

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 13

Issue 1

Gödöllő
2017

SPERMAVÉTEL ÉS MÉLYHÜTÉS MÓDSZERÉNEK KIDOLGOZÁSA ÜREGI NYÚL EX SITU GÉNBANK SZÁMÁRA

Debnár Viktória Johanna¹, Kerekes Andrea^{1,2}, Torda Orsolya³, Altbäcker Vilmos⁴,
Bodó Szilárd^{1,2,*}

¹Szent István Egyetem, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar, Állattenyésztés-tudományi Intézet,
2103 Gödöllő, Páter Károly út, 1.,

²Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert utca 4.,

³Eötvös Loránd Tudományegyetem, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A.,

⁴Kaposvári Egyetem, 7400 Kaposvár, Guba Sándor utca 40.

bodo.szilard@gmail.com

Received – Érkezett: 25.10.2017.

Accepted – Elfogadva: 12.04.2018.

Összefoglalás

A vizsgálat célja egy üregi nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) *ex situ* génbank létesítése számára megfelelő spermagyűjtési és mélyhűtési eljárás kidolgozása volt. A kísérletben résztvevő állatokat egyedileg, ketrecekben tartottuk. A bakokat a műhüvellyel történő spermavételre szoktattuk, kezdetben színes törpe anyákat használva fantom nőténynek. Később az állatokat átszoktattuk rex gereznából kialakított fantomra való ugrásra. Az ondó koncentrációját Makler kamrával határoztuk meg, a motilis és termékenyítőképes hímivarsejtek arányát Kovács- Foote féle festéssel értékeltük. A mélyhűtési helyszínre történő szállítás körülményeit is vizsgáltuk. A hűtve (16 °C) két órán át szállított, Weitze-Trissel 1:1 arányban hígított minták ivarsejtjeinek mozgékonyosságát CASA (Computer Assisted Semen Analysis)-val határoztuk meg. A legalább 50% motilitást mutató mintákat módosított Besenfelder- féle eljárással mélyhűtöttük. Az élő és termékenyítőképes sejtek aránya a fagyasztási károsodás hatására 27,3%-tal csökkent. A spermamélyhűtési eljárást üregi nyúlra a házinyúl fajtákhoz hasonló eredményességgel tudtuk végrehajtani.

Kulcsszavak: üregi nyúl, spermagyűjtés, mélyhűtés, *ex situ* génbank

Development of a semen collection and cryopreservation method for establishing an *ex situ* gene bank in wild rabbits

Abstract

The aim of study was to develop a reliable semen collection and cryopreservation method for gene banking in European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). The animals were kept in cages individually. The bucks were trained for ejaculation into an artificial vagina. The device is hand-held beneath a dwarf female with the open end pointed in a caudal direction or placed to a phantom prepared from fur of a rex rabbit. The concentration of semen was counted by a Makler chamber. The ratio of motile and fertile sperm cells was determined by Kovacs-Foote staining. The condition of delivery of semen samples to the place of cryopreservation was studied as well. The motility of sperm cells obtained from cooled (16 °C) and diluted samples (Weitze-Tris 1:1), delivered for 2 hours was determined by CASA (Computer Assisted Semen Analysis). Semen samples (at least 50% sperm motility) were cryopreserved using modified Besenfelder's freezing protocol. The ratio of live sperm

cells with competence of fertility were reduced with 27,3% due to cryodamage. The semen freezing technique in wild rabbit resulted same efficacy as in domestic ones.

Keywords: European wild rabbit, semen collection, cryopreservation, *ex situ* gene bank

Bevezetés

Az üregi nyulat a Természetvédelmi Világszövetség (IUCN) a veszélyeztetettség közeli kategóriába sorolja 2008-tól, mivel számuk az elmúlt évek alatt drasztikus fogyásnak indult (IUCN, 2014). Az állomány ilyen mértékű csökkenésének többek között a myxomatózis, az RHD (Rabbit Haemorrhagic Disease) vérzéses megbetegedés, az élőhelyek fokozatos eltűnése, illetve a vadászat lehet okozója. Azonban az üregi nyúl fontos szerepet játszik az ökoszisztéma alakításában, tájformálónak tartják, termékenyebbé teszi a földet ürülékhalmaival, a növényi magok szétszórásában is része van. (Altbäcker, 2003). A jelenleg megmaradt génállománnyal úgy kell gazdálkodni, hogy abból minél kevesebb vesszen el (Bodó, 2015), ami mind *ex situ* mind *in situ* fajvédelmi programok beindítását igényli. Az *ex situ* génmegőrzés számára a termékenyítőképes szaporítóanyag hosszú távú eltárolása elengedhetetlen.

Cikkünkben bemutatott kísérleteink az üregi nyúl *ex situ* fajvédelmét szolgáló módszerek fejlesztésére irányultak. A spermabank kialakítása céljára elsőként az üregi nyúl bakokat a házinyúl tenyésztés gyakorlatában alkalmazott spermavételi módszerhez kellett szoktatni, hogy a fantomra ugratott bakoktól műhüvely segítségével gyűjthessünk ondót (Brederman és mtsai, 1964; Sinkovics, 2007). A spermaminta minőségének bírálatához a szubjektív vagy digitális képalkotóeljárás (CASA) (Horváth és mtsai, 2006) segítette motilitás meghatározáson kívül fénymikroszkópos festési eljárásokat is alkalmazhatunk, amelyekkel a morfológiai rendellenességek vizsgálhatjuk (pl. Cerovsky festés), illetve komplex festési eljárást alkalmazva (pl. Kovács-Foote féle festés) meghatározhatjuk a termékenyítőképes hímivarsejtek arányát (Kovács és Foote, 1992). Gyakran a spermavétel helye nem egyezik meg a mélyhűtés helyszínével, ezért a levett ondót akár több órán keresztül is szállítani kell. Kísérleteinkben a megfelelő szállítási körülmények biztosítása érdekében vizsgáltuk meg a sperma eltarthatóságát. A megfelelő módon szállított üregi nyúl sperma mélyhűtéséhez a laboratóriumunkban házinyúlon alkalmazott spermafagyasztási eljárás adaptációját végeztük el (Besenfelder és mtsai, 2000; Polgár, 2003; Bodó és mtsai, 2012; Kerekes és mtsai, 2012; Balogh és mtsai, 2013).

Anyag és módszer

Kísérleti állatok és tartásuk

Munkánk során hat, véletlenszerűen kiválasztott 2008 és 2012 között született üregi nyúl bakot, és egy holland fajtájú törpe színes kontroll bakot, fantom anyaként a spermavételhez két holland fajtájú törpe színes anyát tartottunk házilag készített, hagyományos, egyedi fa ketrecekben, mélyalmos tartásban. Takarmányozásuk ad libitum lucernaszénával és kereskedelmi forgalomban kapható nyúltáppal történt.

A spermavétel kidolgozása, az ondó gyűjtése

A spermavételt a házinyúl tenyésztés gyakorlatában elterjedt protokoll alapján végeztük, műhüvely segítségével. Az üregi nyúl bakok az első sikeres ugratásához 9 hetes szoktatási időre volt szükség. 2015 márciusáig a bakokat fantom anyákra ugrattuk, majd egy alkalrra húzható, rex nyúl szőrből kialakított fantomra szoktattuk át az állatokat. A bakok ugrásának időtartamát másodpercekben mérve mindkét ugratási technika esetén feljegyeztük. 2014-ben 4 üregi nyúl

baktól 77 alkalommal, 18 alkalommal a kontroll baktól, 2015-ben hat baktól 190 alkalommal, a kontroll baktól pedig 32 alkalommal történt sikeres spermavétel. Rögzítettük a kinyerhető ondó mennyiségét, meghatároztuk a minták spermium koncentrációját, szubjektív, fázis kontraszt optikával segített fénymikroszkópos vizsgálattal állapítottuk meg a mozgékony sejtek arányát.

A sperma szállításának vizsgálata

A szállítási körülmények optimalizálásának céljából az ondóminták szállítást megelőző hígításának feltételezett kedvező hatását vizsgáltuk. A kinyert, átlagosan 249,48 μ l-nyi minta felét Weitze-Tris 1:1 arányú hozzáadásával hígítottuk. A 16 °C-os hűtőládában átlagosan 2 órán át történő szállítást követően a kezelt sperma minőségét összehasonlítottuk a kontroll (nem hígított) csoport minőségével. A kísérleteket a NAIK-ÁTHK-ban 6 ismétléssel végeztük, CASA rendszerrel meghatározva a kezelési csoportok mintáiban a mozgékony spermiumok arányát (%), a progresszív motilitási százalékot, a spermiumok sebességének változásait VAP (μ m/s), VCL (μ m/s), VSL (μ m/s), STR (%), LIN (%), WOB (%), ALH (μ m) és a BCF (Hz) értékeket.

Sperma mélyhűtés, felolvasztás

A spermiumok fagyasztásához a NAIK-MBK-ban módosított Besenfelder-féle mélyhűtési protokollt alkalmaztuk. A szobahőmérsékletű ondóhoz 1:2 arányban a 9 v/v% DMSO-t és 15 v/v% tojássárgáját tartalmazó Weitze-Tris alapú (M1) védőanyagot kevertünk, majd 90 perc alatt folyamatosan 5°C-ra hűtöttük a mintát, majd a sperma eredeti térfogatával megegyező térfogatú 5°C-os M2 védőanyagot (glicerin, tojássárgája, Weitze-Tris) adtunk az 5°C-os M1+ondó elegyhez. A mintákat, 0,25 ml-es műszalmába töltve 20 percig fektetett állapotban hagytuk, majd a folyékony nitrogén felszíne fölé helyeztük 4 cm-re, 5 percig. A folyékony nitrogénbe merített műszalmákat gobletekbe töltöttük és konténerben tároltuk el.

A felolvasztáshoz 38°C-os vízfürdőbe merítettük a szalmákat 30 másodpercre, majd 10 percig 37°C-on történő inkubáció után szubjektív bírálattal határoztuk meg a mozgékonyaságukat. A mintákat Kovács-Foote festéssel értékeltük (*Kútvölgyi és mtsai, 2006*), a termékenyítőképes spermiumok arányának meghatározásához (*Nagy és mtsai, 1999*).

Eredmények és értékelés

A spermavételi módszer vizsgálata során megállapítottuk az ugratásonként kinyerhető átlagos ondó mennyiséget, motilitási %-ot és a spermium koncentrációt egyedenként (*1. táblázat*). A bakok elfogadták a gereznából kialakított fantomot is, ebben az esetben az átlagos lemagzási idő közel a felére csökkent (21 \pm 9,7 s vs. 48,7 \pm 20 s).

A különböző módon szállított ondóminták minőségét CASA-val vizsgálva jelentős különbségeket találtunk. A kezelési csoportok átlagértékeit összehasonlítva a hígítva szállítás kedvező hatását figyeltük meg a motilitás ($\Delta=24,0 (\pm 5,9)$), progresszív motilitás ($\Delta= 22,2 (\pm 5,8)$), VAP ($\Delta=21,8 (\pm 4,2)$), VCL ($\Delta=51,8 (\pm 9,5)$), VSL ($\Delta=16,6 (\pm 4,2)$), STR ($\Delta=0,008 (\pm 0,03)$), ALH ($\Delta=0,8 (\pm 0,4)$), BCF ($\Delta=13,1 (\pm 2,5)$) esetén ($P<0,05$, páros t-próba).

Mélyhűtésre a kinyert ondóminták közül a legalább 50 %-os motilitással rendelkező mintákat használtuk. Az előkísérleteket követően 42 mintát mélyhűtöttünk. A kezelés hatására a mozgékony sejtek és termékenyítőképes sejtek arányában bekövetkező változást mutatja be a *2. táblázat*. A mélyhűtés során az üregi nyúl sperma motilitási %-a átlagosan 35,9 %p veszteséggel járt, a termékenyítőképes sejtek aránya átlagosan 27,3 %-kal csökkent.

1. táblázat: Spermaminták összesített adatai (2014 – 2015)

	Sikeres ondóvétel (db) ¹	Átlagos mennyiség μl (SE) ²	Átlagos koncentráció *10 ⁶ db/ml (SE) ³	Átlagos mozgó sejtek aránya % (SE) ⁴
2014	85	177,30 (\pm 10,64)	-	58,08 (\pm 3,28)
2015	222	258,05 (\pm 10,87)	372,49 (\pm 26,1)	63,91 (\pm 1,76)
Összesen ⁵	307	233,36 (\pm 8,50)	372,49 (\pm 26,1)	62,23 (\pm 1,58)

Table 1: Summarized data of semen collection (2014-2015)

¹Number of successful collections, ²Average amount μl (SE), ³Average concentration *10⁶/ml (SE), ⁴Average motility % (SE), ⁵Sum-total

2. táblázat: Mélyhűtésre kerülő spermaminták mennyisége és a mélyhűtés hatásának vizsgálata

Bak azonosító ¹	Minták száma (db) ²	Összes mennyiség (ml) ³	Átlagos mennyiség μl (SE) ⁴	Átlagos koncentráció *10 ⁶ db/ml (SE) ⁵	Fagyasztás előtt % (SE) ⁶		Felolvasztás után % (SE) ⁹	
					Mozgó sejtek aránya ⁷	Termékenyítők épes sejtek aránya ⁸	Mozgó sejtek aránya ⁷	Termékenyítők épes sejtek aránya ⁸
A/2008	9	3,8	422,78 (\pm 76,45)	605,56 (\pm 87,12)	68,33 (\pm 4,08)	58,74 (\pm 4,64)	35 (\pm 5,14)	32,01 (\pm 3,66)
P/2012	5	1,36	272,00 (\pm 52,67)	732,00 (\pm 246,06)	58 (\pm 3,74)	55,84 (\pm 6,64)	17 (\pm 5,39)	30,82 (\pm 3,98)
E/2011	7	3,31	472,86 (\pm 93,88)	517,04 (\pm 95,04)	73,57 (\pm 2,83)	63,91 (\pm 6,17)	41,43 (\pm 4,04)	35,66 (\pm 3,48)
Ö/2010	7	3,2	457,14 (\pm 38,71)	562,14 (\pm 126,52)	70,71 (\pm 3,52)	68,23 (\pm 2,95)	35 (\pm 3,27)	33,79 (\pm 4,93)
M/2009	7	1,27	181,43 (\pm 40,44)	968,57 (\pm 307,36)	74,29 (\pm 3,69)	58,3 (\pm 3,61)	48,57 (\pm 3,4)	32,52 (\pm 2,04)
G/2013	7	2,4	342,86 (\pm 106,72)	447,14 (\pm 78,21)	67,14 (\pm 2,86)	47,61 (\pm 4,43)	24,29 (\pm 2,97)	23,7 (\pm 2,67)

Table 2: Amount of semen samples used for cryopreservation and the effect of sperm freezing

¹Id of buck, ²Number of samples, ³Total amount of cryopreserved semen (ml), ⁴Average amount of a semen sample μl (SE), ⁵Average concentration *10⁶/ml (SE), ⁶Before freezing % (SE), ⁷Ratio of motile sperm cells, ⁸Ratio of fertile sperm cells, ⁹After thawing % (SE)

Következtetések és javaslatok

Kísérleteinkben sikeresen adaptáltuk a házinyúlra alkalmazott spermavételi eljárást üregi nyúlra. Jelentős különbség azonban, hogy üregi nyúl bakok esetén a sikeres spermavételhez hosszabb ideig tartó, több hetes szoktatásra van szükség. A beállított, rutinszerű fantom anyára történő ugratásról nyúlszór fantomra való átszoktatás sikeresen megvalósítható, ami állatjóléti szempontból is fontos, hiszen a fantom anyák az ugratás során sérülést szenvedhetnek, számukra a spermavételi eljárás stresszt okoz. A nyúlszór fantom használatával a fertőzési kockázat is csökkenthető.

Átlagosan 0,23 ml ondót nyerhető ki ugratásonként, ami megegyezik a szakirodalomban az üregi nyúlra vonatkozó adatokkal (0,22 ml) (Dávila és mtsai. 2003), de kevesebb a házinyúlra jellemző mennyiségnél (0,3-1,5 ml) (Szendrő 1999; Zomborszky Kovács 2000). Az általunk kidolgozott spermavételi eljárás lehetővé teszi, hogy a kinyert termékenyítőanyaggal mesterséges termékenyítést végezzünk, vagy a sperma ex situ spermabankba kerüljön eltárolásra.

A CASA eredmények alapján megállapítható, hogy az ondó hígítása kedvező hatással a termékenyítőanyag minőségének megőrzésére szempontjából. Javasolható, hogy a spermavétel után 1:1 arányban hígítsuk az ondót és 16°C-on szállítsuk a mélyhűtés helyszínére.

A mélyhűtés során bekövetkező sejtkárosodások vizsgálata alapján megállapítható, hogy az üregi nyúlra alkalmazott eljárás a házinyúlra kifejlesztett mélyhűtési módszer sikerességétől nem tér el. Az így mélyhűtött üregi nyúl sperma alkalmas lehet ex situ génmegőrzésre.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük Dr. Gábor György, Dr. Balogh Orsolya, Szabó Jánosné, Csizmadia Károly segítségét. A kutatást támogatta: *Emberi Erőforrások Minisztériuma által biztosított Kutató Kari Kiválósági Támogatás – Research Centre of Excellence - 9878/2015/FEKUT, OTKA K-109252, NAIK-MBK KFI BOD06*

Irodalomjegyzék

- Altbäcker, V. (2003): Borókás üreginyúl: Egy állati tradíció kialakulása és következményei. Magyar Tudomány, (8): 970-975.
- Balogh, L., Kerekes A., Debnár V. J., Ray K., Bodó Sz. (2013): Tej alapú hígítók alkalmazásának lehetősége nyúl sperma mélyhűtésnél, Animal welfare, etológia és tartástechnológia, 9(3): 69-72.
- Besenfelder, U., Haas, C., & Brem, C. (2000): Reproduction technology and gene transfer in rabbits. World Rabbit Science 8(1):37-59.
- Bodó, I. (2015): A háziállatok géntartalékainak megőrzése. In F. Szabó, Általános állattenyésztés. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 414-418.
- Bodó, Sz., Kerekes, A., Kriczky, N., Balogh, L., & Bősze, Zs. (2012): Nyúlsperma mélyhűtési eljárás optimalizálása. In K. Kovácsné Gaál, A magyar mezőgazdaság - lehetőségek, források, új gondolatok. Mosonmagyaróvár: Nyugat-magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar: 34. Óvári Tudományos Nap, 225-229.
- Brederman, P., Foote, R., & Yassen, A. (1964): An improved artificial vagina for collecting rabbit semen. Journal of Reproduction and Fertility, 7:401-403.

- Dávila, M., Badía, S., & Rebollar, P.* (2003): Parámetros seminales en el conejo de monte criado en cautividad. XXVIII Symposium de cunicultura. Alcaniz: Asociación española de cunicultura (ASESCU), 127-134.
- Horváth, A., Vásárhelyi, J., & Szenci, O.* (2006): A hímivarsejtek mozgása: Irodalmi összefoglaló: 2. rész. A mozgást vizsgáló módszerek fejlődése. Magyar Állatorvosok Lapja, 128(7): 437-442.
- Kerekes, A., Kriczky, N., Kása, E., Bősze, Zs., & Bodó, Sz.* (2012): Nyúlsperma mélyhűtési protokollok vizsgálata. 24. Nyúltenyésztési Tudományos Nap. Kaposvár: Kaposvári Egyetem, 47-52.
- Kovács, A., & Foote, R.* (1992): Viability an Acrosome Staining of Bull Boar and Rabbit Spermatozoa. Biotechnic Histochemistry, 67(3):119-24.
- Kútvölgyi, G., Stefler, J., & Kovács, A.* (2006): Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. Biotechnic Histochemistry, 81 (4-6):109-17.
- Nagy Sz., Házás G., Bali Papp Á., Iváncsics J., Szász F. Jr., Kovács A., Foote R.H.* (1999): Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. Theriogenology 52:1153-1159.
- Polgár, Zs., Virágh Gy., Baranyai B., Bodó Sz., Kovács A., Gócza E.* (2004): Evaluation of effect of cryopreservation on rabbit spermatozoa membranes with tripan bule-giemsa staining. Proceedings of 8th World Rabbit Science Congress 322-329.
- Sinkovics Gy.* (2007): A mesterséges termékenyítés története, A hím nemi működés. In T. Pécsi (szerk.), Házi emlősállatok mesterséges termékenyítése. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 368- 378.
- Szendró, Zs.* (1999): Nyúltenyésztés. Szaporítás, felnevelés. Budapest: Gazda Kiadó, 52-54.
- Zomborszky Kovács, M.* (2000): A szaporodás szervei és élettana. In F. Husvéth, A gazdasági állatok élettana az anatómia alapjaival. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 531-547.

Internetes hivatkozás:

- IUCN.* (2014): *Oryctolagus cuniculus*. Retrieved 09 13, 2014, from The IUCN red List of Threatened Species: <http://www.iucnredlist.org/details/41291/0>