

**Őshonos magyar juhajták ex situ in vitro génmegőrzése-
génbankban tárolt kosspermák minőség-ellenőrzése**

**Ex situ in vitro gene preservation of indigenous Hungarian sheep
breeds - quality control of ram sperm stored in a gene bank**

Készítette:

Vásárhelyi Panka Boglárka

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Állattenyésztési-tudományok Intézet

Témavezető:

Dr. Bodó Szilárd, tudományos tanácsadó

Dr. Kútvölgyi Gabriella, tudományos főmunkatárs

MATE, Kaposvári Campus, Állattenyésztési

Tudományok Intézet, Precíziós Állattenyésztési és

Állattenyésztési Biotechnika Tanszék

Gödöllő

2024

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Célkitűzések.....	4
3. Szakirodalmi áttekintés	5
3.1. A géntartalékok megőrzésének jelentősége és módszerei.....	5
3.1.1. In situ génmegőrzés	6
3.1.2. Ex situ génmegőrzés	6
3.2. Őshonos magyar juhajták	8
3.2.1. Hortobágyi racka juh (fekete, fehér változat)	8
3.2.2. Cikta juh.....	9
3.2.3. Cigája.....	9
3.3. A spermium morfológiája.....	10
3.4. Az ondó összetétele	12
3.5. Az ondó gyűjtése.....	13
3.6. Az ondó minőségét befolyásoló tényezők.....	14
3.6.1. Életkor	14
3.6.2. Fajta.....	14
3.6.3. Évszak és klimatikus viszonyok.....	15
3.6.4. Takarmányozás.....	17
3.7. A mesterséges termékenyítés módszerei.....	17
3.8. Spermaminőség értékelése.....	19
3.8.1. Mennyiségi és kémiai paraméterek	20
3.8.2. Motilitásvizsgálatok	20
3.8.3. Morfológia vizsgálatok	22
3.8.4. Fluoreszcens festési eljárás	22
3.9.5. Áramlási sejtanalízis (flow citometria).....	23
3.9.6. Membránintegritás vizsgálat	24
3.9.7. Egyéb paraméterek vizsgálata	25

4. Anyag és módszer	26
4.1. Védett őshonos és a veszélyeztetett mezőgazdasági állatfajták genetikai állományának ex situ vagy in vitro megőrzése című projekt.....	26
4.2. Ondóvétel	26
4.3. A sperma hígítása	27
4.4. A sperma fagyasztása	27
4.5. A sperma felolvasztása	27
4.6. Módosított Kovács-Foote-féle élő/elhalt és akroszóma festés.....	28
4. 7. Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) vizsgálat.....	31
4.8. Statisztikai analízis.....	33
5. Eredmények és értékelésük	34
6. Összefoglalás	42
7. Irodalomjegyzék	44
8. Köszönetnyilvánítás	48

1. Bevezetés

Az őshonos magyar haszonállatok génmegőrzése kiemelten fontos feladat. Ezeknek a fajtáknak nemcsak kulturális és történelmi jelentősége van, hanem hozzájárulnak a biológiai sokféleség megőrzéséhez és fenntartásához. Több évszázadon át alkalmazkodtak a környezeti feltételekhez, és tulajdonságaikban hordozzák az őseikre jellemző adaptációkat.

A génmegőrzés segítséget nyújt abban, hogy a gazdasági haszonállat fajok esetében az őshonos állatfajokat fenntartsuk és eredeti formájukban megőrizzük. Ezen állatfajok a magyar kulturális örökség részét képezik, a magyar agrárkultúrában, állattenyésztésben hagyományuk van. A génmegőrzés biztosítja a jövő generációk számára a fajták genetikai erőforrásait, alapot jelenthet a későbbi fajták kialakításához. Lehetőségünk van arra is, hogy a fajták genetikai tulajdonságait feltárjuk és az agrárium fenntartható fejlődése érdekében ezeket az ismereteket felhasználjuk.

A juhtenyésztés a történelem során jelentős szerepet töltött be az ember életében. A 21. században egyre inkább felértékelődik a juhok jelentősége. A juhtej kevesebb kazeint tartalmaz, mint a tehéntej, ezért kevésbé valószínű, hogy allergiát okoz. Emellett kalciumtartalma magas (183 mg/100ml), nagy mennyiségű értékes zsírsavat, konjugált linolsavat tartalmaz. A juhtejből nemcsak élelmiszer célú termékeket lehet készíteni (sajt, túró stb.), hanem kozmetikai termékeket is (szappanok, krémek). A juhhús magas fehérje tartalommal rendelkezik, emellett jelentős a vas, cink, B-vitamin tartalma.

A juhtenyésztés hozzájárul a fenntartható agrárium gyakorlatához. A juhok legeltetése segíti a talaj minőségének megőrzését, a növényi biodiverzitás fenntartását. A juhtrágya a talaj tápanyagellátásában is előnyös tulajdonságokkal bír.

Az őshonos magyar állatfajták génmegőrzésének támogatására létrehozott „Védett őshonos és a veszélyeztetett mezőgazdasági állatfajták genetikai állományának ex situ vagy in vitro megőrzése” kormányzati pályázat keretén belül 2014 őszén indult 3 éves génmegőrzési projekt a NAIK Állattenyésztési, Takarmányozási és Húsipari Kutatóintézetben a Magyar Juh- és Kecsketenyésztők Szövetségével együttműködésben (MJKSZ), melynek során őshonos magyar juhajták (hortobágyi racka, cikta, cigája, tejelő cigája) tenyészkosaitól sperma fagyasztás és spermabank létrehozása történt. A betárolt, mélyhűtött sperma, mint genetikai rezerv a jövőben alapot adhat tenyésztési eljárásoknak, illetve a veszélyeztetett fajok fenntartásának a biztosítéka.

A betárolt ondóminták jövőbeli felhasználhatósága szempontjából fontos azok minőségellenőrzése, a kosspermák intra- és interindividuális variabilitásának a meghatározása.

2. Célkitűzések

A dolgozat célja, hogy három őshonos magyar juh fajta (cigája, cikta és racka) esetében a génbankban mélyhűtve tárolt kosspermák vizsgálata alapján értékelje a felolvasztást követően az ondó minőségét. A vizsgálatok célja továbbá, hogy felmérje, a tenyész szezonon belül vett ondóminták és a szezonon kívül vett minták között milyen különbségek vannak.

1. kérdés A fajták között van-e jelentős eltérés az ondó mennyiségét (ml), koncentrációját ($10^6/\text{ml}$), összes spermiumszám/ejakulátum, tömegmozgását és szubjektív motilitást (%) tekintve? A tenyész szezon során vett ondó és a szezonon kívül vett minta között van-e szignifikáns különbség?

2. kérdés A levett ondómintákból a minták hány százalékát lehetett fagyasztani fajtánként, illetve tenyész szezonban és szezonon kívül szignifikáns eltérések voltak-e? A betárolás mértéke a génbankba hogyan alakult fajtánként és a tenyész szezont tekintve?

3. kérdés Milyen hatással van a fajta és a szezon a sperma minőségi paramétereire az egyedenként 3 különböző időpontban fagyasztott, majd felolvasztott és értékelt reprezentatív ondóminták alapján?

3. Szakirodalmi áttekintés

3.1. A géntartalékok megőrzésének jelentősége és módszerei

A génmegőrzés a genetikai erőforrások biztonságos védelmét foglalja magába. A fajok és fajták megőrzése és fenntartásának segítségével lehet megőrizni a biodiverzitást. A biodiverzitás az élővilág sokszínűségét és genetikai változatosságát jelenti. Több nemzetközi egyezmény is rögzíti, hogy a kultúrnövények és a haszonállatok genetikai tartalékait meg kell őrizni. Ilyen egyezmény a Biológiai Sokféleség Egyezmény (1995). Ennek az egyezménynek három célkitűzése van: a biológiai sokféleség megőrzése, a biológiai sokféleség komponenseinek fenntartható használata, valamint a genetikai erőforrások hasznosításából származó előnyök igazságos és méltányos elosztása, ebbe beletartozik a hozzáférhetőség, a vonatkozó technológiák megfelelő átadása és a pénzeszközök biztosítása (1995. évi LXXXI. törvény).

A génmegőrzés jelentősége mellett kulturális és szakmai érvek is szólnak. Kulturális érv, hogy sok fajta esztétikai értéket hordoz magában, a néprajztudomány szervesen kapcsolódik a régi fajtákhoz, ezzel együtt a turizmus is ki tudja ezt használni. Emellett a háziállatokat az ember szelektálta, ezért emberi munka eredményeként értékelhető. A tájvédelemben és természetvédelemben is jelentős szerepet kapnak ezek a fajták, hiszen olyan területeken lehet legeltetni, ahol más háziállat fajt nem érdemes tartani. A legeltetéssel a növényzet fejlődését, egészséges gyepterületet lehet kialakítani. Szakmai szempontból a génmegőrzés azért fontos, mert a marginális területeket lehet hasznosítani. A humán igények kielégítésére is alapanyag, a modern társadalom igényli a különleges termékeket (bio, organikus termékek). Az őshonos állatok a keresztezési rendszerekbe is beilleszthetők, ellenálló képességüket fel lehet használni más fajták kialakításában. A nemesítéskor génforrások, előnyös tulajdonságaik az új fajtákban kiütközhetnek (Bodó, 2002).

Magyarországon kiemelten fontos az őshonos állatok megőrzése. A hazai védett őshonos állatfajták genetikai fenntartásáról a Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium (FVM) (93/2008 (VII. 24.)) rendelet intézkedik. A juhok esetében ez a hortobágyi (magyar) racka, a gyimesi racka, a tejelő cigája, a cigája és a cikta (Bodó 2002, FVM rendelet ((93/2008 (VII. 24.))).

A génmegőrzésnek alapvetően két formája van: az in situ és az ex situ in vitro génmegőrzés. Az ex situ génmegőrzési módszeren belül van in vitro és in vivo génmegőrzés is.

3.1.1. In situ génmegőrzés

Magyarországi in situ juhállomány megtalálható a Hortobágyi Nemzeti Parkban, ahol a hortobágyi racka (fekete, fehér) in situ génmegőrzése folyik. a Duna-Dráva Nemzeti Parkban a cikta juh in situ tenyésztését végzik. Az in situ génmegőrzés folyamán a fajta kialakulásakor jellemző, eredeti tartási, takarmányozási és szelekciós feltételek vannak biztosítva. Ebben az esetben az ökológiai rendszerek, természetes élőhelyek védelme és a fajok életképes populációinak fenntartása természetes környezetükben történik. Ennek a génmegőrzési módszernek az a feladata, hogy megőrizze a populációt és lehetővé tegye a további evolúciós folyamatok kialakulását, alkalmazkodását a környezetéhez. A környezeti stresszre adott reakcióként segíti a szelektív és az adaptív folyamatokat. Ezeken a területeken olyan genetikai tulajdonságokat lehet megőrizni, melyeket még nem rögzítettek ex situ géntartalékokban. In situ génmegőrzési módszer a rezervátumok, nagy gazdaságok, tenyészetek létrehozása, ahol a humán hatások vagy változtatások a minimálisra csökkenthetők (Bodó, 2002).

A módszernek számos előnyös tulajdonsága van. A genetikai terheltséggel rendelkező állatok kiszűrhetők, az állomány szakmai értékelését folyamatosan és azonnal lehet értékelni. Hátránya, hogy az aránylag kistermetű populációknál a rokontenyésztés és a szelekció miatt allélvesztés, genetikai drift alakulhat ki. Ezen kívül az állományt természeti csapás, járvány, betegség károsíthatja (Bodó, 2002).

Az in situ megőrzés egy dinamikusan fejlődő folyamatnak tekinthető, amely lehetővé teszi a genetikai sokféleség fenntartását és a faj környezethez való alkalmazkodását (Managing Global Genetic Resources, 1993).

3.1.2. Ex situ génmegőrzés

Az ex situ in vivo génmegőrzési módszerben a tenyészállat nevelésében és tenyésztésében a fajta kialakulásakor jellemző eredeti tartási, takarmányozási és szelekciós feltételektől eltérő, intenzív állattartásra jellemző technológiák és művi eljárásokat alkalmaznak (97/2008 (VII.24.) FVM rendelet). Az ex situ génmegőrzésnek többféle módszere létezik. Az in vitro, a genetikai anyag mélyhűtött szaporító anyagként történő tárolásával szemben az in vivo olyan mesterségesen létrehozott területen fenntartott állomány, ahol az állat az eredeti környezetéhez hasonló, de nem azonos területen él, mint például állatkertek, farm.

Az in vitro tárolás során a szaporítóanyagot laboratóriumi körülmények között tárolják. A tárolás történhet haploid sejtekkel, (spermium, petesejt). A jelenlegi technológia lehetővé teszi a diploid sejtek, például embriók, szomatikus sejt kultúrák mélyhűtött tárolását. (Bodó, 2002).

Az ex situ eljárás előnye, hogy a géneket több száz éven keresztül lehet fenntartani úgy, hogy az eltárolt genetikai anyag nem károsodik és nincs veszteség, a megfelelő fenntartási környezetben. Nemzetközi kapcsolatokon keresztül el lehet juttatni más laboratóriumba is, ahol felolvasztva tudják hasznosítani. A módszer hátránya, hogy a technológiai feltételek nem teljesen kidolgozottak minden állatfajtára, a génbankok fenntartása költséges. A másik nagy hátránya, hogy a későbbiekben nem lehet tudni, hogy az adott fajta ellenálló lesz-e az új kórokozókkal szemben. Az ex situ eljárás a jövőben több lehetőséget kínál a génmegőrzési projektek szélesebb körű használatára. (Bodó, 2002).

3.2. Őshonos magyar juhajták

Magyarországon az Őshonos juh fajtacsoportba a következő fajták tartoznak: alföldi suta racka juh, cigája juh, cikta juh, gyimesi racka juh, hortobágyi racka (fekete és fehér változatban) juh, sárgafejű berke juh, tejelő cigája juh. Az őshonos magyar juhajták ex situ in vitro génmegőrzésének három legfontosabb fajtája a hortobágyi racka, a cikta juh és a cigája juh.

3.2.1. Hortobágyi racka juh (fekete, fehér változat)

A racka fajtakörnek hegyvidéki és alföldi változatát lehet elkülöníteni. Az alföldi vagy a hortobágyi racka jellegzetessége a „v” alakban felálló pödrött szarva, mely valószínűleg mutáció következménye, ám mint fajtajelleg fennmaradt. (1. kép) A hortobágyi racka eredetéről megoszlanak a vélemények. Hankó (1937) szerint a fajta Mezopotámiában alakulhatott ki mintegy 6000 évvel ezelőtt, majd őseinkkel együtt érkezett a Kárpát-medencébe. Ezzel ellentétben a korábban

1. kép Hortobágyi racka

(Forrás: saját fénykép)



magyar juhnek nevezett fajtaról Matolcsi (1975) azt állítja, hogy a török uralom alatt kerülhetett hazánkba. A rackának fekete és fehér színváltozatát ismerjük, a két színváltozatot egymástól függetlenül, tisztán tartják fent. A fekete és fehér egyedek párosodása tarka bárányok születését eredményezné (Gáspárdy, 2011). Gyakrabban találkozhatunk a fehér színváltozattal. Egyedülálló fajtabélyeg a „V”- alakban felálló csigás szarv, melyet mindkét ivar visel. A fej finom, közepes nagyságú, az agykoponya a szarvcsap alatt széles, de rostralisán keskenyedő formát mutat. A fülek mérete kicsi, nyugalomban a fej oldalán vízszintesen, izgalomban pedig felfelé irányulnak. A törzs szikár, a hát éles és keskeny, a lábak izmoltsága finom, de nagyon szilárd. Csontozatuk jól fejlett, a far kissé erősebb, a kosok mérete jóval nagyobb, testtömegük átlagosan 60-70 kg-os. Ezzel szemben az anyák testtömege mindössze 40-45 kg. A fekete színváltozatú egyedek gyapja fiatal korban szénfekete, mely idősebb korban őszülhet (darusodik), a gyapjú hossza 25-30 cm hosszú. A fej illetve a láb szőrzete a testhez simul, rövid, fényes fekete színű. A szarvak, körmök, illetve az ajkak színe sötét palaszürke. A fehér színváltozat gyapjúfűrtjei több mint 30 cm hosszúak sárgásbarna színűek. A pofa és a láb rövid, fényes, sárgásbarna szőrrel fedett, a gyapjú színe sárgásbarna (Dunka, 2000).

3.2.2. Cikta juh

A fajta leginkább a sváb nemzetiséghez kötődik, és hazánkba a betelepítések során érkező németajkú lakosság hozta be. Elsősorban Tolnában és Baranyában tenyésztették. A korabeli írások a fajtát német, dél-német parlagi juhnak, német birkának, tolna-baranyai sváb juhnak nevezi (Hankó, 1954). Az első pontos hazai fajtaleírás 1940-ből Schandl Józseftől-től származik, aki tolna-baranyai sváb juhnak nevezi a cikta. Schandl munkája nagyon hasonlít a Bohm által bemutatott napjainkra kihalt Zaupelschaf német parlagi fajta leírására (Baranyai és mtsai., 2017). (2. kép)

A fajtajelleg pontos leírását 2012-ben fogadta el a Magyar Juh- és Kecsketenyésztő Szövetség küldöttközgyűlése, miszerint a cikta a legkisebb méretű őshonos juh fajta. A testmagasságuk 60 cm körüli. A kosok testtömege 45-60 kg az anyáké pedig 30-45 kg között változik. A kosok általában szarváltak, de előfordulnak szarvtalan egyedek is. A csigás szarvat viselő kosoknál kíváncsi tulajdonság, hogy az első fordulat a halántéktól 1,5 cm távolságra legyen. Az anyáknál ritkább a szarvaltság előfordulása. A fej arányosan kicsi, fénylő rövid fehér színű szőrrel fedett, a szem vonaláig gyapjával benőtt, az orrhát a kosoknál domború az anyáknál egyenes. A fül vízszintesen hordott, hegyes és keskeny. A lábak a gyapjas testhez viszonyítva ösztövérek, fehér szőrrel fedettek. A törzsön a bőr pigmentmentes, vékony és rugalmas, a gyapjú színe fehér, hossza elérheti a 20 cm-t. Élénk vérmérsékletű, szilaj természetű parlagi fajta (www.mjksz.hu fajtaleírás).

2. kép Cikta juh

(Forrás: www.mjksz.hu 2023)



3.2.3. Cigája

Magyarországra a XVIII. században került be. A fajta származási helyét Brehm (1903) Kis-Ázsia, pontosabban a mai Irán, Ryder (1983) pedig Törökország területére helyezi. Hazánkban a 18. században jelent meg a fajta. Elsőként Erdélyben honosodott meg, ahol a cigája részben felváltotta a durva gyapjas curkánt. Az I. világháborút követően nyájaink nagyrésze az elcsatolt területeken maradt (Gáspárdy és mtsai., 2001). A mai Magyarország

3. kép Cigája juh

(Forrás: www.nbgk.hu 2023)



területén a racka, valamint merinó juhok mindig nagyobb számban fordultak elő, így a cigája soha nem vált vezető fajtává (Kukovics és Jávör, 2001). (3. kép)

Az anyák és kosok egyaránt lehetnek szarváltak vagy suták. A kosok szarva másfél kanyarulat csigás, míg az anyáké kicsi félhold alakú. Fejük fekete, illetve sötétbarna, fülük vízszintes állású, közepesen hosszú. Lábaik fekete szőrrel fedettek, törzsükhöz képest rövidek, azonban rendkívül erős csontozatúak és mérsékelten izmoltak. Fehér fürtösszerkezetű gyapjuk lefedi a nyakat, a fej felső részét, valamint a törzset. A fiatal állatok színe sárgásbarna, sötétbarna, homokszürke, mely a kor előre haladtával kivilágosodik (Gáspárdy és Sáfár, 2014). Nagyon jó alkalmazkodó képességű, hármasszorosítású fajta, gyapja a rackáétól finomabb. A tejelő cigája juhajtát Bács-Kiskun vármegyében tenyésztették ki. Edzett, élelmes és ellenálló fajta. A laktációs tejtermelése 100-200 kg között van. A fej középnagy, a nyak kevésbé izmolt, a mellkas lapos. A fülek lelógóak és hosszúak. Az anyák szarvatlanok, azonban a kosok szarváltak és suták is lehetnek. Jellemző a kosoknál a kosorr, a domború orrhát és homlok. A bőr pigmentált, a nyelv és a száj szürkés. A bunda fehér, fürtös, és csak a nyakat és törzset fedi be. Sok esetben fekete, szürkés, barnás szálak találhatók benne. A bárányok feketén születnek, egy idő után kifehérednek (www.mjks.hu 2023).

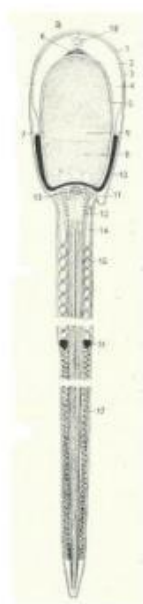
3.3. A spermium morfológiája

A spermatogenezis a spermiumok kialakulásának folyamata, amely során sejtosztódás és sejt differenciálódás történik. A spermatogenezis a herék kanyarulat csatornácskáiban játszódik le. A spermatogenezis a kosok esetében 49 nap. Az ondósejtek a mellékherében 11-14 nap alatt haladnak végig (Mucsi, 2010).

A spermiumok morfológiájukat tekintve három részre oszthatók: fej, nyak, középdarab és fark. (2. ábra)

2. ábra A spermium felépítése

(Forrás: Kovács és munkatársa., 1973)



1. sejthártya
2. citoplazma
3. a fejsapka (galea capitis) külső fala
4. ürege
5. belső fala
6. perforatórium
7. maghártya
8. sejtmag
9. aequatoriális szegment
10. poszt nukleáris sapka
11. bazális lemez
12. nyaklemez vagy gyökér
13. centriólum a belőle eredő 11 rosttal
14. mitokondrium hüvely
15. külső rostos hüvely
16. Jensen-féle zárógyűrű
17. spirális hüvely
18. apikális test

Az spermium sejtek egészét kívülről teljesen vékony sejthártya borítja. A fej elülső részén található az akroszóma, ami egy lizoszóma fajta. Az akroszóma a Golgi-készülékből alakul ki, és mint egy sapka húzódik végig a fej elülső részén. Maga az akroszóma fibrillumokból tevődik össze, amit kívülről a sejthártya, belülről a szubakroszomális rész határol. A szubakroszomális rész van összeköttetésben a maghártyával. Az akroszóma a fej közepénél végződik, ahol kénben igen gazdag (4%-os), ezért oldhatósága alacsony. A membrán rugalmasságát a cisztein (11,4%) biztosítja (Kovács és mtsai., 1973). Az akroszóma emellett tartalmaz enzimeket is (hialuronidáz, akrozin), amelyek az akroszóma reakció alatt felszabadulnak és hatásukra a petesejt burka felreped. Így tudja a spermium bejuttatni az örökítőanyagát a petesejtbe (Becze, 1983).

A spermium nyaki része a bazális lemez, a centriólumok, rostkötegek. Ezeket veszi körbe a nyaklemez és a mitokondriális hüvely. A nyaktól nem különül el teljesen a középrész, amely a belső és külső rostos hüvelyekből, valamint a mitokondriális, citoplazmahüvelyből és a sejthártyából épül fel. A sejtmag és a nyak között található a poszt nukleáris sapka. A nyak (collum) kapcsolja össze a fejet a farokkal, úgy, hogy a fejjel csuklószerű elmozdulásra képes kapcsolatot képez. Ezen a részen található a mozgás központi szerve a centriolum, ahonnan kiindul a farok tengelyfonala. Az összekötő közepdarab (pars conjunctionis) tengelyfonala körül vékony plazmahüvely, rostos hüvely és mitokondrium spirál helyezkedik el. A farok (flagellum) vázát a kilenc mikrotubuláris dupletből és két centrális mikrotubulusból álló

tengelyfonál és az őket körülvevő spirális rostos hüvely alkotja. A spermiumok a tengelyfonalak aktív összehúzódásával mozognak (Kovács, 2006; Bakonyi és mtsai., 2003).

A farok középrésze biztosítja az ondósejt mozgásához szükséges feltételeket. A farok fő részét két centrális tengelyfonál és rostos hüvely alkotja, melyet a spirális hüvely borítja, ami azonban a végdarabra már nem terjed ki. A farok legvégét két szabad filamentum alkotja, amiket citoplazma és sejthártya borít (Kovács és mtsai., 1973; Becze, 1983).

A spermatogenezis során fellépő zavarok miatt a spermiumoknál kialakulhatnak elsődleges (primer) károsodások. Primer károsodáskor a hím nemi szervekben történik zavar, ezért sokszor a fej és a középrész rendellenes. Szekunder károsodás a mellékherében történő áthaladás és tárolás során, illetve a sperma feldolgozásakor következhet be. Ekkor a spermiumok jellegzetes szekunder morfológiai hibái a levált fej és a farokrész visszahajlása. A disztális plazmacsepp magas aránya arra utal, a spermium mellékherei érési folyamat zavartságára, a járulékos nem mirigyek váladékának anomáliájára, illetve a gyakori ugratásra/spermavételre enged következtetni. Ezek a morfológiai defektusok befolyásolják a sperma fertilitását (Pécsi, 2007).

3.4. Az ondó összetétele

Az ondó az ondóplazmából és alakos elemekből áll. Az ondóplazmát a járulékos nemi mirigyek termelik. A szeminális plazmát a here, mellékhere, ondóhólyag, prosztata, ondóvezető ampulláris mirigyei, Cowper-féle mirigy és a húgycső Litter-féle mirigyei termelik. Ennek 80-90%-a víz, szárazanyagtartalma 10-20%. Ezeknek a mirigyeknek a váladékai tartalmaznak albuminokat és globulinokat, amelyek kialakítják a plazma ozmózis nyomát, a pH-értéket. A fehérjék leginkább a feji rész membránjában kötődnek, mert segítségükkel következik be a fertilizáció, és a motilitás fenntartásában is nagy szerepet kapnak (Maxwell és mtsai., 1994).

Az ondóplazma nagy mennyiségben tartalmaz aminosavakat. 50%-a glutaminsav, amelynek egy része fehérjéhez kötött, másik része húgysav, karbamid és ammónium formájában vannak jelen. A vércukorból szintetizálódik a fruktóz, amely 2-5 mg/mL mennyiségben található meg. Ezen kívül foszfatázok, glükózidáz, transzamináz, dehidrogenáz, ATP-ász, hialuronidáz segíti a spermiumok anyagcseréjét.

Vitaminok közül tartalmaz aszkorbinsavat, inozitot, riboflavint. Lipoidok közül lecitint, koleszterint, diglicerideket, triglicerideket. A szerves savakból tejsavat, acetátot, piruvátot, citrátot és szukcinátot. Kationok közül a legjelentősebbek a nátrium, kálium, kalcium és magnézium kationok. Anionok közül a legfontosabbak a citrátok, bikarbonátok, és a foszfátok (Asadpour, 2012; Kovács és mtsai., 1973).

Az alakos elemek fő tömegét a spermiumok adják. Az ondósejtek mellett tartalmazhat fehérvérsejteket (leukocitákat, limphocitákat), csírahámsejteket, magvas hámsejteket (Cseh, 2005).

A kosok egy ejakulációval 0,5-2 ml mennyiségű spermát ürítenek, amelynek 14,8%-os a szárazanyagtartalma, kémhatása 5,9-7,3 pH értéke van (Horváth, 1983).

3.5. Az ondó gyűjtése

Az sperma gyűjtése történhet ivarzó jerke, fantom, valamint elektroejakulátor használatával. A fantommal vagy jerkével történő spermagyűjtéshez műhüvelyt használnak. A műhüvely egy kettős falú cső, amelynek külső fala műanyag és lágy gumival van kibélelve. Az eszköz két fala közötti terület használat előtt 40-42 C°-os vízzel kell feltölteni, hogy biztosítsuk a megfelelő hőmérsékletet a spermavételhez. A műhüvelyhez tartozik egy gumiharang, amelynek végébe a spermagyűjtő edényt kell illeszteni, majd a töltőnyíláson keresztül feszülésig kell fújni a duplafalú csövet.

Egyes kosok nem vagy csak nagyon nehezen szoktathatók a fantomra. Ilyen esetben érdemes ivarzó jerkére ugratni a kost. A jerkét kalodába fogjuk, a felugró kos a műhüvely érintését követően egy lökéssel lemagzik. A kosok érzékenyek a spermagyűjtés körülményeire ezért lényeges, hogy az eljárást rendszerint ugyanaz az ember végezze, illetve, hogy a műhüvely meleg legyen és a fala síkos. Az ivarzó jerke jelenléte stimulálja a kos nemi működését, így könnyebben elérhető az ejakuláció (Látits és Sarlós, 2006).

Wulster-Radcliffe és mtsai.(2001) olyan spermagyűjtő eszköz használatáról számolnak be, amit az anyajuhok hüvelyébe kell helyezni. Az eljárás előnye, hogy nem szükséges a kosokat előtte betanítani.

Az elektroejakulátor speciális esetekben használatos, amikor nincs idő a kos betanítására vagy az nem hajlandó ivarzó jerkére, illetve fantomra ugrani, agresszív, vagy félénk vérmérsékletű (Haraszi és Zöldág, 1993). A sikeres spermagyűjtéshez kosok esetén többször ismételt 3-5 másodpercig tartó stimulusra van szükség (Marco és mtsai., 2005). Hátránya, hogy nem mindig alakul ki a tökéletes erekció, ezért az ondó gyakran a tasakba ürül (Haraszi és Zöldág, 1993). Marco és munkatársai 2005-ben az elektroejakulátor ondóra gyakorolt hatását vizsgálta. Kísérletükben 8 érett guirra fajtájú kostól gyűjtöttek mintákat 10 héten keresztül elektroejakulátorral és műhüvellyel ivarzó jerke jelenlétében. Összehasonlították a gyűjtött minták térfogatát, sűrűségét és fáziskontraszt mikroszkóppal 400x nagyításon meghatározták az abnormális sejtek arányát. A minták motilis sejtarányát számítógépes (CASA) motilitásvizsgáló berendezéssel elemezték. 40 alkalommal vettek mintát, ebből műhüvellyel az

összes mintavétel sikeres lett. Elektroejakulátorral 38 mintát sikerült venni a 40 alkalomból, 3 minta pedig vizelettel kontaminálódott. A két spermagyűjtési mód ezen kívül csak a spermium koncentrációban mutatott szignifikáns különbséget. Elektroejakulátorral $5,2 \times 10^6/\text{ml}$, műhüvellyel pedig $6,2 \times 10^6/\text{ml}$ volt az átlagos koncentráció ($P = 0.020$).

3.6. Az ondó minőségét befolyásoló tényezők

A kosok spermatermelését számos tényező befolyásolja, melyek közül legjelentősebb az egyed életkora, fajtája, takarmányozása valamint az évszak és klimatikus viszonyok.

3.6.1. Életkor

A kosbárányok spermatogenezise 2-3 hónapos korban kezdődik, 4-5 hónapos korban jelennek meg az első spermiumok a kanyarulat csatornáiban. A 7 hónapos, 40 testtömegnél nagyobb kosok már bevonhatóak a tenyésztésbe. A fiatalabb kosok után több az ikerelés és kevesebb a meddő anya. A fiatal kosokat nem viseli meg a fedeztetési időszak. A fiatal apától született bárányok ugyanolyan vitalitásúak és fejlettek, mint az idősebb kosok bárányai. A kosokat legkésőbb 7-8 éves korukban, de általában 5-6 éves korukban selejtezik (Mucsi, 2010).

Amíg a herék nem érik el a végleges tömegüket, alacsonyabb az ondósejtek száma és magasabb a deformált spermiumok aránya az ejakulátumban (Horváth, 1983). A fiatal kosoknál nem volt szignifikánsan magasabb a spermiumok motilitása. (Stolc és mtsai., 2009).

3.6.2. Fajta

A különböző fajták tenyészkosai között nagy különbség van, azonban meg kell jegyezni, hogy fajtákon belül, egyedenként is eltérő lehet a kosok spermatermelése. A tenyésztés során törekedni kell arra, hogy a legjobb tenyészértékkel rendelkező egyedeket vonják be a tenyésztésbe, ezzel növelve a genetikai előrehaladás intenzitását.

A merinó fajtacsoportba tartozó kosok egész évben képesek jó minőségű spermát adni (Bedő, 2009). Oláh (2010) szerint a szezonálisan ivarzó (suffolk, awassi, cigája) kosok egész évben kevesebb ondót termelnek az aszezonálisan ivarzó (barbados black belly, bábolna tetra, ile de france) fajtákkal szemben. A különbség ősszel volt a legnagyobb a sperma mennyiségére vonatkozóan.

Barbas és munkatársai (2023) a kossperma mélyhűtését vizsgálták portugál őshonos fajták esetében. Ezen belül vizsgálták az évszak és a fajta hatását a sperma minőség változásaira. Eredményeikben azt kapták, hogy a tíz portugál juh fajta spermaminősége a vizsgált fajtákban hasonlóságot mutattak és a szezonális hatást tekintve voltak jelentősebb eltérések.

Vozaf és munkatársai (2022) három szlovák juhajtát hasonlítottak össze a mélyhűtött ondó minőségi paramétereinek segítségével. Megállapították, hogy nem volt szignifikáns különbség a vizsgált fajták között a mélyhűtött spermiumok motilitásában, életképességében, morfológiai tulajdonságaiban és a termékenyítő képességében. Szignifikáns különbségeket találtak az akroszóma állapotában.

Abdel-Rahman és munkatársai (2000) a sperma minőségét és az ondó ásványi anyag összetétele közötti kapcsolatot vizsgálták két őshonos (najdi és naemi), merinó, szomáliai és szudáni juhajták esetében. Az eredményeik alapján a szomáliai és a szudáni fajták esetében volt a legalacsonyabb a spermiumkoncentráció és az élő sejtek százalékos aránya. Ugyanennél a két fajtánál mérték a legnagyobb tömegmozgást, valamint a legnagyobb mennyiségben itt találtak a nátrium-kloridot és szervetlen foszfor koncentrációt az ondóban.

3.6.3. Évszak és klimatikus viszonyok

A szezonális a spermaminőség mellett a spermatermelés mennyiségét is nagy mértékben befolyásolja. A luteinizáló hormon (LH) mennyisége a kosok esetében évszakonként változik. Februártól júniusig csökken a mennyisége, majd szeptembertől decemberig növekszik. Az a tesztoszteron növekedését okozza.

A kosok spermatermelését a napos órák száma, a hőmérséklet és a páratartalom is befolyásolja. A mérsékelt égövön az ősszel gyűjtött sperma fagyaszthatósága jobb bármely más évszakban gyűjtött spermától (Ibrahim, 1997). A mérsékelt éghajlaton tenyésztett juhok erősen szezonálisnak tekinthető tenyésztési tulajdonsággal rendelkeznek. Ezt a jelenséget a fényperiódusok és a nappalok hosszának változása befolyásolja. Azonban számos más tényező hatással van rá, mint például a hőmérséklet, a táplálkozás az ellési idő, laktáció hossza. (Sarlós és mtsai., 2013).

Sarlós és munkatársai (2012) vizsgálták a kosok herezacskó kerületének, a vérplazma tesztoszteron koncentrációjának szezonális változásait valamint az ejakulátum és spermiumok jellemzőit fekete racka kosoknál egy éven keresztül. A vizsgált paraméterek szezonális átlagai között több esetben szignifikáns eltéréseket tapasztaltak. A herezacskó kerületének változását tekintve szeptemberben mérték a legmagasabb átlagértéket (31,92 cm). Ez 44,7%-al haladta meg a januári legalacsonyabb értéket, ami 22,08 cm volt. Ezért azt a következtetést vonták le, hogy az évszak jelentősen befolyásolja a herék méreteit. Továbbá szignifikáns különbséget találtak a herezacskó kerülete és a nap hossza, valamint a herezacskó kerülete és a havi átlaghőmérséklet között. A vérplazma tesztoszteron szintje télen volt a legalacsonyabb, és ősszel a legmagasabb. Az ejakulátum mennyisége tavasztól ($0,52 \pm 0,03$ ml) ősziig ($0,88 \pm 0,03$

ml) növekedett. A legalacsonyabb spermiumkoncentrációt ($4,92 \pm 0,13 \times 10^9$ /ml) télen, a legmagasabbat nyáron ($6,56 \pm 0,21 \times 10^9$ /ml) mérték. Az ejakulátumonkénti összes spermiumszám tavasszal volt a legalacsonyabb ($3,15 \pm 0,23 \times 10^9$ /ml), a legmagasabb pedig ősszel ($5,22 \pm 0,45 \times 10^9$ /ml). A spermiumok motilitása februárban alacsony szinten ($4,42 \pm 0,20$) volt, ezt követően a nyári hónapokban volt a legmagasabb értékek, június-augusztusban hasonló havi átlagokkal. Az abnormális spermiumok aránya télen volt a legmagasabb ($18,48 \pm 3,23\%$) és a legalacsonyabb ősszel ($7,95 \pm 1,58\%$). Februárban pedig szignifikánsan magasabb volt, mint az év többi hónapjában ($22,17 \pm 3,23\%$). A legkisebb számú deformált spermiumot októberben figyelték meg ($6,15 \pm 0,72\%$) (Sarlós és mtsai., 2012).

Az évszak és a friss ejakulátum tömegmozgása, illetve az évszak és a friss ejakulátum térfogata és sűrűsége között szignifikáns összefüggés ($P \leq 0,01$) van. Az ondó mennyisége minél nagyobb, annál sűrűbb a minta (Oláh, 2010).

Haraszi (1982) szerint a hím állatok párzási ösztöne „kisebb évszakos ingadozásoktól” eltekintve állandó. Mickelsen és mtsai. (1981) lincoln, columbia, polypay és suffolk fajtákon vizsgálták az évszak hatását. A normális morfológiájú sejtek aránya októberben volt a legmagasabb (92,8%), februárban pedig a legalacsonyabb (57,5%).

A spermatogenezist serkenti a csökkenő nappali megvilágítás. Ezzel együtt növekszik az egyed tesztoszteron szintje is. A here mérete is változik, ugyanis a magas tesztoszteron szint miatt nő a tömege. Ahogyan növekszik a nappali órák száma, csökken a here mérete is és a spermatogenezis intenzitása is csökken (Aller és mtsai., 2012).

A világos órák száma mellett másik befolyásoló tényező a hőmérséklet. Az alacsonyabb hőmérséklet kedvezőbben hat a spermaminőségre, mint a 34 Celsiusfok feletti hőmérséklet. A nyári időszakban jelentősen csökken az ejakulátum térfogata, a spermiumszám, romlik a motilitás aránya és nő a deformált spermiumok száma is (Marai és mtsai., 2007).

Ömür és munkatársa (2014) az antioxidánsok hatását vizsgálták a merinó kossperma mélyhűtésére a tenyész szezonban és a szezonon kívül. Azt az eredményt kapták, hogy a tenyész szezonban gyűjtött minták motilitása és morfológiai tulajdonságai szignifikánsan jobb volt, mint a szezonon kívül gyűjtött minták esetében.

Dufour és munkatársai (1984) suffolki, dorper és leicester kosok szezonális különbségeit vizsgálták a herék körmérete, a tesztoszteron koncentrációja és a spermaminőség alapján. Azt az eredményt mutatták ki, hogy minden vizsgált paraméter szignifikánsan változott évszaktól függően: a legalacsonyabb eredményeket tavasszal a legmagasabb eredményeket ősszel mérték. Az ondó mennyisége, motilitása és az élő spermiumok százalékos aránya októberben és

novemberben volt a legmagasabb, áprilisban és májusban a legalacsonyabb. A fajtákon belül a kosok szignifikánsan különböztek a vizsgált ondójellemzők tekintetében.

3.6.4. Takarmányozás

Az elhízással a kosok libidója gyengül, endokrin működésükben zavar léphet fel (Horváth, 1983). A túltáplálás ártalmasabb, mint a kissé szűkösebb takarmányozás. Schwalbach és mtsai. (2004) az alacsony és magas energia tartalmú takarmányok hatását vizsgálták dorper kosokon. Kísérletükben véletlenszerűen két csoportra osztottak 24 közel egykorú kost. Az A csoport alacsonyabb energiájú (6.52 MJ ME/kg DM), a B csoport magasabb energia tartalmú (9.39 MJ ME/kg DM) takarmányt kapott 127 napon keresztül. A takarmányozási periódus lejárta után az összes állattól műhüvellyel spermát vettek. A két csoport spermaminőségében nem találtak szignifikáns különbséget. A kosok a tenyésztés előtt 2 hónappal gyenge kondícióban vannak, majd takarmánynöveléssel lehet javítani a szezon elejére az ivariműködésüket.

A spermatermelés nem növeli a hímek energiaszükségleteit és fehérjeszükségleteit. A fedeztetés alatt 55%-al ajánlott emelni a fehérje adagot. Ez azért szükséges, mert az ondónak magas a fehérjetartalma valamint az endokrin mirigyek váladékának szintetizálása miatt is. Az ásványi anyagok közül kiemelkedő jelentőségűek a cink, a foszfor, a kobalt, a mangán, a réz és a vas. A cink különösen fontos ásványi anyag a spermatogenezis folyamatában és a magas tesztoszteronszint is növeli a cinkfelvételt (Horváth, 1983).

A szelénhiány jelentős problémákat tud okozni a spermaminőségben, a motilitásban. A szelén a peroxidáz enzim működéséhez szükséges. A peroxidáz enzim a membránfelépítésben vesz részt. Ha nincs megfelelő mennyiségű szelén, akkor a spermiumok membránja sérülékeny lesz, csökken a termékenyítőképesség. Magyarországon alacsony a legelők szeléntartalma, nem fedezi a kérődzők napi 0,1-0,3 ppm szelénbevitel mennyiségét. Ezért a kosoknak szelénes nyalósót szoktak javasolni (Jávör és mtsai., 2006).

3.7. A mesterséges termékenyítés módszerei

A mesterséges termékenyítés terjedésében nagy áttörést jelentett Ivanoff orosz kutató munkássága. Az ő nevéhez fűződik az első sikeres szarvasmarha és juh inszeminálás, valamint a spermiumok kinyerésének, kezelésének, tárolásának pontos kidolgozása. Az 1950-es évektől a hazai juhtenyésztésben is nagy szerepet kapott az inszeminálás. Kezdetben az ejakulátumot helyben termelték, majd létrehozták az első spermatermelő állomásokat. 1971-es adatok alapján Hajdú-Bihar megyei termelőszövetkezetek juh állományainak 86%-át művi úton

termékenyítették. A 80-as években az eljárás hanyatlani kezdett a juhágazatban, mely a rendszerváltással felgyorsult. Jelenleg az országban 20-25 juhászatban végeznek rutinszerűen inszeminálást (Szabados, 2007).

A juhok mesterséges termékenyítése elvégezhető helyben vett friss, hígítatlan, illetve hígított testhőmérsékletű és hűtött spermával, valamint mesterséges termékenyítő állomásról származó 2-4 C°-ra hűtött folyékony vagy mélyhűtött spermával. A termékenyítő anyag bejuttatása szerint megkülönböztetünk: vaginális, cervikális, cerviko-uterinális, transzcervikális, uterinális inszeminálást (Szabados, 2007; Anel és mtsai., 2005).

A legáltalánosabb eljárás a vaginális termékenyítés ugyanis a jerke nyakcsatornájának anatómiája nehézséget jelent a termékenyítés szempontjából, viszont ezzel az eljárással koránt sem lehet olyan eredményeket elérni, mint az uterinálissal vagy transzcervikális eljárással. A nyakcsatorna belsejében 4-5 tölcsér alakot képző redő emelkedik ki. Az ezen a redők által képzett vakzsákok, illetve a szűk nyakcsatorna megnehezíti az inszemináló katéter bejuttatását az uterusba. A cervikális termékenyítés során az ondót egy speciális katéterrel a nyakcsatornába vezetjük. A legeredményesebb és egyben a legkomplikáltabb módszer az uterinális termékenyítés. A méhtestbe eljuthatunk a hasfalon keresztül laparoszkoppal, illetve a cervixen keresztül egy erre kifejlesztett katéterrel (transzcervikális) termékenyítés (Halbert és mtsai., 1990). Halbert és mtsai. (1990) transzcervikális termékenyítéssel 87%-os penetrációt értek el. Buckrell és mtsai. (1994) 2060 anyajuh esetében végeztek transzcervikális termékenyítést 87,8%-os sikerességgel. Kutatásaikból arra is következtethetünk, hogy a méhbe történő behatolás nagyban függ az inszeminálást végző személy gyakorlatától. Az első 500 állat inszeminálása során 76,3%-ban tudták a katétert méhtestbe vezetni, ezzel szemben az utolsó 500 jerke katéterezése 97,9%-ban volt sikeres. Laparoszkópos eljárás esetén a hasfalon keresztül juthatunk be a méhtestbe.

Az asszisztált reprodukciós technikáknak egyre nagyobb jelentőségük van a juhtenyésztésben. A mélyhűtött ondót a legsikeresebben a laparoszkópos termékenyítési módszerrel bejuttatni. A transzcervikális termékenyítés esetében (ahol a katéter a méhnyakon van átvezetve és így juttatják a spermiumokat a méh üregébe), ez a módszer nem terjedte el a gyakorlatban. Ugyanis a juhok nyakcsatornája körülbelül átjárhatatlan a katéter számára (Bagi és mtsai., 2023).

Az 1. táblázatban összegyűjtött nemzetközi publikációk alapján jól látható, hogy az egyes eljárások nagyon különböző eredményeket mutatnak (Kukovics és mtsai., 2011).

1. táblázat Nemzetközi publikációk alapján összegyűjtött termékenyítési eljárások eredményei

(Forrás: Kukovics és mtsai., 2011)

Módszer	menyiség (ml)	koncentráció $10^6 \times$ spermaszám/ml	Sperma típusa	Vemhesülési arány (%)	Hivatkozás
vaginális	0,25	1600	hűtött	31,25	Anel és mtsai., 2005
cervikális	0,2	400	fagyasztott	42	King és mtsai., 2004
cervikális	0,25	800	fagyasztott	46	Donovan és mtsai., 2004
cervikális	0,5	190	fagyasztott	14,4	Molina és mtsai., 1994
transzcervikális	0,2	1000	friss	66,6	Meghan és mtsai., 2002
transzcevikális	0,25	200	friss	76	Donovan és mtsai., 2004
transzcervikális	0,3	250-300	fagyasztott	66,7	Takenaka és mtsai., 1985
laparoszkópos	0,5	40	fagyasztott	52,4	Molina és mtsai., 1994
laparoszkópos	0,25	100	fagyasztott	44,89	Anel és mtsai., 2005
laparoszkópos	0,05	400	fagyasztott	69	King at al., 2004
laparoszkópos	0,3	250-300	fagyasztott	80	Takenaka és mtsai., 1985

3.8. Spermaminőség értékelése

A spermaminőség értékelése során a kosok termékenyítőképességének potenciálját lehet meghatározni. Az egyes vizsgálatok segítségével a spermaminőséget különböző paraméterek szerint lehet jellemezni. A spermiumvizsgálat során az ejakulátum és a sejtek szintjén történik vizsgálat.

Az ejakulátumot több szempontból lehet elemezni: mennyiség, szín, szag, viszkozitás, pH, koncentráció, spermiumok motilitása, élő/elhalt sejtek aránya. A spermiumsejtek esetében motilitás vizsgálatot, morfológiai vizsgálatot valamint membránintegritás vizsgálatot végeztem el a munkám során.

3.8.1. Mennyiségi és kémiai paraméterek

Az ejakulátumot szabad szemmel vizsgálva lehet meghatározni a minta mennyiségét, színét, szagát. A minta kémhatása digitális pH-mérővel mérhető.

Az ejakulátum vizsgálatakor az egyik legfontosabb paraméter, amit meg kell mérni a spermiumok koncentrációja. Ez megmutatja, hogy egységnyi térfogatban mennyi spermiumsejt található a mintában (millió sejt/mL). A koncentrációt vagy fotométer vagy sejtszámláló kamra (Bürker-kamra, Makler-kamra) segítségével határozzuk meg.

3.8.2. Motilitásvizsgálatok

A spermium vizsgálatánál az egyik legfontosabb paraméter a motilitás vizsgálat. A motilitás vizsgálata jól tükrözi a hímivarsejtek életképességét, azonban a jó mozgás nem feltétlen jár jó termékenyítő képességgel. A gyenge mozgás viszont mindig gyenge fertilitással jár (Horváth és mtsai., 2006; Zhang és mtsai., 1998). A hagyományos (szubjektív) motilitás vizsgálatokat fázis-kontraszt mikroszkóppal gyorsan el lehet végezni. Hátránya, hogy a vizsgálat meglehetősen szubjektív (Jequier és Ukombe, 1983).

A számítógépes technika fejlődése objektívebb motilitás vizsgálatokra ad lehetőséget. Napjainkban a legelterjedtebb számítógépes spermiumvizsgáló berendezés a CASA (Computer-Assisted Semen Analyzer). A CASA-rendszerekkel nem csak a mozgó sejtek arányát, hanem azok kinetikai és kinematika tulajdonságát is meg lehet határozni (Polichronopoulos és mtsai., 2005). Azonban problémát jelent a mérések szempontjából, hogy a gép nem mindig tud különbséget tenni a nem mozgó sejtek és mintában lévő egyéb szennyeződések között.

A CASA rendszerben a mintának 50-60 millió/ml-es sejtkoncentrációban kell lennie, hogy a rendszer értékelni tudja.

Kétféle CASA berendezés van forgalomban: az egyik fajta azonnal, valós időben értékeli ki a mintát, a másik fajta utólag értékeli ki a rögzített felvételt. A rendszer képes arra, hogy többször, különböző adatokat vegyen fel, és ezeket az adatokat, információkat tárolja, és később összehasonlítsa (Horváth, 2006).

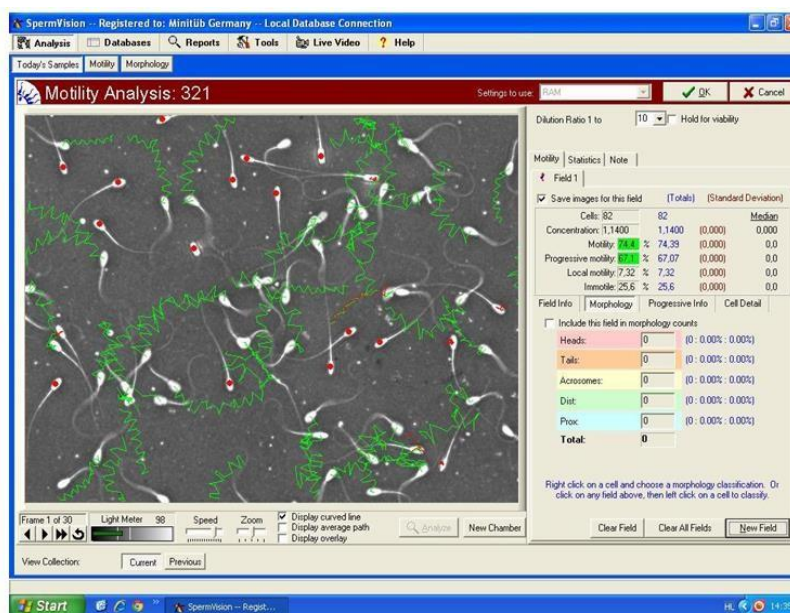
A CASA képes a spermiumok mozgási tulajdonságait objektíven értékelni, ezzel kiküszöbölhető a szubjektív mérés hiba. A számítógépes spermavizsgáló optikai és szoftveres részből épül fel. Képes analízálni a minta koncentrációját, az egyes spermiumsejtek mozgását,

a mozgó/nem mozgó sejtek arányát, az előrehaladó mozgást végző spermiumok arányát, a mozgás a minőségét, sebességét, útvonalát.

Jelenleg 12 féle szoftveres CASA rendszer létezik az állati eredetű spermák vizsgálatához (Nagy, 2001)). A rendszer megnyitása után ki kell tölteni a szükséges paramétereket (állatfaj, fajta, tulajdonos, egyéni azonosító, hígítás mértéke). Ezt a felületet a 3. ábra szemlélteti.

3. ábra A CASA rendszer munkafelülete

(Forrás: Kútvölgyi Gabriella fotója, engedéllyel 2015)



A 2. táblázat mutatja be, hogy a különböző állatfajok spermiumainak között milyen méretbeli különbségek vannak.

2. táblázat A különböző állatfajok spermiumsejtjei közötti méretbeli különbségek

(Forrás: Horváth, 2006)

Faj	Teljes hossz (μm)	Fej hosszúsága/szélessége (μm)	Középdarab hosszúsága (μm)	Fődarab hosszúsága (μm)	Végdarab hosszúsága (μm)
Ló	60-65	6-7/3,5-4	10	40	4-5
Sertés	45,5-48,5	7,5/3,3-4,1	10,7	26,5	2,5
Szarvasmarha	68-80	8-9/4	-	60-71	-
Juh	70	7,8/8,5	-	61,5-62,2	-

A rendszer a mérés befejeztével elkészíti a minta adatlapját, amely tartalmazza az adatokat, mért értékeket, fényképet és az állat információit. Az adatlapot és a rajta szereplő paraméterek magyarázatát az Anyag és módszer fejezetben mutatom be részletesen.

3.8.3. Morfológia vizsgálatok

A hímivarsejtek morfológiai vizsgálata során a normálistól eltérő sejtek arányát határozzuk meg (Oláh, 2010). Az ejakulátumában 10-20% elhalt, 3-15% kóros, deformált és 2-8% plazmacseppes sejt még egészségesnek számít (Horváth, 1983).

A morfológiai vizsgálatok egyik eszköze a fénymikroszkóp. A vizsgálat során festési eljárások segítségével elemezhető a spermiumok alakja, a fej középrész és farok defektusok aránya. Ilyen festési eljárás például az eozinos festés. A Kovács-Foote-festési eljárás alkalmas a morfológiai elemzés mellett a sejt membránintegritás vizsgálatára is (Nagy, 2001).

Ha rendelkezésre áll fáziskontraszt mikroszkóp, akkor festési eljárás nélkül is lehetőség van morfológiai bírálatra. A fáziskontraszt mikroszkóp fáziseltéréseket kontrasztkülönbségekké alakítja, amit látni lehet. A különböző optikai rendszerek segítségével megfelelő nagyításon, láthatóak a spermiumok morfológiai tulajdonságai.

Az egyes rendellenességek meghatározásához (például kráter effektus) a differenciált-interferencia-kontraszt mikroszkóp (DIC) szükséges. Ez viszonylag költséges vizsgálati módszer, azonban gyors és egyszerű. A vizsgálat során az akroszóma állapota is felmérhető folyékony közegben, fedőlemez alatt (Nagy, 2001).

Viszonylag új, objektív vizsgálati módszer a Automatized Sperm Morphology Analyzer (ASMA). Ez a készülék a spermiumok fejének szélességét és hosszúságát tudja megmérni. Ezután osztályozza a sejteket a kiszámított indexérték alapján. A módszer hátránya, hogy nem tud kimutatni kisebb rendellenességeket, valamint nem veszi figyelembe, hogy az egyes sejtek fejalakulása eltérhet (Nagy, 2001).

3.8.4. Fluoreszcens festési eljárás

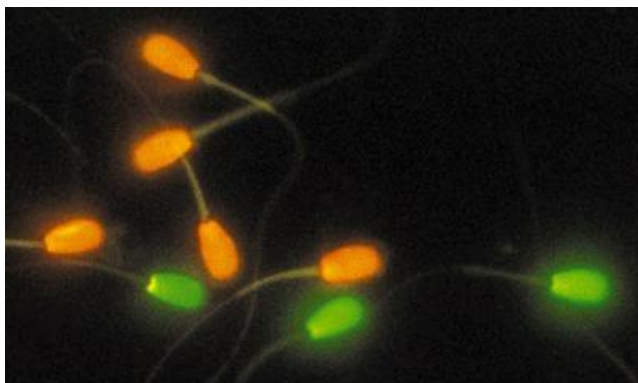
A fluoreszcens festési eljárások során a sejteket sejtészervi szinten lehet értékelni. Az akroszóma állapotát konjugált lektinnekkel, a kapacitáció stádiumát klór-tetraciklinnel (CTC), a mitokondriumok aktivitását a spermium középrészében rodamin 123-al (Evenson és mtsai., 1982) vagy JC-1-el (Garner és Thomas, 1999) vagy Mitotracker Green FM (Sutovsky és mtsai., 1996) lehet mérni (Nagy 2001). A fluoreszcens vizsgálatok költségesebbek a fénymikroszkópos

vizsgálatoknál, viszont nem befolyásolja az eredményt a hígítóban lévő glicerín és a tojássárgája (Nagy, 2001).

Az egyik gyakran alkalmazott élő/elhalt vizsgálat során propidium-jodid (PI) valamint vagy fluoreszcein-diacetát (FDA) vagy karboxi-fluoreszcein diacetát (CFDA) DNS festéket használnak. A CFDA molekulák áthatolnak az ép membránon úgy, hogy nem fluoreszkálnak. Az észteráz enzimek a diacetát részt lehasítják és a karboxil-fluoreszcein molekulák zölden fluoreszkálnak a sejtmagban, és nem képesek kijutni a sejtmembránon. Ezzel az ép membránú sejtek meg vannak jelölve. A PI vörösesen fluoreszkáló kontrasztfesték, a sérült membránú sejteket festi meg (Nagy, 2001)). Garner és mtsai (1994) a következő fluoreszcens festési eljárást fejlesztették ki: DNS-specifikus SYBR14 fluoreszcens festéket használtak, amely kötődik DNS-hez és zöld fluoreszcenciát mutat. A kontrasztfesték szintén propidium-jodid volt (Nagy, 2001). (4.ábra)

4. ábra SYBR 14/PI kombinációval festett spermiumok. Az élő, ép plazmamembránnal bíró ondósejtek zölden fluoreszkálnak (SYBR 14), az elhalt sejtek vörösre festődnek (PI).

(Forrás: DL Garner. (www.probes.com) Nagy 2001)



2.9.5. Áramlási sejtanalízis (flow citometria)

Áramlási sejtanalízishez fluoreszcens festékeket használunk. Többek között a spermiumok élő/elhalt státuszát (a fej membrán integritását), mitokondriális aktivitását, DNS integritást tudunk vizsgálni a módszerrel. Az áramlási sejtanalízis során objektív értékeléssel lehet mérni a sejteket rövid idő alatt nagy számban. Másodpercenként 1000-2000 spermiumot lehet értékelni. Áramlásos sejtanalízissel többek között a fentebb megemlített fluoreszcens festési eljárásokkal a vizsgálatok automatizálhatók.

A spermiumok a mérőkamrába egyesével jutnak be a vívfolyadékban, végig haladnak egy lézersugáron és a visszavert fény információt ad a sejtméretről és összetételéről. A lézer gerjeszti a fluoreszcens festékeket, ezért multiparaméteres analízisre is képes (Nagy, 2001).

Mára már több lézeres citométerek is elérhetők, amelyek tudnak többféle fluoreszcens festéket tudnak detektálni párhuzamosan. A citométerrel a következő paraméterek értékelhetők: élő és elhalt spermiumok aránya, , akroszóma integritás, mitokondriumok aktivitása, DNS integritás (Nagy, 2001).

3.9.6. Membránintegritás vizsgálat

A membránintegritás vizsgálatok során a hímivarsejtek membránépségét vizsgáljuk. A leginkább elterjedt membránintegritás vizsgálatok festési módszereket alkalmaznak, amely során a vitális festék csak az elhalt sejtek membránján képes átjutni és megfesteni azokat. Az élő sejtek jelölésére kontraszt festékeket használnak. A membránintegritás vizsgálat során sokszor a sejtek morfológiai tulajdonságait is meg tudjuk határozni.

1942-ben Lasley és munkatársai eozin és opálkék festékek segítségével különítették el az elhalt és élő sejteket. Ők voltak az elsők, akik ilyen jellegű vizsgálatokat végeztek. Ugyanis az eozin képes áthatolni a sérült membránfalon, és a sejtet narancssárgára festi. Az élő sejtek nem festődnek meg. Az opálkék festék, mint kontrasztanyag volt jelen, ezzel a festetlen sejteket lehet festeni. Ezen kívül még számos festési eljárás létezik. Mindegyiknek alapja, hogy a vitális festék a sérült sejteket festi meg, a kontrasztfesték az ép membránú sejteket jelöli. Ilyen festési eljárás például az revector soluble blue-neutrálvörös (Crooke és Mandl, 1947), az eozin-anilinkék (Shaffer és Almquist, 1948), a brómfenolkék-nigrozin (Rauhaus, 1990), a Kovács-Foote festés (Kovács és Foote, 1992) és az eosin-nigrosin vizsgálat (Swanson és mtsa. 1951)

A festetlen sejtek azonban nem biztos, hogy nozgasra képesek, ugyanis a legtöbb festési eljárás során a feji rész plazmamembránjának épségét lehet felmérni. (Nagy, 2001) A legtöbb kérdésre választ adó fénymikroszkópos festési eljárási módot 1992-ben Kovács és Foote dolgozta ki. Tripánkék élő/elhalt festést követő neutrálvörös fixálással és Giemsa kontrasztfestéssel a feji rész és farki rész plazmamembránt és az akroszóma állapotát lehet felmérni. Elméletileg 10 kategóriába lehet sorolni így a sejteket, azonban gyakorlati körülmények között 6-8 kategória felosztása a célszerű (Nagy, 2001, Kútvolgyi és mtsai, 2006). A sejtek festése alapján az élő sejtek világos színűek, az elhalt sejtek sötét-fekete-lila színűek. Az ép akroszóma bíborvörös, a fellazult akroszóma sötét levendula, a sérült világos levendula színű. A kiürült/levált akroszóma, szürkés színű (Nagy, 2001).

A membránintegritás vizsgálatok egyik módszere a hipoozmotikus teszt. Jeyendran és munkatársai 1984-ben fejlesztették ki a hipoozmotikus tesztet (hypo-osmotic swelling test, HOS). A céljuk az volt, hogy a humán spermiumok plazmambemembránjának az épségét meg tudják határozni.

A teszt során a spermiumfarkak membránépsége mérhető. Ha a fark sérült, akkor a sejt nem képes mozgásra, habár a fej, akroszóma lehet ép. A HOS tesztet az eozin-nigrozin festési eljárással is kombinálták (Czímber és mtsai., 2012; Nagy, 2001).

Az eljárás során az ép sejtmembránnal rendelkező sejtek hipoozmotikus közegben megduzzadnak, mert a folyadék beáramlik a sejt belsejébe. Ez az ozmotikus egyensúly fenntartása miatt következik be. A folyadékbeáramlás a farki rész elhajlását okozza. A módszer segítségével meg lehet állapítani az élő sejtek koncentrációját, valamint az egyes sejtek életképességét (Nagy, 2001).

3.9.7. Egyéb paraméterek vizsgálata

További paraméterek, pl. a spermium kapacitáció és akroszóma reakció vizsgálatához funkcionális tesztek alkalmazhatunk. A kötődési tesztek során a petevezető hámfához való kötődést, illetve a zona pellucidához való kötődést vizsgálják. Az in vitro fertilizációs eljárások során a zóna penetrációt valamint a korai embiófejlődési szakaszt vizsgálják.

4. Anyag és módszer

4.1. Védett őshonos és a veszélyeztetett mezőgazdasági állatfajták genetikai állományának ex situ vagy in vitro megőrzése című projekt

2014. szeptemberében a NAIK Állattenyésztési, Takarmányozási és Húsipari Kutatóintézetben az őshonos juhajták in vitro génmegőrzése céljából a termékenyítőanyag mélyhűtve tárolása kezdődött meg, amely egy 3 éves projekt keretén belül valósult meg a Magyar Juh- és Kecsketenyésztők Szövetségével együttműködésben.

A program során őshonos magyar juhajták (hortobági racka, cikta, cigája, tejelő cigája) tenyészkosaitól sperma fagyasztás és spermabank létrehozása történt.

A betárolt ondóminták jövőbeli felhasználhatósága szempontjából fontos azok időnkénti minőségellenőrzése, a kosspermák fagyaszthatóságbeli különbségének meghatározása.

A dolgozat kutatása ennek a programnak a keretében gyűjtött ondóminták minőségi paramétereire vonatkozó adatainak feldolgozása és értékelése. Kosonként 3 különböző időpontban fagyasztott reprezentatív ondóminta felolvasztás utáni minőségellenőrzésére módosított Kovács-Foote-féle festési eljárást, és CASA motilitás vizsgálatot alkalmaztunk.

4.2. Ondóvétel

A projektben összesen 24 tenyészkostól történt a spermavétel után melyhűtés. A legtöbb kóstól 200-200 db műszalma került betárolásra. Összesen 4178 adag fagyasztott sperma került a génbankba. Azok a kosok, amelyek több hetes sikertelen próbálkozás után agresszív, vagy félénk viselkedésük miatt ugratásra és spermavételre alkalmatlannak bizonyultak, vis maior körülmény miatt a programból kizárásra kerültek.

A beszállított tenyészállatokat először karanténba helyezték, majd a következő betegségekre szűrték: *Brucella ovis*, *Brucella melitensis*, Border disease, Bluetounge. Ezután történt a kosok betanítása a spermavételre, valamint az ember-közelséghez szoktatás.

Az ondóvétel műhüvely használatával történt.

A műhüvely végére 15 ml-es centrifugacsövet csatlakoztattunk, amelybe az ejakulátum összegyűlt. A körülményeknek zavartalannak kellett lennie, illetve a spermavételt olyan személy végezte, akit ismertek az állatok. A kos egy kalodába befogott ivarzó anyára ugrott. A betanított kosok esetében az ugratás és spermavétel a legtöbb esetben nagyon gyorsan történt.

Néhány perces előkészület után a kosok felugrottak, a pénisz megmerevedve és a műhüvelybe jutott. Gyorsan és erős utólökéssel történt az ejakuláció.

A folyamat előtt a kost megtisztították, főként a hasi és a tasak tájékán. Az első sikeres spermavételek után a NÉBIH által előírt mikrobiológiai mintavétel történt, majd az eredmény megérkezése után kezdődött el a sperma fagyasztása.

4.3. A sperma hígítása

A friss ejakulátumot először makroszkópos vizsgálatokkal, majd mikroszkópos vizsgálatokkal értékelték. Meghatározták a sperma tétfogatát, vizsgálták a spermiumok tömegmozgását 50x-es nagyítással, a spermiumkoncentrációt spektrofotométerrel (IMV, Accucell, Franciaország). A mozgó sejtek százalékos arányát 50-100x-os hígításban értékelték fáziskontraszt mikroszkóppal (Olympus BX-51) 200x-os nagyításban. Ezután Andromed (Minitüb, Tiefenbach, Németország) sperma hígítóval lassan adagolva, 300 millió élő sejt/ml végkoncentrációra hígították az ejakulátumot. Az így elkészült hígított spermát 0,5 ml-es műszalmákba töltötték, amit PVA (polivinil-alkohol) porral zártak le.

4.4. A sperma fagyasztása

A szalmákat 5°C-os hűtőbe helyezték, ahol, fokozatosan, 2 órán keresztül hűltek le és ekvilibráálódtak. Ezután 8 percig nitrogéngőzbe helyezték, majd folyékony nitrogénbe merítették. A fagyasztott sperma adagokat kosonként elkülönítve, kaniszterekben, folyékony nitrogénben, -196°C-on tárolták.

A szalmáknak a következő jelölést alkalmazták: Mesterséges termékenyítő állomás kódja_Kos ENAR száma_termelés dátuma Pl. 8006332_HU132316311_Ts_201411 06

Csak azok az ejakulátumok kerültek mélyhűtésre a program során, amelyeknek minimum 75% volt a szubjektív motilitása, kevesebb, mint 15% volt a összes morfológiai defektus, valamint minimum 2 milliárd spermium/ml volt a sejtsűrűsége.

4.5. A sperma felolvasztása

A lefagyasztott spermát a minőségellenőrzés céljából fel kell olvasztani. Fagyasztásonként 1-1 szalmát minimum 1 napos, -196 °C-on történő tárolást követően olvasztottunk fel 37°C-os vízfürdőben 20-30 másodpercig. Ezután Andromeddel 8-10x-re hígítva, 20 perc inkubálást követően CASA rendszerrel, motilitásvizsgálatot végeztünk. Az elhalt és élő spermiumok arányát módosított Kovács-Foote-féle festési eljárással értékeltük. A felolvasztás utáni minőség

ellenőrzés alkalmával a minimum 40%-os totál motilitású mintákat tekintettük megfelelő minőségűnek és betárolásra alkalmasnak. Az adatokat a spermatermelési naplóban és számítógépes adatbázisban rögzítettük.

4.6. Módosított Kovács-Foote-féle élő/elhalt és akroszóma festés

A Kovács-Foote-féle festési eljárás a sejtmembrán épségének elbírálása mellett morfológiai értékelésre is alkalmas. A festési eljárást minden kos esetében a friss-hígított mintán, és a felolvasztott ondómintán is elkészítettük.

A festési eljárás során élő/elhalt festésre 0,16% Chicago sky blue (CSB) oldatot (Sigma C-8679), fixálóként 0,2% neutrálvöröst (Sigma N-2880) és 5% formalint tartalmazó 1N HCl oldatot (9 rész desztillált víz/1 rész cc. HCl), az akroszóma festésére 7,5% Giemsa törzsoldatot (Sigma GS-500) használtunk (Kovács és Foote 1992, Kútvölgyi és mtsai 2006).

Festés előtt a spermahígítóval elegyített spermát pufferolt NaCl oldattal (0,06% K₂HPO₄ anhidrátot és 0,825% NaCl-ot tartalmazó oldat) 8-10x-es mértékre hígítottuk, a koncentrációtól függően.

Ezután egy tárgylemez közepére egy csepp hígított sperma került, mellé pedig egy csepp CSB festék. A két cseppet egy másik tárgylemez segítségével óvatosan összekevertük, majd a tárgylemezek egymásra helyezése után a tárgylemezeket párhuzamosan széthúztuk. Így két kenetet készítettünk.

A kenetek függőleges helyzetben száradtak, majd következett a 4 percg tartó fixálás.

A fixálás után csapvízzel, és desztillált vízzel öblítettük a keneteket, majd a 3-4 h-ig tartó, 35-40 °C-on történő Giemsa festés következett.

A Giemsa festés után csapvizes öblítést, majd 2 percg tartó desztilláltvizes differenciálást végeztünk.

A kenetek értékelését immerziós objektívvel 1000x-es nagyításban, fénymikroszkóp segítségével értékeltük. A sejttípusok elkülönítésének elősegítésére sárga fényszűrőt használtunk. A minták kiértékeléséhez sejtszámláló készüléket alkalmaztunk. (Celltrac M+ Differential Cell Counter, KPG Products Ltd, Hove, Egyesült Királyság)

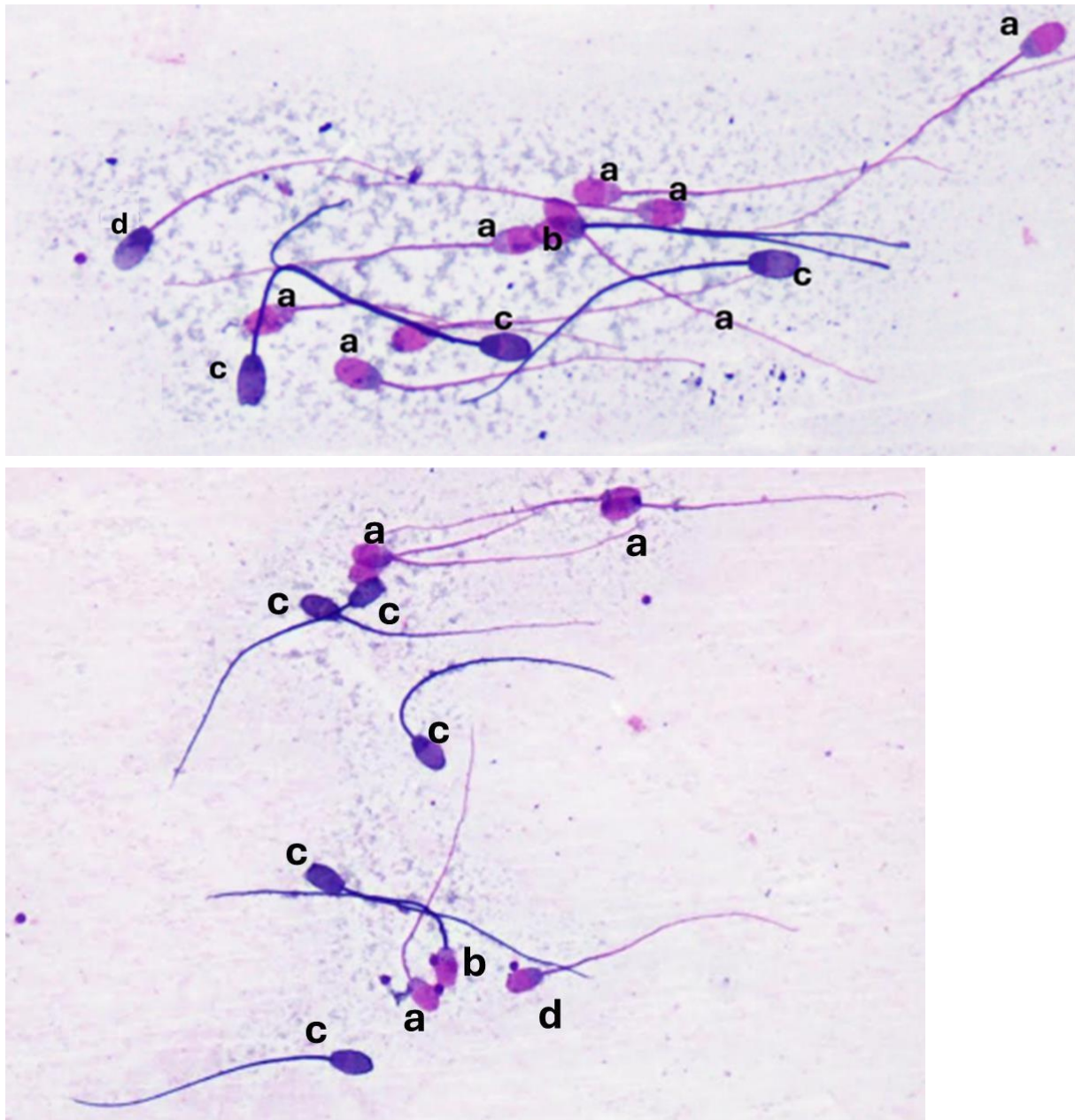
A festési eljárás során a sejtek különböző módon színeződnek. A neutrálvörös a CSB-val feketés, ibolyaszínű csapadékot képez. A sérült membránú sejtek feji és farki része ezáltal sötétre színeződik. Az ép sejtek akroszómája bíborszínű lesz a Giemsa kontraszt festés hatására. A sérült sejtek akroszómája levendula színű. A levált akroszómájú sejtek szürkésfehérre színeződnek.

A fark membránintegritása is értékelhető a festési eljárással. Az élő, intakt sejtek farka rózsaszínes, hullámos vonalú. Az elhalt sejtek farka sötétkék színű és egyenes lefutású.

A vizsgálatok során a spermiumokat 8 kombinált kategóriába soroltuk., amelyet a 3. táblázat mutat be.

5. ábra Kovács-Foote-féle festési eljárás, kosspermiumok élő/elhalt és akroszómafestése, az 5152-es kos fagyasztott spermamintájából készült festett kenet mikroszkópos felvétele, sejtípusok meghatározása

(forrás: Fotó: Kútvölgyi Gabriella, ábra: saját készítésű munka)



sejtípusok: a. IHITIA, b. IHDT, c. DHDTDA, d. DHIT

3. táblázat A spermiumok értékelési kategóriái

rövidítés	Angol nyelvű jelentése	fej	farok	akroszóma	morfológiai rendellenesség
IHITIA	Intact head,tail,acrosome, normal morphology	élő	élő	ép	-
IPD	Intact head, tail, acrosome with proximal cytoplasmic droplet	élő	élő	ép	proximális plazmacsepp
IDD	Intact head, tail, acrosome with distal cytoplasmic droplet	élő	élő	ép	disztális plazmacsepp
IBT	Intact cell with bent, curved, broken midpiece and tail	élő	élő	ép	középrész vagy farok rendellenesség
IHITDA	Intact head,tail, damaged (or lost) acrosome	élő	élő	sérült	nem bíralt
IHDT	Damaged head,intact tail	élő	elhalt	ép	nem bíralt
DHIT	Intact head,damaged tail	elhalt	élő	ép vagy sérült	nem bíralt
DHDTDA	Damaged head,tail, acrosome	elhalt	elhalt	sérült	nem bíralt

Kenetenként 300 spermiumot értékeltünk és meghatároztuk a sejtkategóriák százalékos arányát. Az ép membránú sejtkategóriák összevonásával megállapítottuk az összes ép membránú sejt arányát is, amit további összehasonlító elemzésnek vetettünk alá.

A fagyasztott/felolvasztott ondóminták közül kosonként 3 reprezentatív mintát értékeltünk. A statisztikai elemzés során a következő két legfontosabb sejtkategória százalékos arányát hasonlítottuk össze kosonként, fajtánként és szezonban, illetve szezonon kívül gyűjtött mintákban: „Összes ép membránú spermium” és „ép membránú ondósejt morfológiai anomália nélkül /IHITIA/”z eredmények értékelésekor két kategóriát különítettünk el: ép (IHITIA) és sérült (IPD, IDD, IBT, IHITDA, IHDT, DHIT, DHDTDA)

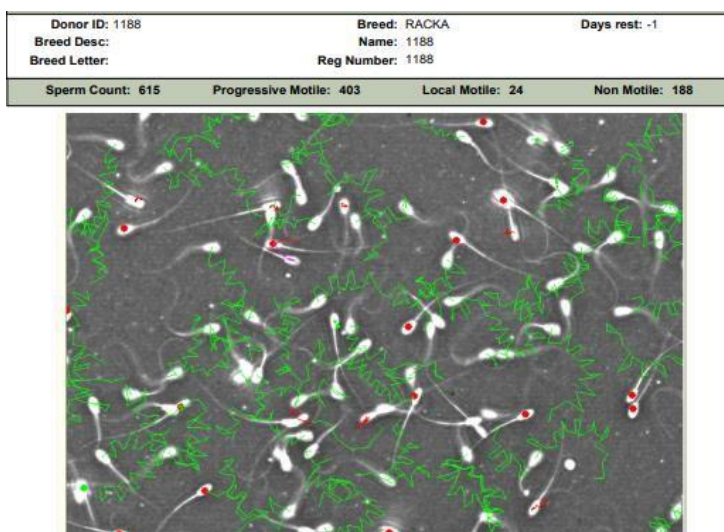
4.7. Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) vizsgálat

A felolvasztott ondóminták mozgási paramétereinek elemzésére CASA rendszert alkalmaztunk. A mintákat Andromeddel 10x-re hígítottuk, majd 5 mikrolitert kimérve Makler-féle kamrába cseppentettük. A kamra rétegvastagság 10 mikrométer. A vizsgálat során a a SpermVision nevű szoftveres programot alkalmaztuk (SpermVision™, Minitübe, Tiefenbach, Németország). A program elindítása után a nyitó ablakban kitölthetőek a kívánt paraméterek, mint például a vizsgált állat faja, fajtája, tulajdonosa, a juhok egyéni azonosító száma valamint a hígítás mértéke.

A rendszer 500 spermium vagy 10 vizsgált mező után készíti el az értékelést. Létrehozza a CASA adatlapot, ami elmenthető (6. ábra). Az eredmények értékelésekor a 7. ábrában és 4. táblázatban látható mozgási paraméterek adatait használtuk fel.

6. ábra Casa adatlap

(Forrás: Dr. Kútvölgyi Gabriella fényképe, engedéllyel 2015)



Az adatlapon található mozgási paraméterek rövidítéseinek magyarázatát a 4. táblázat mutatja be. A következő paramétereket dolgoztuk fel az eredmények értékelésénél: Totál motilitás (TM, %), progresszív motilitás (PM, %), VCL, VAP, VSL, LIN, STR, BCF, ALH, WOB.

4. táblázat A CASA adatlapon szereplő rövidítések jelentése*(forrás: Horváth 2006 munkája alapján saját készítésű)*

Jelölés	Jelentés	Mértékegység
DSL	A mozgás kiindulási és végpontja között a hímivarsejt által megtett egyenes útvonal	μm
DCL	A hímivarsejt által ténylegesen megtett út hosszúsága	μm
DAP	A hímivarsejt ténylegesen megtett útvonalának és a mozgásának kiindulási és végpontja között mért távolságnak (nettó) az átlagolt hosszúsága	μm
VSL	A hímivarsejt sebessége mozgásának kiindulási és végpontja közötti távolságokra számolva (progresszív sebesség)	$\mu\text{m/s}$
VCL	A hímivarsejt sebessége a ténylegesen megtett, teljes mozgási útvonalára számolva	$\mu\text{m/s}$
VAP	A hímivarsejt sebessége mozgásának átlagolt útvonalára számolva	$\mu\text{m/s}$
LIN	A hímivarsejt ténylegesen megtett mozgási útvonalának az egyenestől számított eltérése	%
STR	A hímivarsejt átlagolt mozgási útvonalának az egyenestől számított eltérése	%
BCF	A fej kilengésének frekvenciája	Hz
ALH	A fej oldalirányú kitéréseinek átlagos nagysága	μm
WOB	A hímivarsejt teljes mozgási útvonalának az átlagolt mozgási útvonaltól számított eltérése	%

4.8. Statisztikai analízis

A friss és fagyasztott/felolvasztott mintákról, és a Kovács-Foote festési eljárással készült kenetek értékelésekor adatokat gyűjtöttünk, rögzítettük és leíró statisztika céljából elemeztük az IBM® SPSS® statisztikai szoftver 29-es verziójával.

A normalitást Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük, a transzformációkat pedig kétlépcsős átalakítással végeztük el.

A fajták (cigája, cikta és racka) és a szezonáltság (tenyésztés szezonon belül és szezonon kívül) hatását, valamint ezek kölcsönhatását az ondó minőségi paramétereire általános lineáris modell segítségével elemeztük, kétfaktoros varianciaanalízissel (ANOVA). A szignifikancia szintje $P < 0,05$ volt, a teljes spermiumszám/ejakulátumra, tömegmozgásra, szubjektív motilitásra, standard motilitásra, kinematikai paraméterekre, életképességre és morfológiára.

Az egyes kos fajták reprezentatív spermamintáinak fagyaszthatóságát egytényezős ANOVA-val elemeztük. Az átlagokat Tukey-féle post hoc-teszttel különítettük el. A khi-négyzet segítségével elemeztük a fajták és az évszak hatását a fagyaszthatóságra (75%-os szubjektív motilitás és 2 Milliárd/ml spermium-koncentráció küszöbértékkel) és a génbanki betárolásra (40%-os felolvasztás utáni teljes mobilitás küszöbértékkel). A szignifikancia különbséget párosított t-próbával vizsgáltuk.

5. Eredmények és értékelésük

1. kérdés A fajták között van-e jelentős eltérés az ondó mennyiségét (ml), koncentrációját ($10^6/\text{ml}$), összes spermiumszám/ejakulátum, tömegmozgását és szubjektív motilitást (%) tekintve? A tenyész szezon során vett ondó és a szezonon kívül vett minta között szignifikáns különbség van-e?

5. táblázat: A fajta és a szezonális hatása az ondó minőségére

Ejakulátum paramétere	Fajta			P-érték	Tenyész szezon		P-érték	P-érték Fajta* Szezon
	Cigája	Cikta	Racka		szezonon belül	szezonon kívül		
Mennyiség (ml)	0.96± 0.02 ^a	0.70± 0.03 ^b	0.79± 0.04 ^b	0.0001	0.91± 0.03 ^a	0.79± 0.02 ^b	0.0001	0.053
Koncentráció ($10^6/\text{ml}$)	3624.3± 131.20 ^a	4707.19± 181.59 ^b	5303.31± 155.83 ^c	0.0001	4322.± 133.7	4265.01± 135.33	0.257	0.0001
Összes spermiumszám/ejakulátum	3630.5± 194.33	3434.25± 213.39	4485.06± 358.69	0.141	3966.8± 198.38 ^a	3564.1± 195.91 ^b	0.010	0.011
Tömegmozgás	3.75± 0.10	3.66± 0.14	3.59± 0.17	0.658	3.86± 0.10	3.51± 0.12	0.072	0.677
Szubjektív motilitás (%)	71.43± 0.94 ^a	70.49± 1.30 ^a	74.19± 0.96 ^b	0.034	71.74± 080	71.79± 0.97	0.918	0.215

Ugyanabban a sorban lévő, különböző felső indexű (a, b,c) átlagok szignifikánsan eltérnek. A színezett értékek mutatják a szignifikáns különbségeket.

Az ejakulátum mennyiségében szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a cigája és a cikta, illetve a cigája és a racka kosok között (5. táblázat). A tenyész szezonon belüli eltérések is szignifikánsak voltak a mennyiségi paramétert nézve. Megfigyelhető, hogy tenyész szezonon belül nagyobb mennyiségű ejakulátumot adtak le a kosok, mint szezonon kívül (p-érték: 0,0001).

Szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a koncentrációt vizsgálva az egyes fajták között (p-érték: 0.0001). A legalacsonyabb koncentráció a cigája kosok esetében volt, míg a legnagyobb koncentráció a racka kosoknál. A koncentráció a tenyész szezonban és szezonon kívül nem tért el szignifikánsan egymástól.

Az összes spermiumszám az ejakulátumban a vizsgált fajták között nem volt szignifikánsan eltérő. Azonban a tenyész szezonban jelentősen magasabb volt az összes spermiumszám értéke, mint a szezonon kívül vett mintáké (p-érték: 0.010).

A tömegmozgást vizsgálva a fajták között nem találtunk szignifikáns különbségeket. A szezonalitást vizsgálva szintén nem volt jelentős az eltérés a tenyész szezonban vett minták és szezonon kívüli minták esetében.

A szubjektív motilitás esetében a cikta és a cigája kosokkal szemben a rackának szignifikánsan jobb a szubjektív motilitási értéke (p-érték: 0.034). Ugyanakkor tenyész szezonban és szezonon kívül nem figyelhető meg szignifikáns különbség.

A szakirodalommal összehasonlítva több vizsgálat is megerősítette, hogy a tenyész szezonon belül nagyobb mennyiségű ondót tudtak adni a kosok, mint szezonon kívül (Oláh, 2010). Sarlós és munkatársai tenyész szezonban mértek a legmagasabb motilitási értékeket, és szezonon kívül (nyári hónapokban) a legalacsonyabb értékeket. Továbbá szezonon belül magasabb összes spermiumszámot is kimutattak. Bár a mi vizsgálataink nem erősítették meg, hogy a szubjektív motilitási érték a tenyész szezonon belül jobb, több kutatás alátámasztotta, hogy a tenyész szezonban vett minták szubjektív motilitása jobb a szezonon kívül vett mintáknál (Oláh, 2010; Sarlós és mtsai., 1996).

A mennyiség, koncentráció és az összes spermiumszám/ejakulátum paraméterek esetében szignifikáns interakció figyelhető meg a fajta és a szezonális között.

A fajta * szezon kölcsönhatásokat a 6. táblázat szemlélteti.

6. táblázat: A fajta és a szezon kölcsönhatása azoknál a paramétereknél (mennyiség, koncentráció, összes spermiumszám/ejakulátum), ahol interakció mutatható ki

Paraméter	Tenyész szezon	Fajta			P-érték
		Cigája	Cikta	Racka	
Mennyiség (ml)	Tenyész szezon	1.07±0.03 ^{aA}	0.72±0.04 ^b	0.87±0.06 ^{cA}	0.0001
	Szezonon kívül	0.88±0.03 ^{aB}	0.68±0.04 ^b	0.61±0.05 ^{bB}	0.0001
P-érték		0.0001	0.495	0.002	
Koncentráció (10 ⁶ /ml)	Tenyész szezon	3191.38±174.24 ^a A	4662.78±260.93 b	5630.79±178.57 c	0.0001
	Szezonon kívül	3937.81±183.70 ^a B	4750.33±254.57 b	4639.24±273.97 ab	0.010
P-érték		0.0001	0.705	0.011	
Összes spermiumszám/ejakulátum	Tenyész szezon	3478.92±238.69 ^a	3411.79±278.30 ^a	5185.53±485.88 bA	0.0001
	Szezonon kívül	3740.25±287.08	3456.06±324.28	3064.66±362.22 B	0.423
P-érték		0.899	0.872	0.0001	

Ugyanabban a sorban lévő a,b, c és ugyanazon oszlopban lévő A,B különböző felső indexekkel jelölt átlagértékek szignifikáns eltérést mutatnak. A színezett értékek mutatják a szignifikáns különbségeket.

A mennyiségi paraméter esetében a fajták között az ondóminták szignifikáns eltéréseket mutatnak a tenyész szezonon belül (p-érték: 0.0001). A legnagyobb mennyiségű ondó a cigája kosok esetében volt, míg a legkisebb mennyiség a racka kosoknál. Szezonon kívül cikta és a

racka kosok szignifikánsan kisebb mennyiségű ejakulátumot adtak a cigája kosokhoz képest (p-érték: 0.0001).

A szezonalitást figyelembe véve a cigája kosoknál (p-érték:0.0001) és a racka kosoknál (p-érték: 0.002) szignifikáns eltéréseket figyeltünk meg a mennyiség szempontjából. Mindkét fajta tenyész szezonban nagyobb mennyiségű ondót adott. Cikta kosok esetében a nem volt szignifikáns különbség a tenyész szezonban és a szezonon kívül vett minták között.

Az ejakulátumok spermium koncentrációját tekintve a három fajta között a tenyész szezonban jelentős eltérések mutatkoztak (p-érték: 0.0001). A legnagyobb koncentrációja a racka kosoknak volt. A legkisebb koncentrációja a cigája kosoknak. Szezonon kívül csak a cigája és a cikta kosok értékei különböztek szignifikánsan. A racka kosok koncentrációja egyik értékhez képest sem volt szignifikánsan eltérő. A tenyész szezonban és szezonon kívül vett friss mintákat összehasonlítva a cigája kosok esetében volt szignifikáns eltérés (p-érték: 0.0001).

Az összes spermiumszám/ejakulátumot tekintve a racka kosok mintájában szignifikánsan nagyobb az összes spermiumszám tenyész szezonban. Szezonon kívül a fajták között nincs szignifikáns különbség.

Az összes spermiumszám/ejakulátum a tenyész szezont tekintve a cigája és cikta juhok esetében nincsen szignifikáns eltérés. Azonban a racka kosoknál a tenyész szezonban levett ejakulátumban szignifikánsan nagyobb az összes spermiumszám (p-érték: 0.0001).

Több szakirodalom megerősítette, hogy a friss ondó mennyiség, koncentráció és összes spermiumszám/ondó a tenyésztési szezonon belül magasabb, mint a szezonon kívül vett ondóé (Oláh, 2010; Sarlós és mtsai., 1996; Zamiri és mtsai., 2010).

A cigája, cikta és a racka kosok esetében még nem készült átfogó vizsgálat arra nézve, hogy milyen különbségek mutathatóak ki a fajták között. Azonban Vozaf és munkatársai (2022) szlovák őshonos juhok ondóját vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy a vizsgált fajták között nincs különbség.

2. kérdés A gyűjtött ejakulátumok hány százalékát lehetett fagyasztani fajtánként, illetve tenyész szezonban és szezonon kívül? szignifikáns eltérések voltak-e? A betárolás mértéke hogyan alakult fajtánként, tenyész szezonban és szezonon kívül?

A cigája, cikta és racka kosoknál azok az ondómintákat, amelyeknek a szubjektív motilitása elérte a 75%-ot, spermium koncentrációja pedig a 2 milliárd/ ml koncentrációt fagyasztásra alkalmasnak nyilvánították. Fagyasztás után, felolvasztáskor 40%-os totál motilitási érték felett kerültek génbanki betárolásra a minták. A fagyasztásra alkalmas minták százalékos arányát (Fagyaszthatóság) az összes ejakulátumhoz képest, illetve a betárolt minták százalékos arányát az összes lefagyasztott mintához képest (betárolás mértéke) fajtánként és szezonális szerint a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat Fajta és a szezon hatása a fagyasztásra alkalmas friss ejakulátum minták arányára (75%-os szubjektív motilitás és 2 milliárd sejt/ml koncentráció küszöbértékek alapján), valamint a felolvasztás utáni 40%-os totál motilitás alapján génbankban való tárolásra alkalmas minták aránya

Paraméter	Fajta			Chi-négyzet érték	Tenyész szezon		Chi-négyzet érték
	Cigája (%)	Cikta (%)	Racka (%)		tenyész szezon(%)	Szezonon kívül (%)	
Fagyaszthatóság %				0.586	Fagyaszthatóság %		0.017
Fagyasztott	62.70	58.20	64.30		56.00 ^a	66.80 ^b	
Nem fagyasztott	37.30	41.80	35.70		44.00 ^a	33.20 ^b	
Betárolás mértéke %				0.076	Betárolás mértéke %		0.312
Betárolva	86.80	92.30	97.90		88.70	92.60	
Nem lett tárolva	13.20	7.70	2.10		11.30	7.40	

Az ugyanabban a sorban lévő, különböző felső indexű átlagok jelentősen eltérnek. A színezett érték mutatja a szignifikán különbséget.

A három fajta esetében a fagyaszthatóság között nem volt szignifikáns eltérés. Tenyész szezon tekintve a tenyész szezonban kevesebb mintát lehetett fagyasztani, mint szezonon kívül.

A fajták között nem volt szignifikáns különbség a betárolt minták arányában. A tenyész szezon figyelembe véve szintén nem tapasztaltunk jelentős különbséget a betárolás arányával kapcsolatban.

Alessandro és munkatársa (2002) vizsgálták Leccese kosok esetében, hogy a tenyész szezon hogyan befolyásolja az ondó fagyaszthatóságát. Azt az eredményt kapták, hogy a tenyész szezon jelentősen befolyásolja a fagyaszthatóságot. A legjobb eredményt a nyári és az őszi időszakban érték el, amely megfelel a szaporodási időszaknak a mérsékelt égövben.

További szakirodalmak is alátámasztották, hogy a fagyaszthatóságot befolyásolja a szezonális (Saha és mtsai., 2022; Ollero és mtsai., 1998).

Az eredményeink nem támasztják alá azt, hogy a tenyész szezonban jobb a fagyaszthatóság. Ezért további vizsgálatokkal, több mintaszámból kell meghatározni a különbségeket.

3. kérdés Milyen hatással van a fajta és a szezon a sperma minőségi paramétereire CASA és Kovács-Foote festési módszerrel vizsgálva, az egyedenként 3 különböző időpontban fagyasztott majd felolvasztott és értékelt reprezentatív ondóminta alapján?

A vizsgált kosok reprezentatív ondómintáinak spermaminőségét a fajta és a szezonális hatását a 8. táblázat mutatja be.

8. táblázat. A fajta és a szezonális hatása a cigája, cikta és racka kosfajták reprezentatív ondómintáinak spermaminőségi paramétereire

Paraméter	Fajta			P- érték	Tenyész szezon		P- érték	P-érték fajta* szezons
	Cigája	Cikta	Racka		tenyész szezons	szezons kívüls		
Totál motilitás (%)	62.71± 1.73 ^a	62.86± 2.66 ^a	72.26± 2.03 ^b	0.004	65.59± 1.89	67.09± 1.69	0.555	0.208
Progresszív motilitás (%)	55.82± 2.07 ^a	57.29±2.53 ^a	67.11± 2.26 ^b	0.002	59.17± 2.15	61.27± 1.94	0.470	0.454
VCL (µm/s)	186.30 ± 4.41 ^a	205.67± 5.73 ^b	205.79± 5.29 ^b	0.001	196.47 ± 4.58	197.57± 4.15	0.858	0.039
VAP (µm/s)	94.98± 1.78 ^a	104.11± 2.11 ^b	100.46± 2.59 ^b	0.005	100.11± 1.96	98.66± 1.77	0.584	0.283
VSL (µm/s)	76.76± 1.41 ^a	84.06± 2.06 ^b	78.49± 2.60 ^b	0.030	80.27± 1.80	79.02± 1.63	0.608	0.835
LIN (%)	41.15± 0.75 ^a	40.66± 1.08 ^a	37.26± 0.64 ^b	0.001	40.63± 0.75	39.88± 0.68	0.461	0.037
STR (%)	77.99± 2.53	80.14± 1.07	76.95± 0.74	0.079	77.73± 1.86	79.51± 1.69	0.481	0.354
BCF (Hz)	31.64± 0.47	32.11± 0.66	30.64± 0.69	0.301	31.57± 0.55	31.51± 0.50	0.932	0.617
ALH (µm)	5.39± 0.13 ^a	5.68± 0.17 ^b	6.03± 0.09 ^b	0.013	5.78± 0.11	5.58± 0.09	0.180	0.070
WOB (%)	50.73± 0.53 ^a	50.33± 0.77 ^b	48.26± 0.51 ^b	0.002	50.79± 0.53	49.66± 0.47	0.115	0.024
Összes ép membránú sejt (%)	44.94± 1.71	43.47± 2.11	46.04± 2.65	0.864	45.96± 2.0	43.40± 1.8	0.335	0.733
IHTIA (%)	43.19± 1.79	41.86± 2.17	44.92± 2.58	0.845	45.04± 2.0	41.58± 1.8	0.201	0.805

Az ugyanabban a sorban lévő, különböző felső indexű átlagok jelentősen eltérnek. A színezett értékek mutatják a szignifikáns különbségeket.

A totál motilitást, progresszív motilitást és a LIN tekintve a racka jelentős mértékben eltér a cigája és cikta eredményekhez képest.

A cigája VCL, VAP, VSL, ALH és a WOB paraméterek szignifikáns eltéréseket mutatnak a cikta és a racka eredményekhez képest.

A többi paraméter (STR, BCF, minden ép sejt % és IHITIA) esetén egyik fajtánál sem tapasztalható szignifikáns különbség.

A 8. táblázatból látható, hogy a totál motilis és progresszív motilis spermiumok aránya magasabb a rackánál a két másik fajtához képest, viszont mindhárom sebességi érték magasabb a rackánál és ciklánál, a cigájához képest. A racka spermiumok viszont kevésbé lineárisan mozognak.

Nem találtunk szignifikáns különbségeket a tenyész szezont tekintve egyik paraméter esetében sem.

A szakirodalmak szerint a tenyész szezonban levett fagyasztott ejakulátumok paraméterei jobb eredményeket mutatnak, mint szezonon kívül, a tömegmozgás és a progresszív motilitást tekintve. (Oláh, 2010; Sarlós és mtsai., 2011).

A spermium minőség fajtánként eltérő, azonban erre a három kosfajtára még nem készült átfogó vizsgálat. Ezért szükségesek további vizsgálatok, több mintával és egyeddel.

Azoknál a paramétereknél (VCL, LIN, WOB) ahol interakciót tapasztaltunk a fajta és a tenyész szezon között további vizsgálatokat végeztünk (9. táblázat). Ezeknek a változóknak a kölcsönhatási p-értéke kisebb vagy egyenlő, mint 0.05. ($p\text{-érték} \leq 0.05$). Megvizsgáltuk a fajta * szezon interakciókat, fajtán belül és a szezonális különbségeket (9. táblázat).

9. táblázat. Fajta és a szezonális kölcsönhatása a cigája, cikta és racka kosfajták reprezentatív spermamintáinak néhány mozgási paraméterére

Paraméter	Tenyész szezon	Fajta			P-érték
		Cigája	Cikta	Racka	
VCL	tenyész szezon	194.50±10.90 ^{Aa}	202.10±11.70 ^b	200.60±9.78 ^b	0.0001
	szeznon kívül	197.70±5.38 ^B	200.09±9.11	200.50.14.15	0.434
P-érték		0.025	0.802	0.179	
LIN	tenyész szezon	44.67±1.74 ^{Aa}	40.8±1.41 ^{ab}	39.00±1.73 ^b	0.0001
	szeznon kívül	40.27±0.82 ^B	39.00±1.67	39.00±1.51	0.826
P-érték		0.009	0.945	0.286	
WOB (%)	tenyész szezon	53.89±0.93 ^{Aa}	50.37±0.98 ^a	48.00±0.80 ^b	0.0001
	szeznon kívül	49.84±0.57 ^B	50.31±1.22	48.71±0.81	0.959
P-érték		0.001	0.661	0.512	

Az ugyanabban a sorban lévő, különböző felső indexű átlagok jelentősen eltérnek. A színezett értékek mutatják a szignifikáns különbségeket.

A cikta és racka kosok spermiumai szignifikánsan magasabb VCL értékeket mutattak a cigája kosokhoz képest.. A szezont figyelembe véve csak a cigája kosoknál mutatható ki szignifikáns különbség. A tenyész szezonban gyűjtött minták esetében ez az érték szignifikánsan alacsonyabb volt, mint szezonon kívül.

A WOB paraméter esetében a racka fajta szingifikáns eltérést mutatnak a cigája és a cikta fajtákkal szemben (p-érték: 0.0001).

A tenyész szezont figyelembe véve a cigája kosok esetében a tenyész szezonban szignifikánsan magasabb a LIN és a WOB érték, mint szezonon kívül.

Az eredmények alapján az alábbiak a következtetéseim:

- Mind a fajta, mint a szezon tekintetében a friss és fagyasztott spermaminták különböző minőségi paramétereiben különbségeket tapasztaltunk. A cigája nagyobb mennyiségű, de alacsonyabb koncentrációjú, a cikta és a racka kevesebb, de koncentráltabb ondót produkált.
- Tenyész szezonban nagyobb mennyiségű és magasabb összes spermium számú ondót adnak a kosok.
- Az interakció vizsgálatnál kiderül, hogy a szezonális különbségeket főleg a racka és a cigája fajta okozza.
- Magas minőségi kritériumot választva, a minták hasonló arányban fagyaszthatók az egyes fajtáknál. A fagyasztott minták nagy arányban (87-97 %-ban) alkalmasak a betárolásra. A betárolt spermák reprezentatív feolvasztott mintái alapján a totál motilis és progresszív motilis spermiumok aránya magasabb a rackánál a két másik fajtához képest, viszont mindhárom sebességi érték magasabb a rackánál és ciktánál, a cigájához képest.
- A racka spermiumok viszont kevésbé lineárisan mozognak.
- A szezonális vizsgálatok kissé torzíthatnak, hiszen csak a kosok egy részének volt szezonban és szezonon kívül is fagyasztása, mivel a kosokat egy adott időben hozták be a mesterséges termékenyítő állomásra és a meghatározott betárolt ondó-mennyiség után elszállították. A cigája fajta esetében a szezonális különbségeket figyeltünk meg a VCL, LIN és WOB paramétereknél. A másik két fajta esetében a szezonális különbségeket tekintve nem volt szignifikáns különbség.

Az eredmények alapján a következők a javaslataim:

- Amennyiben a génmegőrzési program a jövőben folytatódik, javaslom a minőségi paraméterek összehasonlítását nagyobb egyedszám bevonásával. Az összehasonlító vizsgálatok fontos támpontot jelenthetnek a génmegőrzési programok tervezésénél, a génbankok kialakításánál. Lehet, hogy a különböző őshonos juhajtók esetében

kismértékben bár, de eltérő sperma-fagyasztási protokollokat kell bevezetni, illetve elengedhetetlen a szoros és egységes minőségellenőrzési eljárások alkalmazása.

- A dolgozat eredményei alapján rámutattunk arra, hogy a szezonális hatással van az ondó minőségére, bár az adatok kissé torzíthatnak, hiszen csak a kosok egy részének volt szezonban és szezonon kívül is fagyasztása, mivel a kosokat egy adott időben hozták be a mesterséges termékenyítő állomásra és a meghatározott betárolt ondó-mennyiség után elszállították. Javaslom, hogy amennyiben a génmegőrzési program a jövőben folytatódik, minden kóstól szezonban és szezonon kívül is történjen sperma fagyasztás szezonális hatásának vizsgálata a fagyasztathatóságra.
- A cigája, cikta és racka fajták esetében még nem készült átfogó vizsgálat arra nézve, hogy milyen hasonlóságok és különbségek figyelhetők meg a fajták között. Ezért a jövőben nagyobb egyedszámmal folytathatók lehetnek az elemzések.
- A fajták között kimutatott különbségek hátterében az állatok életkora, tartási és takarmányozási viszonyai is befolyásoló hatással bírhattak. Ezeket mindenképpen kontrollálni kell a további vizsgálatok érdekében. A program célja természetesen nem tette lehetővé az egyedkor és tartásmód szerinti kiválogatását, hiszen a program célja a kiemelkedő genetikai értéket képviselő vérvonalak megőrzése volt.

6. Összefoglalás

Az őshonos magyar juhajták génmegőrzésére kiírt „Védett őshonos és a veszélyeztetett mezőgazdasági állatfajták genetikai állományának ex situ vagy in vitro megőrzése” című projekt során gyűjtött ondómintákat vizsgáltunk meg.

A minták begyűjtését és betárolását Herceghalmon, a MATE egyik elődintézményében, a Nemzeti Agrártudományi és Innovációs Központ (NAIK) Állattenyésztési, Takarmányozási és Húsipari Kutatóintézetben (ÁTHK)a, Szaporodásbiológiai, Embriológiai és Génmegőrzési kutatócsoport végezte 2014 és 2017 között a Magyar juh és kecsketenyésztő Szövetséggel együttműködésben.

A projektben összegyűjtött ondóminták elemzését három őshonos magyar kosfajtánál végeztük el: cigája, cikta és racka (fekete és fehér változat) egyedeknél. A vizsgálatban összesen 24 egyedről vett mintát elemeztünk (11 cigája, 7 cikta és 6 racka).

A mintákat különböző spermatológiai minőségi paraméterek alapján, többek között a módosított Kovács-Foote-féle festési eljárással és CASA számítógépes sejtanalizáló rendszer segítségével elemeztük.

A statisztikai analízist IBM® SPSS® statisztikai szofver 29-es verziójával végeztük el. A fajták közötti kölcsönhatást, valamint a tenyész szezonban és szezonon kívüli összefüggéseket kéttényezős varianciaanalízissel (ANOVA) teszttel elemeztük. A szignifikancia szintje $P < 0.05$ volt. A reprezentatív kosminták fagyaszthatóságát egytényezős ANOVA teszttel elemeztük. Khi-négyzet segítségével jellemeztük a fajta és az évszak hatását a fagyaszthatóságra és a génbankba való betárolási arányra.

Az eredmények alapján a vizsgált három juhajta szignifikáns eltéréseket mutatott egymással összehasonlítva. A mennyiséget tekintve a cigája fajta szignifikánsan eltért a cikta és a racka kosok mennyiségétől. A koncentráció mindhárom fajta esetében szignifikánsan eltérő volt. A szezonaritást vizsgálva azt az eredményt kaptuk, hogy tenyész szezonban szignifikánsan nagyobb volt a mennyiség és az összes spermiumszám/ejakulátum.

A fagyasztásra alkalmas minták és a betárolás mértéke alapján nem volt szignifikáns különbség a fajták között. Ugyanakkor - a szakirodalommal ellentétben - a tenyész szezonban vett mintákból szignifikánsan kevesebbet lehetett fagyasztani, mint a szezonon kívül vett mintákból.

A fajta és a szezonális hatását megvizsgáltuk reprezentatív ondóminták spermaminőségi paramétereinek segítségével. A racka értékei (totál motilitás, progresszív motilitás) szignifikáns eltéréseket mutattak a másik két fajtához képest.

A cigája fajta esetében a szezonális változást tekintve szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a VCL, LIN és WOB paramétereknél. A másik két fajta esetében a szezonális változást tekintve nem volt szignifikáns különbség.

A spermiumok membránintegritásának szempontból sem a fajták esetében, sem a szezonális változást tekintve nem tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket.

Az eredmények alapján javaslom, hogy további vizsgálatokat szükséges elvégezni a cigája, cikta és racka kosok szaporodásbiológiai tulajdonságainak összehasonlításának érdekében. Ebben a felmérésben fajtánként viszonylag kevés kos spermamintái álltak rendelkezésünkre, ezért szükséges szélesebb spektrumban megvizsgálni a paramétereket. További vizsgálatok kiterjeszthetők arra nézve, hogy a különböző őshonos juhajtók esetében eltérő spermafagyasztási protokollokat alkalmazzunk-e, illetve elengedhetetlen a szoros és egységes minőségellenőrzési eljárások alkalmazása.

Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a szezonális jelentős befolyással bír a spermaminőségre. Bár a tenyésztési szezonban vett mintákból szignifikánsan kevesebbet lehetett fagyasztani, ennek oka az is lehet, hogy beszállított kosoknak különböztek a tartási, takarmányozási, környezeti körülményei, amelyek mind befolyásolják a spermaminőséget és fagyasztathatóságot.

Összefoglalva eredményeink segíthetnek a juhajtó specifikus krioprezervációs protokollok kidolgozásában, az őshonos magyar juhajtó génmegőrzési programjának a minél hatékonyabb kivitelezésében.

7. Irodalomjegyzék

- Abdel-Rahman H.A., El-Belely M.S., Al-Qarawi, El-Mougy S.A. (2000): *The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds*. Small Ruminant Research Volume 38, Issue 1, 1 September 2000, Pages 45-49
- Aller J.F., Aguilar D., Vera T., Almeida G.P., Alberio R.H. (2012): *Seasonal variation in sexual behavior, plasma testosterone and semen characteristics of Argentine Pampinta and Corriedale rams*. Spanish Journal of Agricultural Research 10.345-352
- Alessandro A.G., Martemucci G. (2002): *Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram*. Anim Reprod Sci. 2003 Nov 20; 79(1-2):93-102. doi: 10.1016/s0378-4320(03)00113-1
- Amann R. P., Waberski D. (2014): *Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments*. Theriogenology. 81 (1), 5-17.
- Anel L., Kaabi M., Abroug B., Alvarez M., Anel E., Boixo J.C., Fuente de la L.F., Paz D. P. (2005): *Association for Animal Production*. Dublin, Ireland, 127.p.
- Asadpor R. (2012): *Relationship between mineral composition of seminal plasma and semen quality in various ram breeds*, Acta Scientiae Veterinariae 40, 1-8.
- Bagi M., Cseh S., Pálfné Vass N. (2023): *A laparoszkópos és transzcervikális termékenyítés alkalmazásának lehetőségei a juhtenyésztésben*. Hungarian Veterinary Journal Vol. 145. No. 2. Budapest, February 2023. Established by Prof. B. Nádaskay, 1878
- Bakonyi G., Juhász L., Kiss I., Palotás G. (2003): *Állattan*. Mezőgazda Kiadó
- Baranyai G., Földi Á., Földi D., Földi Gy., dr. Gáspárdy A., dr. Jánosi J. Zs., Matyóka K., Pap C., Sáfár L., (2017): *Régenhonos juh- és kecskefajtáink*. Budapest, A Magyar Juh- és Kecsketenyésztő Szövetség, 129-123p
- Barbas, J.P.; Pimenta, J.; Baptista, M.C.; Marques, C.C.; Pereira, R.M.L.N.; Carolino, N.; Simões, J. (2023): *Ram Semen Cryopreservation for Portuguese Native Breeds: Season and Breed Effects on Semen Quality Variation*. Animals 2023, 13, 579. <https://doi.org/10.3390/ani13040579>
- Becze J. (1983): *A hímivarú állatok szaporodásbiológiája* Mezőgazda Kiadó, Budapest 241
- Bedő S. (2009): *Nem csak fajtakérdés*. Magyar Állattenyésztők Lapja 37 (11): 16-17
- Bedő S., Holló I., Látits Gy., Póti P., Tözsér J., (szerk.: Holló I.), (2012): *Szemléletváltások az állattenyésztésben*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, ISBN: 978-963-286-673-4, 4. fejezet, Szemléletváltások az állattenyésztésben 58-102.
- Biró I., (1997): *A mesterséges termékenyítés 50 évének alkalmazása a magyar állattenyésztésben*. Országos Mesterséges Termékenyítő Rt. Gödöllő, 5-100 p.
- Bodó I. (2002): *Biológiai sokféleség megőrzése a magyar háziállatfajtákban*, Acta Agraria Debreceniensis, 9:18-29
- Brehm, A., (1903): *Az állatok világa. Emlősök*. Tierleben. Saugetiere. Hungarian translation. Légrády, Budapest, n.d.
- 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 Volume 42, Issue 4, September 1994, Pages 601-611
- Czimmer Gy., Nemes A., Obádovics Cs., Nagy Sz. (2012): *Egyszerűsített hipoozmotikus teszt (hosteszt) alkalmazása ménspermiumok értékelésére*. Állattenyésztés és takarmányozás 2012.61.4.
- Crooke A.C., Mandl A.M. (1947): *A rapid supra-vital staining method for assessing the viability of human spermatozoa*. Nature 159:749
- Csáki T., Flink F., Gábor Gy., Gergátz E., Köcski L., Merész L., Nagy P., Pécsi A., Pécsi
- T., Perjés I., Soós P., Sinkovics Gy., Szász F., Ifj. Szász F., (szerk.: Pécsi T.), (2007): *Házi emlősállatok mesterséges termékenyítése*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, ISBN: 978-963-286- 237-8, A mesterséges termékenyítés fogalma, alkalmazásának indokai 9-10., A mesterséges termékenyítés története 11-12., A spermavétel 81-89., Az ondó vizsgálata 95-103.
- Demeter J., (2002): *A nemzeti tenyésztés és szervezeti keretei*. Állattenyésztés és Takarmányozás 51. 5. 499-514.
- Donovan, A. , J.P. Hanrahan, E. Kummen, P. Duffy, M.P. Boland (2004): *Fertility of the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at natural or synchronised oestrus*, Animal Reproduction Science, 84, 359-368

- Dufour J. J. , Fahmy M. H., Minvielle F. (1984): *Seasonal Changes in Breeding Activity, Testicular Size, Testosterone Concentration and Seminal Characteristics in Rams with Long or Short Breeding Season.* Journal of Animal Science, Volume 58, Issue 2, February 1984, Pages 416–422.
- Dunka B., (2000): *A magyar (hortobágyi) rackajuh in. Eleven örökség-régi magyar háziállatok.*
- Szerk. Bodó I., Agroinform, Budapest, 54-56 p.
- Evenson D.P., Darzynkiewicz Z., Melamed M.R. (1982): *Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility.*
- J. Histochem. Cytochem. 30. 279-280.
- Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium (2008): (FVM) (93/2008 (VII. 24.)) rendelet
- Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium (2008): (FVM) 97/2008 (VII.24.)rendelet
- Gáspárdy A., (2011): *A racka juh elfelejtett változatai.* [cikk.]
URL: <http://mezohir.hu/mezohir/2011/04/a-rackajuh->
- Gáspárdy A., Sáfár L., (2014): *Óshonos juhajtunk:*
- Gáspárdy, A., Eszes, F., Bodó, I., Koppány, G., Keszthelyi, T., Márton, F., (2001): *A cigája (berke) juhajtunk hazai változatainak alkattani összehasonlító vizsgálata.* Állattenyésztés és Takarmányozás 50, 33–42.
- Halbert G. W., Dosbosh, Walton H., Buckrell B.S., B.C. (1990): *The structure of cervical canal of ewe.* Theriogenology, 33. 5. 977-992 p.
- Hankó B. (1937): *A magyar juh eredete, multja és jelene.* Különlenyomat a „Tisia” 2. kötetéből. Nagy ny., Debrecen, 115p.
- Hankó B. (1954): *A magyar háziállatok eredete ősidőktől máig.* Művelt nép, Budapest, 130 p.
- Haraszi J. (1982): *A szaporodás életműködései.* In.: Állatorvosi kórélettan. Szerk.: Karsai F., Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 594-602.p.
- Haraszi J., Zöldág L. (1993): *A háziállatok szülészete és szaporodásbiológiája.* Mezőgazda Kiadó, Budapest, 704-736.
- Horváth A., Vásárhelyi J., Szenci O. (2006): *hímivarsejtek mozgása.* Irodalmi összefoglaló 2. rész. A mozgást vizsgáló módszerek fejlődése. Magyar Állatorvosok Lapja 128. 437-442
- Horváth M. (1983): *A kos és a kecskebak andrológiája.* In. *A hímivarú állatok szaporodásbiológiája.* Szerk. Becze J. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 174.
- Ibrahim, S.A. (1997): *Seasonal variations in semen quality of local and insemination in Churra ewes: a field assay,* Theriogenology, 63, 1235-1247 insemination in sheep using previously frozen semen. Theriogenology, 42. insemination with frozen semen in the ewe using a laparoscope. Japanese Journal of Animal Reproduction, 31. 1. 25-27.
- Jequier, A.M. - Ukombe, E.B. (1983): *Errors inherent in the performance of a routine semen analysis.* Br. J., Urol., 55.434-436.
- Jávör A., Kukovics S., Molnár Gy. (2006): *Juhtenyésztés A-tól Z-ig* Mezőgazda Kiadó, Budapest 376.
- King, M.E., W.A.C. McKelvey, W.S. Dingwall, K.P. Matthews, F.E. Gebbie, M.J.A. Mylne,
- E. Stewart, J.J. Robinson (2004). *Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen-thawed semen with or without oxytocin administration,* Theriogenology, 62, 1236-1244
- Kovács Gy., Fehér Gy. (1973): *Fejlődéstan.* Mezőgazda Kiadó, Budapest 494.
- Kukovics S., Gyökér E., Németh T., Gergácz E., (2011): *Artificial Insemination of Sheep - Possibilities, Realities and Techniques at the Farm Level,* p. 28-42, DOI: 10.5772/16642
- Kukovics S., Jávör A., (2001): *Prospects for small ruminant production and consumption in Eastern Europe,* in: Proceedings of the 52nd Annual Meeting of the EAAP. p. 251.
- Kútvölgyi G., Stefler J., Kovács A. (2006): *Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa.* Biotech. Histochem. Vol. 81. (4-6) p.109 – 117. Erratum in: Biotech. Histochem. 2007. 82: 45.
- Garner, D. L., L. A. Johnson, S. T. Yue, B. Roth, and R. P. Haugland, (1994): *Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide.* J. Androl. 15:620-629.
- Garner D.L., Thomas C.A. (1999): *Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm.* Mol Reprod Dev 53:222- 229
- Kovács A., Foote R.H.(1992): *Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa.* Biot Histoc 67:119-124.

- Központi Statisztikai Hivatal (2022): *Magyarország juhállományának alakulása, juhhús fogyasztás*
- Látits Gy., Sarlós P. (2006): *[Reproduction of sheep]. In: Jávor A, Kukovics S, Molnár Gy (eds): [Sheep breeding from A to Z]. Mezőgazda Press, Budapest, Hungary, 179-2076*
- Magyar K., Márkus Sz., Fazekas G., N. Dankó G., (2008): *A deamtc juh tenyésztelepén alkalmazott különböző termékenyítési módszere.* Gödöllő, 4, p. 274-280
- Managing Global Genetic Resources (1993): *Agricultural Crop Issues and Policies*
- Marai I.F.M., Eld. A.A., Fadiel a., Abdel-Hafez M.A.M (2007): *Physiological traits as affected by heat steress in sheep,* Small Ruminant Research 71. 1-12.
- Marco J. S. Puchades, Gadea J., Vicente J.S., Viudes de Castro M.P. (2005): *Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa.* Theriogenology, 64.8. p.1756-1765, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.006
- Matolcsi J. (1975): *A háziállatok eredete.* Budapest, Mezőgazdasági Kiadó, 257p.
- Mickelsen, W. D., Paisley, L. G., and Dahmen, J. J. (1981). *The effect of season on the scrotal circumference and sperm motility and morphology in rams.* Theriogenology 16, 45–51. doi:10.1016/0093-691X(81)90112-6
- Mihók S. (2002:) *A magyar fajták fennmaradásának szükségessége és esélyei a nemzetközi integrációban.* Állattenyésztés és Takarmányozás 51. 5. 458-471.
- Molina FC, Evans G, Casares PI, Maxwell WMC (1994): *Effects of monosaccharides and disaccharides in Tris based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa.* Animal Reproduction Science 36, 113–122.
- Mucsi András (2010): *Juhtenyésztési alapismeretek II., Szaporodás.* Hódmezővásárhelyi Tudásalapítvány
- Nagy Sz. (2001): *Bikaspermiumok citológiai vizsgálatai doktori (PhD értekezés), „Az állati termék előállítás biológiai, technológiai és ökonómiai kérdései” program „Szarvasmarha termékek előállítása és feldolgozása” alprogramja keretében.* Doktori értekezés, Nyugat- Magyarországi Egyetem, Mosonmagyaróvár
- Nagy Sz. (2002): *Emlős spermiumok membránintegritás-vizsgálatai.* Állattenyésztés és Takarmányozás, 2002, 51. 607-616
- Oláh J., Harangi S., Pécsi T., Kovács A., Jávor A. (2008): *A kosondó minősége és a kondíció közötti kapcsolat vizsgálata.* / AWETH Vol 4. Különszám, Gödöllő
- Oláh J. (2010): *A juhhondót befolyásoló tényezők.* Doktori (Phd) értekezés, Debrecen DE Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola 24 p.
- Ömür A. D., Çoyan K. (2014): *Effect of antioxidants on cryopreservation of ram semen in and out of breeding season.* : Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Vol. 11, No. 1, 37- 42.
- Polichronopoulos, T., Solti L., Gáspárdy A., Cseh S. (2005): *Andrológiai laboratóriumi vizsgálatok, különös tekintettel a sperma számítógépes analizisére.* Állattenyésztés és Takarmányozás, 54.3. 194-197.
- Rauhaus H. (1990): *Untersuchungen zur Morphologie und Lebend-TotFärbung von Spermien einiger Haustierarten.* Inaugural-Dissertation, München
- Ryder, M.L., (1983): *Sheep and Man.* Duckworth, London, 846 pp. ISBN 0-71561-6552. Szabados T., (2007): *A cerviko-uterinális inszeminálás eredményességének vizsgálata juhászatokban.* Doktori (Phd) értekezés, Mosonmagyaróvár. 41-83 p.
- Sarlós, P., Molnár, A., Huszár, Sz., Rátky, J., Brüssow, K.-P. (1996). *Seasonal changes of andrological characteristics in British milk ram.* Arch. Tierz. 39, 265-275.
- Sarlós P., Egerszegi I., Balogh O., Molnár A., Cseh S., Rátky J. (2013): *Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams.* Small Ruminant Research Volume 111, Issues 1–3, April 2013, Pages 90-95
- Swanson E.W., Bearden H.J. (1951): *An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa.* J Anim Sci 10:981-987
- Schwalbach, L. M., Bester, N., J.van der Merwe, H. J., Greyling, J. P. C., Fair M. D. (2004): *The influence of dietary energy concentrations on scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams.* S. Afr. J. Anim. Sci., 34. 53-55.
- Shaffer H.E., Almquist J.O. (1948): *Vital staining of bovine spermatozoa with an eosin-aniline blue staining mixture.* J Dairy Sci 31:677-678
- Štolc L., Stádník L., Ježková A., Louda Received F. (2009): *Relationships among herd, ram breeds, age of rams, sperm density before diluting and sperm motility during thermal survival test.* Acta Universitatis agriculturae et silviculturae mendelianae Brunensis sbonik mendelovy Zmedlske

a Lesnicke Univerzity v Brne March 12. 2009

- Sutovsky P, Navara CS and Schatten G. (1996): *The fate of sperm mitochondria and the incorporation, conversion and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization in vitro*. Biol Reprod 55:1195-1205
- Szabó F., Sebestyén S., Kovács J., Kukovics S., Jávör A., (2002). *Világfajták szerepe a tömeges minőségi áruterelésben*. Állattenyésztés és Takarmányozás 51. 5. 472-498.
- Vozaf A., Svoradová A., Baláži A., Vašíček J., Olexiková L., Dujíčková L., Makarevich A.V
- ., Jurčík R., Ďuranová H., Chrenek P. (2022): *The Cryopreserved Sperm Traits of Various Ram Breeds: Towards Biodiversity Conservation*. Animals (Basel) 2022 May 20;12(10):1311. doi: 10.3390/ani12101311.
- Wulster-Radcliffe., M. C. Williams, M. A. Stellflug, J. N. Lewis, G. S. (2001): *Technical note: Artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams*. J. Anim. Sci. 79. 2964- 2967.
- Wulster-Radcliffe M.C., Lewis G.S. (2002): *Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility*. 58, 7 1361-1371 Theriogenology
- Zamiri, M.J., Khalili, B., Jafaroghli, M., Farshad, A. (2010): *Seasonal variation in seminal parameters, testicular size, and plasma testosterone concentration in Iranian Moghani rams*. Small Ruminant, Research 94. 132-136.
- Zhang, B.R., Larsson, B., Lundeheim, N., Rodriguez, Martinez, H. (1998): *Sperm characteristics and zona, pellucida binding in relation to field fertility of frozen, thawed semen from dairy AI bulls*. Int J Androl., 21.4.207-216
- **Internetes források**
- <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=99500081.tv> 1995. évi LXXXI. Törvény a Biológiai Sokféleség Egyezmény kihirdetéséről, megtekintés: 2023.09. 20.
- Magyar Juh- és Kecsketenyésztő Szövetség honlapja, Fajtaleírások
- <https://mjksz.hu/tenyesztes/fajtak>, megtekintés: 2023.10.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet konzulenseimnek, Dr. Kútvölgyi Gabriellának és Dr. Bodó Szilárdnak, azért a kiemelkedő segítségért és támogatásért, amit a dolgozatom elkészítése során nyújtottak. A kutatási témában való elmélyülésre és a dolgozat megírására nem lett volna lehetőségem a segítségük és iránymutatásuk nélkül. Nemcsak szakmai segítséget nyújtottak, hanem felkeltették az érdeklődésemet a kutatási téma iránt. Munkájuk, elkötelezettségük példaként szolgálnak számomra és inspirálnak, hogy a jövőben is továbbfejlesszem magam a szakterületemen.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani a Szaporodásbiológiai, Embriológiai és Génmegőrzési kutatócsoport minden tagjának, mert a projekt során segítettek a minták fagyasztásában és a reprezentatív mintákhoz szükséges felolvasztásban.

Külön köszönöm Malam Abulbashar Mujtabának a statisztikai elemzésben nyújtott segítségét

