) mintavételét szeptemberben végeztük, a minták hígításának kezdete az elejtéstől számított 17., illetve 2. óra volt, a dämvad spermamintákat (3. és 4. számú) novemberben nyertük, a hígítás kezdete az elejtéstől számított 2. óra volt (I. táblázat).

A második kísérletben (II.) négy gímszarvas bika, egyfázisú Triladyl hígítóban feldolgozott, 0,25 ml-ben műszalmába felszívott, és hungarocell dobozban, folyékony nitrogéngőzben fagyasztott termékenyítő anyagát teszteltük. A spermiumok vételét az 5. és 6. számú állatok esetében a fő bögési időszakban, szeptemberben, a 7. és 8. számú állatok esetében pedig az utóbögés időszakában, novemberben végeztük. Az elejtéstől számítva a hígítások kezdete az 5., a 18., a 17. és a 14. órára esett (I. táblázat).

1. táblázat

A spermanyerés ideje, a mélyhűtés technikai kivitelezése

Kísérlet (1)	A bika sorszáma, faja(2)	A spermanyerés ideje (hónap)(3)	A spermamin-ta hígításának kezdete (óra)(4)	A hígítás módja(5)	A mélyhűtés technikája(6)
I.	1. gímszarvas(7)	szeptember(9)	17.	Kétfázisú Tris-tojássárgája(11)	Programozható fagyasztó(12)
	2. gímszarvas	szeptember	2.		
	3. dámvad(8)	november(10)	2.		
	4. dámvad	november	2.		
II.	5. gímszarvas	szeptember	5.	Egyfázisú Triladyl(13)	Hungarocell doboz(14)
	6. gímszarvas	szeptember	18.		
	7. gímszarvas	november	17.		
	8. gímszarvas	november	14.		

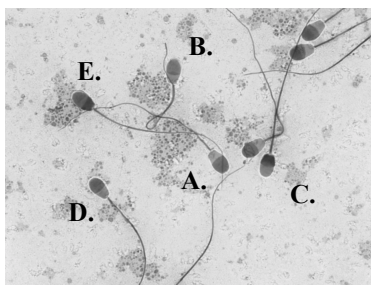
Figure 1: The time of sperm collection and the method of cryopreservation

Experiment(1), No of stag and species(2), Time of sperm collection (month)(3), Beginnig of sperm samples dilution (h)(4), Method of dilution(5), Method of cryopreservation(6), Red deer(7), Fallow deer(8), September(9), November(10), Tris-yolk diluter(11), Programable freezer(12), Triladyl diluter(13), Handling freezer(14)

Az élő, ép akroszómájú ondósejtek felolvasztás utáni arányát, mintánként 200-200 sejtet számolva, Kovács és Foote (1992) festési módszerével értékeltük Nagy és mtsai. (1999) alapján (1., 2. ábra).

1. ábra

Gímszarvas spermiumok (Kovács-Foote festés)

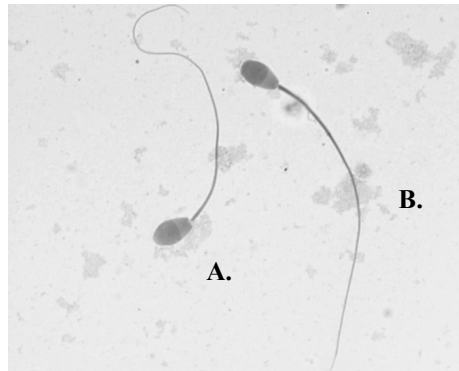


A: Ép feji és farki membrán (élő sejt), ép akroszóma (Living cell intact head and tail membrane and acrosome); B: Élő sejt, reaktált akroszóma (Living cell with acrosome); C: Elhalt sejt, hiányzó akroszóma (Dead cell with loose acrosome); D: Ép feji, sérült farki membrán (immotilis sejt), ép akroszóma (Intact head and acrosome with damaged tail); E: Sérült feji membrán (elhalt sejt), fellazult akroszóma (Dead cell with damaged head, and acrosome)

Figure 1: Red deer spermatozoa with Kovács and Foote staining procedure

2. ábra

Dámszarvas spermiumok (Kovács-Foote festés)



A: Ép feji és farki membrán (élő sejt), ép akroszóma (*Living cell intact head and tail membrane and acrosome*); B: Ép feji, sérült farki membrán (immotilis sejt), ép akroszóma (*Intact head and acrosome with damaged tail*)

Figure 2: Fallow deer spermatozoa with Kovács and Foote staining procedure

EREDMÉNY ÉS ÉRTÉKELÉS

Az ép feji és farki plazmamembránnal és ép akroszómával rendelkező ondósejtek aránya az első kísérletben a két gímszarvas bika (1. és 2. számú) esetében 18,5%, illetve 40,5%, a két däm vad bika (3. és 4. számú) esetében 36,0%, illetve 39,0% volt. A második kísérletben a négy gímszarvas bika (5.- 8. számú) esetében ez az arány 43,5%, 36,0%, 28,5%, illetve 16,8% volt (3. ábra).

3. ábra

Az élő, ép akroszómájú ondósejtek aránya az 1.-8. számú spermamintában

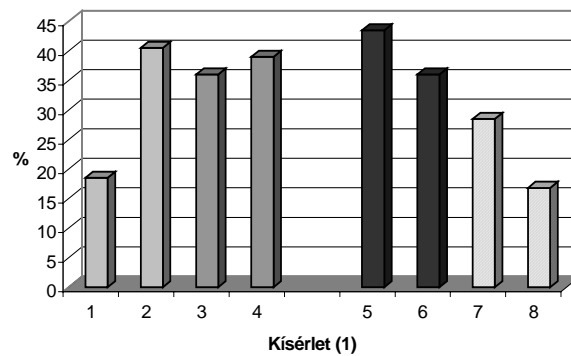


Figure 1: Ratio of living cells with intact acrosome in the sperm samples (1-8)

Experiments(1)

KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink szerint mind a kétfázisú Tris-tojássárgája (1-4. számú minta), mind az egyfázisú Triladyl hígító (5-8. számú minta) alkalmas a szarvasbikák spermájának hígítására.

Az automata készülékkel végzett, programozott fagyasztás mellett, egyszerű hungarocell dobozban nitrogéngőzben végzett mélyhűtés is alkalmazható a genetikai anyag tartósításához.

A vizsgált minták többsége megközelítette, illetve el is érte a mélyhűtött szarvasmarha bikasperma forgalmazhatóságára vonatkozó szabvány (39/1994. FM-rendelet) 40% élő ondósejtet előíró küszöbértékét.

A gyengébb, 30% alatti eredmények a kilövés és mintavétel között eltelt hosszú idővel (1. számú minta), illetve az utóbőgés szakban való mintavételezéssel (7. és 8. számú minták) magyarázhatók.

A feldolgozás/mélyhűtés optimális feltételeinek kidolgozása érdekében a kísérletek folytatását tervezzük.

IRODALOM

- 39/1994. FM-rendelet. A mesterséges termékenyítésre használt bikákra és kanokra, továbbá azok spermájára vonatkozó előírások.
- Kovács A., Foote, R.H. (1992). Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biot. Histoc.*, 67.119-124
- Nagy Sz., Házás G., Bali Papp Á., Iváncsics J., Szász F., Szász Jr.F., Kovács A., Foote R.H. (1999). Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Therio.*, 52. 1153-1159.
- Nagy Sz., Kovács A., Zubor T., Zomborszky Z., Tóth J., Horn P. (2001). Evaluation of membrane integrity of frozen/thawed deer spermatozoa. *Acta Vet. Hung.*, 49. 223-227.
- Zomborszky Z., Zubor T., Tóth J., Horn P. (1999). Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilisation of sperm frozen and subsequently thawed. *Acta Vet. Hung.*, 47. 263-270.

Levelezési cím (*corresponding author*):

Zomborszky Zoltán

Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar
7401 Kaposvár, Pf. 16.

*University of Kaposvár, Faculty of Animal Sciences
H-7401 Kaposvár, P.O.Box 16.*

Tel.: 36-82-314-155, Fax: 36-82-320-175

e-mail: zzombors@mail.atk.u-kaposvar.hu