

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 16

Issue 1

Gödöllő
2020

IVARI KROMOSZÓMÁK ARÁNYÁNAK VIZSGÁLATA INTERSZEX KECSKE KIMÉRA SZÖVETEIBEN

*Klecska Eszter¹, Biró Bálint^{1,2}, Egerszegi István¹, Fábíán Renáta^{1,2},
Hiripi László², Oláh János³, Kovács András³, Bodó Szilárd^{1,4}*

¹Szent István Egyetem, 2100 Gödöllő, Páter Károly út 1.

²NAIK-Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, 2100Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u.4.

³Debreceni Egyetem, 4032 Debrecen, Böszörményi út 138.

⁴NAIK-Állattenyésztési, Takarmányozási és Húsipari Kutatóintézet, 2053 Herceghalom,
Gesztenyés út 1.

biro.balint@abc.naik.hu

Received – Érkezett: .19. 11. 2019.

Accepted – Elfogadva: .12. 04. 2020.

Összefoglalás

Az emlősállatok kimérizmusának számos megjelenési formáját ismerjük. A kimérák genetikai állományukat tekintve eltérő származású sejtekből állnak. Az élettudományban a kiméra modellek óriási jelentőséggel bírnak (pl.: őssejtkutatás, xenotranszplantáció). A jelenség hátterében a *Bovidae* családnál, leggyakrabban az ellenkező nemű ikervemhesség esetén kialakuló freemartinizmus áll. Az embrionális fejlődés különböző szakaszaiban a magzatoknál a placenta véredény anasztomózisok révén az ikrek vére, hormonjai és egyes vérképző sejtjei keveredhetnek egymással. Ez a folyamat a nőivarú egyed meddőségéhez vezethet. A jelen tanulmányban vizsgált kecske kiméra eltérő nemű ikervemhességből született, és a vérszövetek kromoszóma vizsgálata során XX-XY (52-48%) genotípust mutatott.

Célunk az volt, hogy 13 szövettípusban meghatározzuk a ivari kromoszómák arányát. Ennek kimutatása az AMEL génre tervezett, fluoreszcens jelölt primer segítségével, PCR-rel történt. A fragmentanalízist követően, AUC aránypárosítással megkaptuk a különböző szövetekben található ivari kromoszómák arányát. Az eredményekből egyértelműen látszott, hogy ez az arány szövettípusonként eltérő képet mutatott. Ezek után a szexdeterminációhoz használt AMEL gén ivari kromoszóma specifikus fragmentjeinek klónozása és szekvenálása történt. A szekvenciaillesztés során láthatóvá vált az Y kromoszóma specifikus AMEL gén deléciója.

Kulcsszavak: kiméra, freemartinizmus, kromoszóma, kecske

Investigation of xy ratio in different tissues of an intersex goat chimera

Abstract

Many forms of chimerism in mammals are known. Chimeras are made up of cells of different origins. In life science, chimeric models are important (eg. stem cells, xenotransplantation). The most common background of chimerism in the *Bovidae* family is freemartinism, which develops during different sex gestations. At different stages of embryonic development, the fetal vasculatures form anastomoses in the placenta, allowing the twins' blood to mix, which results in

the exchange of hormones and some hematopoietic cells. This can lead to female infertility. The goat chimera of this study was born from twin gestation and showed genotype XX-XY (52-48%) in the blood cell assay.

Our goal was to determine the ratio of sex chromosomes in 13 tissue types. This was detected by PCR using a fluorescent labeled primer designed for AMEL gene. Fragment analysis followed by AUC ratio matching gives the ratio of sex chromosomes in various tissues. We found that this ratio is different in the studied tissues. Afterwards, AMEL fragments were cloned and sequenced. Sequence alignment revealed the deletion of AMEL-Y gene.

Keywords: chimera, freemartinism, chromosome, goat

Irodalmi áttekintés

Szabályos embrionális ivari differenciálódáskor a kromoszómális, a gonadális, a genitális és a viselkedésben megnyilvánuló ivar összhangban van egymással. Az összhang megbomlásakor alakulhatnak ki az ivarszervek rendellenességei. Ezeknek hátterében az esetek nagy részében az interszexualitásnak valamelyik típusa áll (Bordán és mtsai, 2015). Interszexualitáson azt értjük, amikor az embrionális kori ivarfejlődés különböző belső vagy külső hatások miatt szabálytalan irányban halad. Kialakulása egyrészt lehet öröklött alapú. Monogénes öröklésmentnél beszélhetünk például Müller-cső-perzisztencia szindrómáról, tesztikuláris feminizációról, XX hím ivari átfordulásról és XY nőstény ivari átfordulásról is. Másik lehetséges ok a nem-örökletes fejlődési rendellenességek kialakulása, ide soroljuk például a kromoszóma kimérizmust és az ivari kromoszómák számbeli rendellenességeit. Interszexualitáson belül számos megjelenési formát ismerünk, amelyek pontos megállapítása nagy szakértelmet igényel a tünetek sokszínűsége miatt (Zöldág, 2003).

Kromoszóma kimérizmusról akkor beszélhetünk, amikor egy szervezeten belül különböző kromoszóma-garnitúrával rendelkező sejteket találunk. Ezek a sejtek kettő vagy több zigótából is származhatnak. Az elváltozás részletes citológiai vizsgálattal állapítható meg, mivel a kromoszóma-összetétel szövetenként változó képet mutathat (Hámori, 1974). A jelenség hátterében a *Bovidae* családnál, leggyakrabban az ellenkező nemű ikervemhesség esetén kialakuló freemartinizmus áll. Kiváltó oka, hogy a placentában keletkező véredény összeköttetések (anasztomózisok) révén a magzati sejtek és androgén hormonok átkerülhetnek az egyik magzathoz a másikba, mely kifejezett problémát különmemű kétpetéjű ikrek esetében okoz (Lillie, 1916, Padula, 2005, Kozubska-Sobocińska és mtsai, 2016). A nőivarú embrióban a hím nemi hormonok (tesztoszteron, anti-Müllerian hormon) hatására genitális fejlődési zavar alakul ki, a petefészek fejletlenek lesznek, a női nemi hormonok termelésére képtelenek, ami meddőséghez vezet. Megfigyelhető herék vagy ovotestis (gonádtípus, melyben a petefészekre és a herére jellemző szövetek is megtalálhatóak) kialakulása a petefészek mellett, belső nemi szervek morfológiai képe mindkét nemre jellemző, méhük kicsi és fejletlen, a méhnyak gyakran hiányzik. Egyidejűleg van jelen a szervezetben Müller- és Wolff-cső is (Padula, 2005). Külső nemi szervek az esetek nagy részében nőivarra emlékeztetnek, de interszexuális átmenetet is képezhetnek (Rota és mtsai, 2002). Gyakori jelenség, hogy a freemartin egyedek vaginája rövidebb, mint az egészséges nőivarú egyedeké, ami alapján az ikerellésből született, látszólag nőstény nőivarú állatok elsődleges szelektálását lehetne végezni. Pontos eredményt azonban csak a genetikai vizsgálatok adhatnak (Eldridge és Blazak, 1977, Pourjafar és mtsai., 2012, Kozubska-Sobocińska és mtsai, 2016).

Amennyiben vérképző őssejtek is átjutnak a recipiens embrióba, azok be tudnak épülni a csontvelőjébe és más vérképző szerveibe, ott pedig a postnatális életszakaszban is működésre és osztódásra képesek (Hámori, 1974). Minden esetben megállapítható a vörösvérsejt-kimériszmus. A sejteikben megtalálható ivari kromoszómák aránya sejt- és szövettípusonként eltérő lehet, a vérben ez az arány 50-50% körül alakul (Zöldág, 2003). A különböző szövetekben mérhető arány nagymértékben függ attól, hogy a zigóták sejteinek keveredése az embrionális fejlődés mely szakaszában következett be. Az embriófejlődés korai szakaszában történik az ivari elkülönülés, majd a gonádok differenciálódása, így minél korábban képződnek anasztomózisok, annál súlyosabb formában alakulhat ki freemartinizmus (Kumar és Lakshman, 2019).

A freemartinizmus leggyakrabban szarvasmarhánál fordul elő, mivel az ikervemhességek több mint 90%-ánál kialakulnak anasztomózisok mind az egynemű, mind a különemű magzatok között (Padula, 2005). Kiskérődzők esetében a freemartinizmus kialakulásáról kevés információ áll rendelkezésünkre, mivel kevés tudományosan dokumentált eset van, de a néhány meglévő szakcikk alapján az ikervemhességek közel 5%-ából születnek freemartin egyedek (Szatkowska és mtsai, 2004). Az interszexuálítás valamelyik típusával született kecskegidák közül pedig 6% tartozik a freemartinok közé (Pourjafar és mtsai, 2012).

A freemartinizmusnak gazdaságilag és az élettudományban is nagy jelentősége van. A tejtermelő állományokban nemkívánatosnak számítanak ezek az állatok terméketlenségük miatt. A meddőség gyakran csak felnőttkorban derül ki, így ezeknek az állatoknak a felnevelése komoly gazdasági kiesést eredményezhet. Hústermelés szempontjából viszont a freemartin nőivarúak felülmúlják az egészséges nőivarúakat, így ezek hizlalásra alkalmas állatok lehetnek (Padula, 2005). A téma jelentőségét tovább növeli az a tény, hogy a tartástechnológiai újítások következtében az ikerellések száma növekvő tendenciát mutat. Ez a folyamat szarvasmarha és kiskérődzők esetén is megfigyelhető (Santolaria és mtsai, 2011; Gáspárdy és mtsai, 2018; Kozubská-Sobocinska és mtsai, 2019). Természetesen az ikervemhességek növekvő számának következtében a freemartinizmus előfordulási gyakorisága is jelentős növekedést fog mutatni, ami még fontosabbá teszi egy egyszerűen kivitelezhető, költséghatékony diagnosztikai módszer meglétét. Ezen kívül, gyakran alkalmaznak freemartin kimérákat őssejt kutatásban és immunológiai vizsgálatokban is (Niku és mtsai, 2004).

Kutatásunk célja az volt, hogy 13 szövettípusban meghatározzuk az ivari kromoszómák arányát egy olyan kecskében, amelynek az előzetes vérvizsgálata során megállapítottuk a kromoszóma kimériszmust. Munkánk ezen része (az ivari kromoszómák arányának szöveti alakulása) főként alapkutatási jelentőséggel bír. A kutatás gazdasági jelentőségét az adja, hogy az általunk alkalmazott módszerekkel már egészen fiatal korban minimálisan invazívan (szöveti minta nyerése fülporcból krotális behelyezése során) meg lehet állapítani a kimériszmus tényét. Ennek megfelelően jelen vizsgálattal az volt a célunk, hogy egy olyan egyszerűen kivitelezhető, megbízható módszert implementáljunk, ami lehetőséget ad a szakembereknek, hogy a gazdálkodást szakmailag megalapozott módon tervezhessék a tenyésztésbe nem vonható, steril egyedek időben történő kivonásával.

Anyag és módszer

A vizsgálathoz szükséges szöveti mintákat egy olyan nőivarú kecskéből vettük, ami a tenyésztésbevitel után többszöri termékenyítés ellenére sem vemhesült. Ismert volt, hogy az állat eltérő nemű ikervemhességből született, így felmerült a freemartinizmus lehetősége. Az előzetes vizsgálat során a vérből egyértelműen kimutatható volt az Y kromoszóma jelenléte. A részletes

vér kromoszóma vizsgálat alapján megállapítottuk, hogy a genotípusa 52%-ban XX, 48%-ban pedig XY volt. Ezt követően az állat levágásra került és 13 különböző szövetből történt mintavétel. A mintázott szövetek a következők voltak: agy, bőr, szív, izom, tüdő, gyomor, máj, lép, vese, bél, húgyhólyag, csontvelő és here. A szöveteket PBS oldatban átmostuk, majd a felhasználásig -70°C -on tároltuk.

A kutatás első részében az ivari kontroll minták vizsgálatát végeztük. Ezek krotáliával való jelölés során a fülből eltávolított porc szövetdarabok voltak, amelyekből fenol-kloroformos extrakcióval izoláltuk a genomi DNS-t, majd PCR-rel megállapítottuk, hogy valóban XX anyától és XY baktól származnak-e. Ezeket a mintákat használtuk később a PCR reakció optimalizálásához hőmérséklet, majd ciklus gradiens amplifikációkat folytatva. Az ismert genotípusú tényleges ivari kontrollok mintákból háromtagú hígítási sort készítettünk. Ezeknek a mintáknak a fluoreszcens értékeit használtuk a 13 szöveti minta eredményeinek validálására. A PCR-hez az AMEL génszekvenciára tervezett fluoreszcens jelölt primereket használtuk. A forward primer szekvenciája: 5'-ctccatgactccaaccaac-3'. A reverz primer szekvenciája: 5'-acttctcccgttggtctt-3'.

Ezután következett a 13 minta vizsgálata. Lizis puffer és proteináz-K hozzáadásával egy éjszakán át 37°C -on ráztuk a szöveteket. A genomi DNS izolálását ebben az esetben is fenol-kloroformos módszerrel végeztük. A koncentráció vizsgálatot követően (NanoDrop) $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ -re hígítottuk a mintákat. A PCR programnál a már előzetesen megállapított ciklusszámot és primer tapadási hőmérsékletet alkalmaztuk (1. táblázat).

1. táblázat: A PCR program beállításai

1. fázis Kezdeti denaturáció	2. fázis x 27 ciklus			3. fázis Végző lánchosszabbítás
	Denaturáció	Kitapadás	Lánchosszabbítás	
98°C	98°C	55°C	72°C	70°C
5 perc	5 másodperc	5 másodperc	10 másodperc	1 perc

Table 1: The applied PCR settings

A fragmentanalízist a gödöllői székhelyű Biomi Kft. végezte. A visszakapott adatokat Peak Scanner programmal kiértékelve, AUC aránypárosítással megkaptuk a különböző szövetekben található ivari kromoszómák arányát.

Ezek után a szexdeterminációhoz használt AMEL gén ivari kromoszóma specifikus fragmentjeinek klónozása és szekvenálása történt. A klónozáshoz használt vektor a pJET 1.2 blunt plazmid volt, amelyen egy letális szelekciós marker található. Ebbe a plazmidba ligáltuk be az inszertet, amelyet PCR-rel sokszorosítottunk fel Phire Hot Start II DNS polimeráz enzim használatával, ami tompa véget eredményez. A ligált plazmiddal a *DH5a E. coli* törzset transzformáltuk, majd ampicillines ($1\mu\text{l}/1\text{ml}$) szilárd LB táptalajon növesztettük 37°C -on egy éjszakán át. A letális markerre és ampicillinre alapozott szelekcióban, csak azokból a baktériumokból tudott telep fejlődni, amelyben az inszerttel rendelkező plazmid jelen volt. A felnőtt telepeket folyékony ampicillines ($\mu\text{l}/\text{ml}$) LB tápoldatba átolítottuk és egy éjszakán át 37°C -on ráztuk. A következő napon ezekből a bakteriális sejtszuszpenziókból izoláltuk a plazmidokat Macherey Nagel™ NucleoSpin Plasmid EasyPure kittel. Az izolátumokból 300 ng -nyit küldtünk el szekvenálni. A szekvenálást az Eurofins Genomics végezte.

A visszkapott AMEL-X és AMEL-Y szekvenciákat szekvencia illesztő program segítségével hasonlítottuk egymáshoz.

Eredmények és értékelés

Az 1. ábrán bemutatott eredményekből egyértelműen látszik, hogy az ivari kromoszómák aránya szövettípusonként eltérő képet mutat. Az általunk vizsgált 13 szövettípus mindegyikében kimutatható volt az Y kromoszóma jelenléte is.

1. ábra: A különböző szövetek ivari kromoszóma aránya

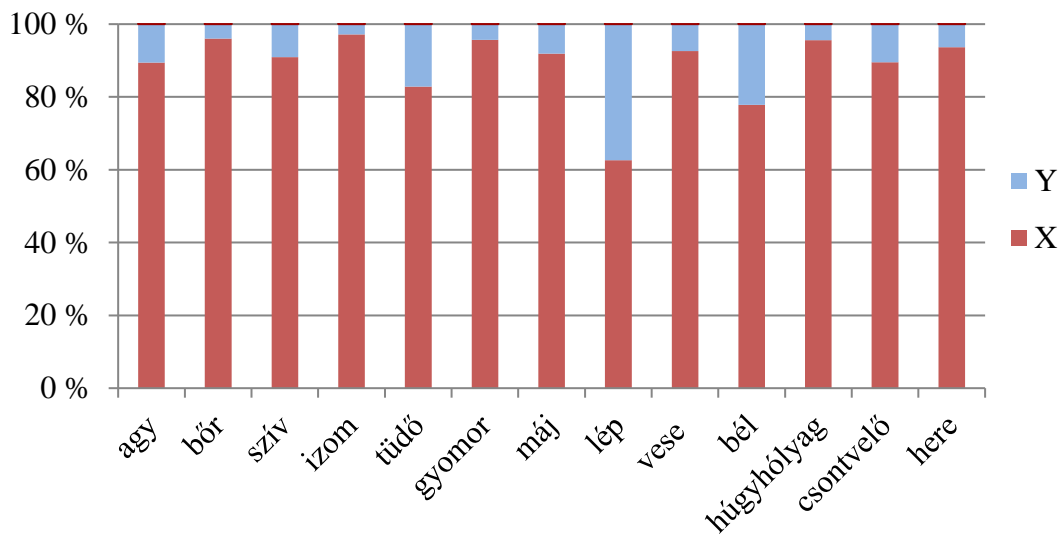


Figure 1: The sex chromosome ratio amongst different tissues

Valamennyi szövetben az X kromoszóma 80% feletti részesedéssel volt jelen. Kivételt képeznek a lépből és a bélből származó minták. A lépből vett minta esetén volt tapasztalható a legnagyobb negatív irányú eltérés az átlaghoz viszonyítva, míg a bőr, az izomszövet és a húgyhólyag mutatta a legmagasabb, 95% feletti X kromoszóma arányt.

A kromoszóma arányokból következtetni lehet a szöveteken belül megtalálható sejtek ivararányára is (2. táblázat). Ebben a tekintetben is az előzőleg említett bőr, izomszövet és húgyhólyag minták mutatták a legmagasabb XX ivarú sejt jelenlétet.

2. táblázat: Sejtek ivararánya szövettípusonként (%)

	XX	XY		XX	XY		XX	XY
Agy	79	21	Gyomor	91	9	Húgyhólyag	91	9
Bőr	92	8	Máj	84	16	Csontvelő	79	21
Szív	82	18	Lép	25	75	Fejletlen here	87	13
Izom	94	6	Vese	85	15			
Tüdő	66	34	Bél	56	44			

Table 2: The cellular sex ratio amongst different tissues

A szekvenciaillesztés (2. ábra) során láthatóvá vált az Y kromoszóma specifikus AMEL gén deléciója. A 2. ábrát szemlélve feltűnően sok a két összehasonlított szekvencia közötti nem egyező nukleotid, ún. mismatch. Ez az elszigetelten megjelenő egy nukleotid párt érintő egynukleotidos polimorfizmus (ún. SNP-k) esetekben teljes mértékben természetes. Ilyen SNP-k láthatók például a 70-80-as és a 110-120-as pozíciójú nukleotidok között. A kettő, három esetenként négy nukleotidos mismatch-ek (például 60-70-es, 160-as és 190-200-as pozícióban) egyértelműen szekvenálási hibáknak tudhatók be, amelyek a szekvenálási fájlok kromatogramjain jól láthatók (ezeket a kromatogramokat itt nem mutatjuk be).

A 170-es pozícióban látható ún. GAP a Multalin többszörös szekvenciaillesztéseket lehetővé tevő online program által használt Needleman-Wunsch algoritmus pontozási mátrixára vezethető vissza. Ez a négy nukleotidos GAP a szekvenciaillesztés eredményét nem befolyásolja.

2. ábra: AMEL-X és AMEL-Y szekvenciák páros illesztése

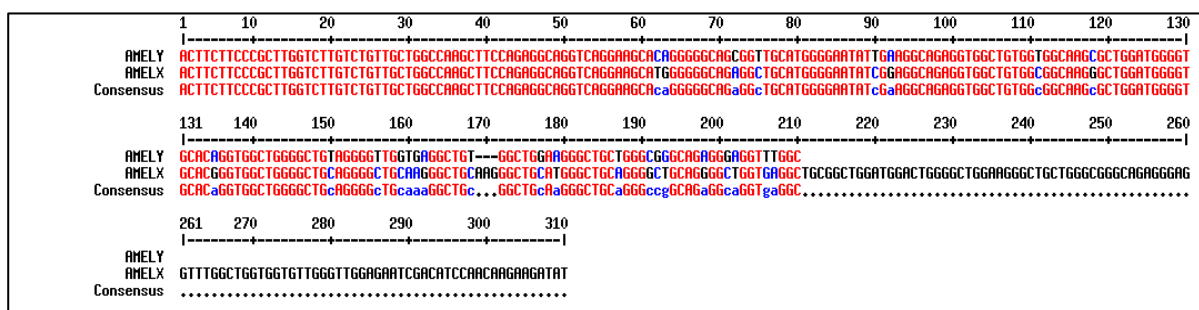


Figure 2: The pairwise alignment of AMEL-X and AMEL-Y

Következtetések és javaslatok

Az eredmények bizonyítják, hogy a freemartinizmust nem csak vérvizsgálat alapján lehet szűrni, hanem egyéb szövettípusokból is. A freemartinizmus esetén kimutatható szövettípusonként eltérő ivari kromoszóma összetételről szóló közlemény a kézirat benyújtásakor nem volt fellelhető, így ezeknek az eredményeinknek az összevetése nem volt kivitelezhető. A szövettípusonként eltérő ivari kromoszóma arány kimutatása nem rendelkezik gazdasági jelentőséggel, pusztán az alap kutatás szempontjából fontos, azonban ígéretes további kutatási lehetőséggel kecsegtet. Egér modellállatban több évtizede léteznek megalapozott módszerek kiméra egyedek létrehozására (Eckardt és mtsai, 2011). Ilyen kiméra modellorganizmusok létrehozásával és tanulmányozásával betekintést nyerhetnénk, hogy a kimériszmusnak az általunk vizsgált típusa mi módon alakul ki és képet kaphatnánk, hogy mi a magyarázat a szövettípusonként eltérő ivari kromoszóma összetételre. A további kutatási lehetőségek ezen irányba a humán transzlációs medicina és embriológia számára is érdekes eredményekkel szolgálhat, hiszen bevett módja a humán betegségek jobb megértésének a modellorganizmusok felhasználása (Lampert és mtsai, 2018).

A kutatásunk gyakorlat során hasznosítható eredménye mindenképpen az, hogy sikerült kiskérődzők számára is kidolgozni egy olyan módszert, ami költséghatékony, minimálisan invazív mintavételt kíván és egyszerűen elvégezhető és alkalmas a kimériszmus kimutatására. Kozubská-Sobocinska és mtsai (2019) közleményükben a freemartinizmus korai diagnózisának lehetőségeit részletezték szarvasmarhában. Vizsgálataikban beszámolnak róla, hogy az általuk megvizsgált

főként molekuláris diagnosztikai eljárásoknak az az óriási előnye az addig alkalmazott hematológiai, kariotípus vizsgálatokkal szemben, hogy a mintavételhez nem kell szakértelem, ráadásul a minták tárolása és feldolgozása sem igényel különösebb körültekintést. Kiskérődzőkn kivitelezett hasonló kutatásokról jelen közleményünk számol be elsőként. Eredményeinknek állatjóléti vonatkozásai is lehetnek, mivel csökkenthető lenne az állatokon végzett beavatkozások száma. Például jó gyakorlat lehet, hogy az amúgy is kötelező krotália behelyezése során gidakorban a krotália által kivágott fülporcból történjen meg a vizsgálat. Így minimálisan invazív beavatkozással már néhány napos korban kiszűrhetők lennének a kétes egyedek. A mintavétel egyszerűségéből adódóan nagyobb állományok is mintázhatók akár rövid idő alatt.

A freemartinizmus gidakori szűrésével a gazdaságok mérsékelhetnék a felnőttkorban meddőség miatt selejtezésre kerülő egyedek számát, ami adott gazdaság genetikai anyagának beszűkülését és a genetikai előrehaladását tekintve korán sem elhanyagolható szempont. Ezen túl ezzel a módszerrel a steril egyedek felneveléséhez szükséges takarmányra és állatorvosi kezelésekre fordított kiadásokat is csökkenteni lehet.

Ahhoz, hogy részletesebben feltárhassuk a freemartinizmus hatásait, a jövőben szükség lehet az ivarspecifikus expressziót mutató gének RT-q-PCR analízisére és RNS minták vizsgálatára, illetve a fentebb részletezett kiméra modellszerkezet létrehozására. A továbbiakban szeretnénk minél több egyeden elvégezni hasonló vizsgálatokat, így lehetőségünk nyílna az adatok statisztikai feldolgozására.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönik Fehér Éva kecsketenyésztő segítségét.

A kutatást az Emberi Erőforrás Támogatáskezelő Nemzeti Tehetség Program – Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj támogatta (NTP-NFTÖ-18-B-0162).

Irodalomjegyzék

- Bordán J., Kovács A., Bodó Sz.* (2015): A kecskék szarvatlanságához kapcsolódó interszexualitás vizsgálata. *Agrártudományi Közlemények*, 65. 11–15.
- Eckardt, S., McLaughlin, K. J., Willenbring, H.* (2011): Mouse chimeras as a system to investigate development, cell and tissue function, disease mechanisms and organ regeneration. *Cell Cycle*, 10(13), 2091–2099.
- Eldridge, F. E., Blazak, W. F.* (1977): Chromosomal analysis of fertile female heterosexual twins in cattle. *Journal of dairy science*, 60. 3. 458–463.
- Gáspárdy, A., Sheridan, J., Ari, M., Gulyás, L.* (2018): Twin calving and its connection to other economically important traits in dairy cattle. In *Ruminants-The Husbandry, Economic and Health Aspects*. IntechOpen.
- Hámori D.* (1974): Háziállatok öröklődő alkati hibái és betegségei. Akadémia Kiadó, Budapest
- Kozubská-Sobocińska, A., Danielak-Czech, B., Rejduch, B.* (2016): Cytogenetic and molecular diagnostics of XX/XY chimerism in cattle, sheep, and goats—a review. *Annals of Animal Science*, 16. 4. 989–1005.
- Kozubská-Sobocińska, A., Smolucha, G., Danielak-Czech, B.* (2019): Early diagnostics of freemartinism in polish Holstein-friesian female calves. *Animals*, 9. 11. 971.

- Kumar, Y. R., Lakshman, M.* (2019): Freemartin – A small review. *International Journal of Science and Research*, 8. 3. 108–109
- Lamprecht Tratar, U., Horvat, S., Cemazar, M.* (2018): Transgenic mouse models in cancer research. *Frontiers in oncology*, 8, 268.
- Lillie, F. R.* (1916): The theory of the free-martin. *Science*, 43. 1113. 611–613
- Niku, M., Ilmonen, L., Pessa-Morikawa, T., Iivanainen, A.* (2004): Limited contribution of circulating cells to the development and maintenance of nonhematopoietic bovine tissues. *Stem Cells*, 22. 1. 12–20.
- Padula, A. M.* (2005): The freemartin syndrome: an update. *Animal Reproduction Science*, 87. 1-2. 93–109.
- Pourjafar, M., Badiei, K., Sharifiyazdi, H., Naghib, S., Chalmeh, A., Divar, M.* (2012): Application of hormonal and single multiplex PCR assays for detection of freemartinism in a horned goat. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 38. 2. 175–181.
- Rota, A., Ballarin, C., Vigier, B., Cozzi, B., Rey, R.* (2002): Age dependent changes in plasma anti-Müllerian hormone concentrations in the bovine male, female, and freemartin from birth to puberty: relationship between testosterone production and influence on sex differentiation. *General and comparative endocrinology*, 129. 1. 39–44.
- Santolaria, P., Palacin, I., Yániz, J.* (2011): Management factors affecting fertility in sheep. In *Artificial Insemination in farm animals* (pp. 167-190). Intech Rijeka.
- Szatkowska, I., Zych, S., Udała, J., Dybus, A., Błaszczuk, P., Sysa, P., Dąbrowski, T.* (2004): Freemartinism: three cases in goats. *Acta Veterinaria Brno*, 73. 3. 375–378.
- Zöldág L.* (2003): A háziállatok öröklődő betegségei. *Mezőgazda Kiadó, Budapest*, 405 p