

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 7

Issue 4

Különszám

Gödöllő
2011



ELŐZETES VIZSGÁLATOK GYÖNGYTYÚK SPERMIUMOK MÉLYHŰTÉSÉRE

Váradí Éva, Végi Barbara, Barna Judit

Kisállattenyésztési Kutatóintézet és Génmegőrzési Koordinációs Központ

2100 Gödöllő, Isaszegi út 200.

varadievi@hotmail.com

Összefoglalás

Hazai agrárstratégiánk kiemelt jelentőségű területe a nagy genetikai értékeket képviselő régi háziállatfajok és fajták hosszú távú megőrzésének támogatása. Mindez az *in vivo* génbankok mellett az *in vitro* génbankok kialakításának fontosságára hívja fel a figyelmet. Baromfifajok esetében egyelőre erre a célra az ondó mélyhűtéses tárolása a leggyakorlatiasabb megoldás. Az egyes baromfifajok mélyhűthetősége eltérő, közülük a gyöngytyúk spermiumai tolerálják legkevésbé a fagyasztást.

Vizsgálatunkban négyféle hűtési protokollt hasonlítottunk össze gyöngytyúk spermán: lassú és gyors programozott hűtést (1,2), nitrogén gőzben történő hűtést (3) és egy pellet formában történő vitrifikációs eljárást (4). Az eltérő hűtési ráták mellett a különböző krioprotektánsok hatását is vizsgáltuk (10% EG, 6% DMF és 6% DMA). A spermiumok a lassú, 10% EG-t tartalmazó, programozott illetve a vitrifikációs módszer esetében produkálták a legmagasabb túlélést az élő normális morfológiájú sejtekre vonatkoztatva (23,5 és 28,6%). A vitrifikációs eljárással szignifikánsan jobb ($p \leq 0.05$) túlélési arányt értünk el.

Kulcsszavak: gyöngytyúk, ondómélyhűtés, *in vitro* génbank

Preliminary study on freezing of guinea fowl spermatozoa

Abstract

To support the rescue of the valuable indigenous domestic animal species is an important field of the new Hungarian agricultural strategy. In the case of poultry species semen cryopreservation is the most



practical method for the long term storage of the genetic material. The freezeability of guinea fowl spermatozoa is the poorest among the various poultry species.

In our study four freezing protocols of guinea fowl sperm were compared: slow and fast programmable method (1,2), freezing in nitrogen vapor (3), and vitrification using pellets (4). Above the effect of different freezing rates 3 types of cryoprotectant were tested as well (10% EG, 6% DMF és 6% DMA). The highest survival rate of live, intact spermatozoa were found in slow programmable protocol (with 10% EG) and vitrification (23,5 vs. 28,6%). The differences proved to be significant ($p \leq 0.05$).

Key words: guinea fowl, sperm freezing, cryobank

Irodalmi áttekintés

Napjainkban a régi őshonos állatfajok és fajták genetikai változatosságának megőrzése kiemelt figyelmet követel világszerte. Ismert, hogy az *in vivo* génbankok számos kockázatot hordoznak, ezért nélkülözhetetlen *in vitro* génbankok kialakítása is. Madaraknál erre a célra egyelőre az ondó mélyhűtéses tartósítása az elérhető megoldás (Gee, 1995; Reedy és mtsi, 1995). Habár a spermiumok mélyhűtésével csak a hím genomot (ZZ) tudjuk megőrizni, hat generációs visszakeresztezésekkel visszanyerhető az eredeti genotípus (Blesbois, 2007).

Az egyes baromfifajok ondómélyhűtésének eredményessége nagymértékben eltér egymástól. A házityúk és pulyka fajokhoz viszonyítva a gyöngytyúk spermiumai tolerálják legkevésbé a fagyasztást, feltehetően a spermiumok membránjának eltérő tulajdonságai miatt (Blesbois és mtsi, 2005). A szakirodalomban csupán egyetlen gyöngytyúk ondómélyhűtésére vonatkozó adatot találtunk. Seigneurin és Blesbois (2006) módszerükben közepes hűtési ráta mellett 6 % dimetil-formamidot (DMF) alkalmaztak, mellyel 37 %-os sejttúlélést és 20%-os termékenységet tudtak elérni. A lassú, programozott mélyhűtési eljárások mellett biztatóak Tselutin munkacsoportjának vitrifikációs eljárásra vonatkozó korábbi vizsgálatai (1995), ahol viszonylag magas (70-80%) termékenységi rátát tudtak elérni egyes baromfifajoknál, de ők gyöngytyúk spermával nem foglalkoztak.

Anyag és módszer

Állatok és tartásuk

30 egy éves gyöngytyúk kakastól történt a mintavétel heti 2 alkalommal 2 hónapon keresztül. Az egyedi ketrecekben elhelyezett kakasok szabvány kakastápot fogyasztottak, önitatókból ittak *ad libitum*. A megvilágítás természetes fény mellett mesterséges kiegészítéssel történt, napi 16 óra időtartamban.

Ondóvétel és ondóminősítés

A spermadonor állatok kiválogatását a kezelhetőség, illetve az ondóvételre való reagáló-képesség, majd az egyedi ondóbírálati adatok alapján végeztük. Az ondóvétel *Burrows és Quinn (1937)* dorso-abdominális masszázstechnikájával történt.

Ondómélyhűtési protokollok

1. táblázat: Az ondómélyhűtési protokollok kísérleti leírása

Kísérleti leírás							
Protokoll	Lassú		Gyors		N ₂ gőz		Pellet
Tároló típusa	ampulla						
Hígító	Lake-féle hígító						Tselutin-féle hígító
Hígítási arány	1:3						1:1
Equilibrációs idő	25 perc 3°C-on		5perc 5°C-on		5perc 5°C-on		20 perc 2°-on
Hűtési ráta	1°C/perc -30°C-ig 30°C/perc -60°C-ig		-15°C/perc -30°C-ig -30°C/perc -60°C-ig		Mintákat 4 cm-re a folyékony nitrogén fölé helyeztük (95 °C)		közvetlenül a folyékony nitrogénbe cseppentve
Krioprotektáns	10% EG	6% DMF	10% EG	6% DMF	10% EG	6% DMF	6% DMA

Table 1: Experimental design of freezing protocols

Lassú protokoll (1)

Spermavétel után a kevert mintát előhűtött csőbe raktuk és 1:3 arányban hígítottuk Lake-hígítóval (*Lake, 1986*) szobahőmérsékleten. A hígított mintákat két részre osztottuk, az egyikhez 10% etilén-glikolt (EG), a másikhoz 6% dimetil-formamidot (DMF) adtuk védőanyagként, majd az így előkészített mintákat 200 µl mennyiségben ampullákba mértük. A csöveket programozható mélyhűtőbe (Planer KRYO_10) helyeztük. A hűtést 20°C-ról indítottuk 3°C/perc hűtési ütemmel 3°C-ig, 25 perces 3°C-on történő equilibrációt követően 1°C/perces hűtési sebességgel -30°C-ig, majd 30°C/perces ütemben -60°C-ig hűtöttük, végül folyékony nitrogénbe helyeztük az ampullákat. A felolvasztás 5°C-on történt hűtőpultban.

Gyors protokoll (2)

A minták előkészítése a lassú protokollal azonosan történt, azonban a hígítást követően egy 5 perces, 5°C-on történő equilibrációt alkalmaztunk. A krioprotektánsok (10% EG ill. 6% DMF)



hozzáadása után megtörtént a szétmérés az ampullákba (200 μ l), melyeket a fagyasztógépbe helyeztünk. 5°C-os hőmérsékletről indulva -15 °C/perces hűtési rátát alkalmaztunk -30°C-ig, majd -30°C/perces ütemmel -60°C-ig hűtöttük az ampullákat.

Nitrogéngőzben történő mélyhűtés (3)

A minták előkészítése megegyezett a gyors protokollnál leírtakkal, azonban a szétmérést követően az ampullákat folyékony nitrogént tartalmazó hungarocell dobozban levő állványra helyeztük 4 cm-es magasságban a folyékony nitrogén felszíne fölött 5 percig. Ezt követően kerültek a folyékony nitrogénbe. A felengedés 38°C-os inkubátorban történt.

Pellet-módszer (4)

Spermavételt követően a kevert mintát 1:1 arányban hígítottuk Tselutin-féle hígítóval (*Tselutin és mtsi, 1995*) szobahőmérsékleten, majd 2°C-os hűtőpultban 20 perces equilibráció után hozzáadtuk a DMA-t (dimetil-acetamid) 6%-ban. Ezt követően pipetta segítségével 25 μ l térfogatban közvetlenül a folyékony nitrogénbe csöppentettük a kezelt spermamintákat. Az így keletkező golyócskákat ampullákba helyeztük, majd folyékony nitrogénben tároltuk. A felolvasztást 70°C-on végeztük egy saját fejlesztésű automatikus készülékkel.

Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai feldolgozásához *Mann-Whitney teszt*-et használtunk (Statistica, Version 7.0).

Eredmények és értékelés

A spermiumok a lassú, 10% EG-t tartalmazó, programozott (Protokoll 1) illetve a pellet módszer (Protokoll 4) esetében produkálták a legmagasabb túlélést az élő normális morfológiájú sejtekre vonatkoztatva (23,5 és 28,6%). A vitrifikációs eljárással szignifikánsan jobb ($p \leq 0.05$) túlélési arányt értünk el, míg a legrosszabb túlélést a nitrogéngőzben történő mélyhűtés esetében (Protokoll 3) tapasztaltunk. A 6% DMF-et alkalmazó, közepes hűtési rátával nem tudtuk a szakirodalomban bemutatott eredményeket produkálni (Protokoll 2) (*1. ábra*).

Annak ellenére, hogy a 10% EG-t alkalmazó 1-es protokoll esetében magasabb volt az élő sejtarány a pellet módszerhez képest (41% vs 31%), a lassú protokoll szignifikánsan ($p \leq 0.05$) több rendellenes sejtet produkált (23 vs 10%), tehát a legmagasabb élő sejt számot a pellet módszernél találtuk (*2. ábra*).

1.ábra: Élő, ép sejtek túlélési aránya a különböző mélyhűtési eljárásokat követően

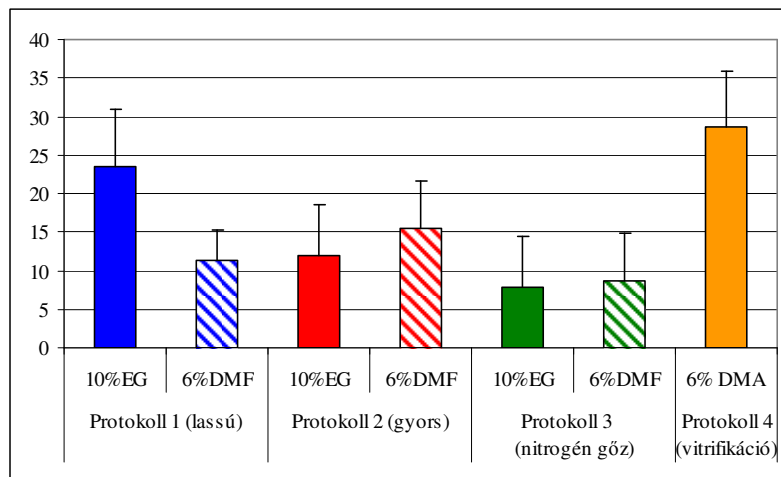


Figure 1: Survival rate of live, intact spermatozoa after various freezing methods

2.ábra: A fagyasztást és felengedést követő változások a spermiumok minőségében

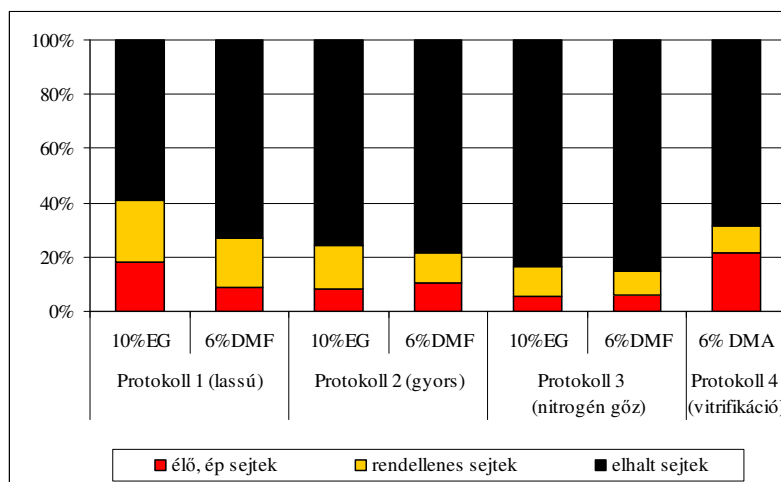


Figure2: Sperm quality after freezing/thawing

Következtetések és javaslatok

In vitro vizsgálataink azt igazolták, hogy a DMF krioprotektánsnak az adott koncentrációban nincs megfelelő védőhatása a gyöngytyúk spermiumokra semmilyen hűtési ráta mellett, viszont az EG - lassú hűtés esetén – viszonylag jó túlélést biztosít. A legígéretesebbnek a vitifikációs technika bizonyult, mely módszert újabban olasz kutatók sikeresen adaptálták pulyka spermiumok mélyhűtésére (Iaffaldano és mtsi, 2011). Ők 42%-os spermium-túlélést értek el, amely figyelembe véve, hogy a pulyka spermiumok -



a gyöngytyúkéhoz hasonlóan - is érzékenyek a fagyasztásra, biztató eredménynek számít. Fontos kihangsúlyozni, hogy a mélyhűtés eredményességének megítélésében az *in vitro* vizsgálatoknál az élő, normális morfológiájú spermiumok *túlélési* aránya a mérvadó, mert a felolvasztás utáni élő sejtarány félrevezető lehet. Természetesen a spermamélyhűtési vizsgálatok eredményességét termékenyítésekkel lehet döntően igazolni, vizsgálatainkat ebben az irányban a két jó eredményt adó technikával folytatjuk.

Köszönetnyilvánítás

Vizsgálatainkat a francia-magyar bilaterális projekt (TET_09_FR_ANR_BIO-CryoBird) keretein belül a Nemzeti Innovációs Hivatal támogatta.

Irodalomjegyzék

- Blesbois, E., Grasseau, I., Seigneurin, F. (2005): Membrane fluidity and the ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. *Reproduction*. 129:371-378.
- Blesbois, E. (2007): Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science J.* 63:213-222.
- Burrows, W.H. and Quinn, J.P. (1937): The collection of spermatozoa of domestic fowl and turkey. *Poultry Science* 16:19-24.
- Gee, G.F. (1995): Artificial insemination and cryopreservation of semen from nondomestic birds. *In: Proceedings First Symposium on the Artificial Insemination in Poultry*. Ed. Bakst, M.R. and Wishart G.J. 262-280.
- Iaffaldano, N., Romagnoli, L., Manchisi, A., Rosato, M.P. (2011): Cryopreservation of turkey semen by the pellett method: Effects of variables such as the extender, cryoprotectants concentration, cooling time and warming temperature on sperm quality determined through principal components analysis. *Theriogenology* 76:794-801.
- Lake, P.E. (1968): Observation of freezing fowl spermatozoa in liquid nitrogen. *Proc. 14th World Poultry congress*. Vol.2. pp. 279-282. Madrid, Spain.
- Reedy, S.E., Leibo, S.P., Clark, M.E. and Etches, R.J. (1995): Beyond Semen Freezing. *In: Proc. First Symposium on the Artificial Insemination in Poultry*. Ed. Bakst, M.R. and Wishart G.J. 229-250.
- Seigneurin, F. and Blesbois, E. (2006): The first method of cryopreservation of guinea fowl semen. WPSA. <http://www.animalscience.com/uploads/additionalFiles/wpsa.htm>, 23:1-1.
- Tselutin, K., Narubina, L., Mavrodina, D., Tur, B. (1995): Cryopreservation of poultry semen. *British Poultry Sci.* 36:805-811.