

SZENT ISTVÁN EGYETEM

**VIZSGÁLATOK A SZAPORODÁSI CIKLUS PERZISZTENCIÁJÁNAK
HOSSZABBÍTÁSA CÉLJÁBÓL, BROJLER SZÜLŐPÁR-ÁLLOMÁNYOKBAN**

Doktori (PhD) értekezés

VÉGI BARBARA

Gödöllő

2013

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, az MTA levelező tagja
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Állattudományi Alapok Intézet
Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Barna Judit
tudományos főmunkatárs, PhD
Kisállattenyésztési Kutatóintézet és Génmegőrzési Koordinációs Központ
Genetikai és Szaporodásbiológiai Kutatócsoport

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	7
1.1. Célkitűzések	9
2. Irodalmi áttekintés.....	11
2.1 A madarak főbb szaporodásbiológiai sajátosságai	11
2.1.1 A petefészek és a petesejt szerkezete	11
2.1.2 A hím ivari készülék.....	12
2.1.3 A hímivarsejtek felépítése és képződése	13
2.1.4. Spermiumtárolás és kompetíció	15
2.1.5. Megtermékenyítés	17
2.1.6. A szaporodás hormonális szabályozása.....	21
2.1.6.1. Az ivarszervek endokrin működésének szabályozása	21
2.1.6.2. A petefészek endokrin működése.....	23
2.1.6.3. A here endokrin működése	24
2.2. A termékenységet meghatározó tényezők.....	25
2.3. A termékenység meghatározásának módszerei	29
2.4. Mesterséges termékenyítés.....	30
2.5. A stressz hatása a szaporodási folyamatokra	31
3. Anyag és módszer	35
3.1. Kísérleti állatok és tartásuk	35
3.2. Kísérleti protokollok	36
3.2.1. Különböző ivararányok és kakascserék hatásának vizsgálata - I. kísérlet	36
3.2.2. Szerves Se és E-vitamin hatásának vizsgálata a hímivarban – II. kísérlet	38
3.2.3. Szerves Se és E-vitamin hatásának vizsgálata mindkét ivarban – III. kísérlet	38
3.2.4. Szintetikus GnRH előkészítés hatásának vizsgálata a hímivarban –IV. kísérlet	39
3.2.5. Szintetikus GnRH előkészítés hatásának vizsgálata a termékenységre – V. kísérlet	39

3.2.6. Mesterséges termékenyítés kiegészítő alkalmazásának vizsgálata – VI. kísérlet.....	40
3.3. Vizsgálati módszerek	40
3.3.1. A termékenység vizsgálata	40
3.3.2. Ondóvizsgálat	42
3.3.3. A szexuáliszteroidok és a stresszhormon meghatározása.....	43
3.3.4. Etológiai vizsgálatok	45
3.3.5. Szövetteni vizsgálatok.....	47
3.3.6. Statisztikai analízis	48
4. Eredmények	49
4.1. I. Kísérlet eredményei - Különböző ivararányok és kakascserék hatásának vizsgálata	49
4.1.1. A penetrációs nyílások, a lámpázási és a „valódi” termékenység vizsgálatának eredményei	49
4.1.2. A korai embrionális elhalások vizsgálatának eredményei.....	57
4.1.3. Etológiai megfigyelések eredményei	59
4.2. II. Kísérlet eredményei - Szerves Se és E-vitamin hatásának vizsgálata a hímvivarban	60
4.2.1. Ondóvizsgálatok eredményei.....	60
4.2.2. A kakashere szövettani vizsgálatának eredménye	63
4.3. III. Kísérlet eredményei - Szerves Se és E-vitamin hatásának vizsgálata mindkét ivarban ..	65
4.3.1. A penetrációs nyílások, a termékenység és a „valódi” termékenység vizsgálatának eredményei	65
4.3.2. A korai embrionális elhalások vizsgálatának eredményei.....	69
4.3.3. A hormonvizsgálatok eredményei.....	70
4.3.3.1. Fekális szteroid analízisek eredményei	70
4.3.3.2. Tojásszik szteroid analízisek eredményei.....	73
4.3.4. Szövetteni vizsgálatok eredményei	75
4.4. IV. Kísérlet eredményei - Szintetikus GnRH előkészítés hatásának vizsgálata a hímvivarban	77
4.4.1. Az ondóvizsgálatok eredményei	77

4.4.2. Szteroid hormon-analízisek eredményei	80
4.5. V. Kísérlet eredményei - Szintetikus GnRH előkészítés hatásának vizsgálata a termékenységre.....	81
4.5.1. A penetrációs nyílások, a termékenység és a „valódi” termékenység vizsgálatának eredményei	81
4.5.2. A korai embrionális elhalások vizsgálatának eredményei.....	86
4.5.3. Etológiai megfigyelés eredménye	87
4.6. VI. Kísérlet eredményei - Mesterséges termékenyítés kiegészítő alkalmazásának vizsgálata	90
4.6.1. A penetrációs nyílások, a termékenység és a „valódi” termékenység vizsgálatának eredményei	90
4.6.2. A korai embrionális elhalások vizsgálatának eredményei.....	92
4.6.3. Stresszhormon-vizsgálatok	93
4.7. Új tudományos eredmények.....	95
5. Következtetések és javaslatok	97
5.1. Különböző ivararányok és kakascserék hatásainak elemzése	97
5.2. A hímivarra irányuló vizsgálatok eredményeinek elemzése.....	99
5.3. A nőivarra irányuló vizsgálatok eredményeinek elemzése.....	101
6. Összefoglalás	105
7. Summary.....	107
8. Irodalomjegyzék (1. számú melléklet)	109
9. Here szövettani metszetek a kontrol és kezelt csoportban (2. számú melléklet).....	127
10. A spermiumtároló tubulusok szövettani metszetei a különböző életheteken (3. számú melléklet)	130
11. Köszönetnyilvánítás	133

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- Abn%:** morfológiailag rendellenes sejtek aránya
- ACTH:** adrenokortikotróp hormon
- AE:** abnormal embryo (rendellenes embrió)
- AI:** artificial insemination (mesterséges termékenyítés)
- ANCOVA:** kovariancia-analízis
- ANOVA:** variancia-analízis
- B:** kortikoszteron
- BWE:** blastoderm without embryo (embrió nélküli blasztoderma)
- CRF:** corticotrop realising factor
- CV:** variációs koefficiens (szórás%)
- D2-D5:** dead embryo (inkubáció 2-5 napján elhalt embrió)
- DO:** death in oviduct (petevezetőben elhalt embrió)
- E₂:** 17- β -ösztradiol
- ÉN%:** élő, ép sejtek aránya
- Eok:** normál fejlődésű embrió
- FSH:** folliculus – stimuláló hormon
- GnRH:** Gonadotropin Releasing Hormone
- Holt%:** elhalt sejtek aránya
- IPVL:** inner perivitelline layer (belső perivitellin membrán)
- LH:** luteinizáló hormon
- OPVL:** outer perivitelline layer (külső perivitellin membrán)
- PD:** positive development (pozitív fejlődésmenet)
- PI:** propídium-jodid
- PSPA:** Perivitelline Sperm Penetration Assay
- RIA:** radioimmunoassay
- SDS:** Sodium-dodecylsulphat
- Se:** szelén
- T:** tesztoszteron
- UVJ:** uterovaginal junction (uterovaginális szűkület)
- VT%:** valódi termékenység %

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt években az emberiség állati eredetű élelmiszerének egy harmadát a baromfihús és tojás szolgáltatta (*Horn, 2008*). Az előrejelzések szerint 2030-ban a baromfihús termelés meghaladhatja a sertéshús termelését és a világ első számú húsforrása lehet. A következő tíz évben a világ baromfihús fogyasztása 2 kg/fő mennyiséggel fog nőni. Az EU tagországaiban nagy kihívást jelent a gazdaságos, fenntartható, innovatív, a biológiai változatosságot fenntartható termelés, miközben figyelembe kell venni a világ legszigorúbb élelmiszerbiztonsági, állategészségügyi, állatvédelmi előírásait és a legmagasabb termelési költségeket (*Zoltán, 2011*). Ez a növekvő húsigény maga után vonja a szülőpár állományok számának növelését, valamint termelésük fokozását. A sikeres termelés célja a jó minőségű termék előállítása, minél alacsonyabb költség mellett.

A húshibrid tenyésztés napjainkra négy genetikai bázisra szűkült, amelyek egyben a fajtákat is jelentik, így az *Aviagen* (Ross, Arbor Acres), *Cobb, Hubbard* (Shaver, ISA) *Euribrid* (Hybro). A genetikai munka célkitűzéseit elsődlegesen a piaci igények, a kereslet határozza meg, ami a legfontosabb szelektációs szempontnak a kiváló húskihozata és a minél magasabb mellhús arányát tartja. Tehát a legnagyobb tömegű kakasok kiválogatásával a legrövidebb idő alatt legnagyobb tömeggyarapodást elérő brojler populációt célozza meg. Azonban a testsúlyra történő intenzív szelekció, az egyes fajtáknál eltérő mértékben, de negatívan hatott a szaporodásbiológiai mutatókra (*Reddy és Sadjadi, 1990; Brillard, 2009*).

A magyarországi hústermelésben két hibridnek jut a vezető szerep. A hazai piacot 71%-ban a Ross 308 uralja, míg a világ legelterjedtebb hibridje, a Cobb 500 a második helyen áll (13%) (*Blaskó és mtsai, 2011*). A különböző tartástechnológiák a hústípusú szülőpár állományok termelésben tartását 61-64 hetes életkorig ajánlják. Az elmúlt néhány évben a tojások termékenységének drasztikus romlása észlelhető, a terméketlen tojások aránya eléri a 15%-ot, a gazdaságosság szempontjából kritikus értéket, így gazdaságtalanná válik az állományok fenntartása az ajánlott életkorig. Ez a probléma világszerte gondot okoz a szakembereknek (*McDaniel, 1986; Creel és mtsai, 1990; Walsh és Brake, 1997; Fragoso és mtsai., 2012*), tehát fontos az olyan kutatások végzése, amelyek megpróbálják a termékenység perzisztenciáját hosszabbítani, vagyis az egy tojóra eső termékeny tojások számát gazdaságos szintig növelni.

A tojások termékenységét a hímivar oldaláról az ondó minősége és a kakasok libidója, a nőivar részéről – legalább ekkora, ha nem nagyobb mértékben – a tojás minősége, valamint a tojó spermiumbefogadó-képessége határozza meg. Páráskor a spermiumok a petevezető hüvelyi

szakaszának alsó részébe kerülnek, ahonnan nagy részük a hüvelyben zajló szigorú szelekciós folyamatok következtében a kloákán keresztül kiürül és így elvész a termékenyítés számára. A ki nem ürült ún. fitt spermiumok 1-2%-a az uterovaginális szűkületben található spermium-tároló tubulusokban raktározódik. Az elraktározott spermiumok szakaszosan ürülnek, tyúkfélékben kb. 30% naponta. Ha a petevezető spermiumtároló helyei nem töltődnek újra ismételt párzás révén, akkor egy idő után nem lesz elegendő mennyiségű spermium a termékenyítéshez, azaz a fertilis periódus lezárul, ami házityúkban kb. 2 hét. A tojótyúkok spermiumtároló kapacitása a genetikai tényezőkön túl nagymértékben függ a tojó korától, azaz a termelési ciklusban lévő helyzetétől (*Bakst és mtsai, 1994*). Vizsgálatok igazolták, hogy a termelési csúcsot követően a spermiumtároló csövecskék ürülése felgyorsul (*Brillard, 1993*), ami azt jelenti, hogy fiziológiai szempontból a tojások termékenységének fenntartásához a ciklus előrehaladtával mind több és több spermiumra lenne szükség. Ezzel szemben a technológiai előírások – a kakasok túlhízásának elkerülése és ezért a mozgásra való készítés céljából – a termelési ciklus előrehaladtával csökkentik a kakaslétszámot, vagyis tágítják az ivararányt (*Technological description of ROSS Breeders Limited*). Jóllehet, ez a technológiai előírás nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, változatlanul érvényben van. A termelő cégek ezért - kényszermegoldásként - a termelési ciklus közepe táján (40-45. élethét) részlegesen, esetleg teljes mértékben lecserélik az – úgymond – „előregedett” kakasokat fiatalokra. Ez az intézkedés rendkívüli módon megnöveli az előállítási költségeket, feltehetőleg nagymértékű distresszt, és ezzel járó termelés-csökkenést okoz az állományban, ráadásul eredményessége - az eddigi tapasztalatok szerint - csak átmeneti, tehát megkérdőjelezhető.

Irodalmi adatok szerint az alacsonyabb termékenységi eredmények takarmányozással javíthatók (*Brake, 2003*). A takarmányszükséglet megközelíthető egyrészt mennyiségi, másrészt minőségi oldalról, melyek lényegesen befolyásolják a szülőpár állományok termelését, illetve termékenységét. Egyes nyomelemekről és vitaminokról bebizonyosodott, hogy jótékony hatással vannak mind a termékenységre, mind az utódok életképességére, sőt későbbi termelésére is (*Sefton és Edens, 2004; Khan, 2011; Surai és Fisinin, 2012*).

Az agy specifikus területei olyan decapeptideket tartalmaznak (GnRH), amelyek az agyalapi mirigy elülső lebenyében megindítják, illetve fokozzák az FSH, de különösen az LH termelődését. A „klasszikus” neuro-endokrin hatással egyidejűleg a GnRH és szintetikus analógjai neuromodulátor hatásaikkal változtatni képesek a reprodukciós kapacitást, ezzel széles spektrumú magatartás-élettani hatást váltanak ki (*Péczely és mtsai. 1988.*). Ily módon lehetőséget adhatnak a hím madarak reprodukciós teljesítményének fokozására.

A baromfigenetikusok és szaporodásbiológusok körében egyre elterjedtebb az az álláspont, hogy nem csak pedigré, de nagyszülőpár, sőt szülőpár szinten is megoldást jelenthet a problémára a

mesterséges termékenyítés alkalmazása (*Brillard, 2009*). A mélyalmon, természetes párzásban tartott nagy létszámú szülőpár-állományoknál ennek bevezetése – munka-, eszköz-, azaz költség- és szaktudás-igényessége miatt – pillanatnyilag nem kivitelezhető, kiegészítő rátermékenyítések formájában esetleg segíthet a termelési perzisztencián.

A fentiek alapján sürgető tehát olyan kutatások végzése, amelyek vizsgálják a lehetőségét annak, hogy a termékenység perzisztenciája meghosszabbítható-e, vagyis az egy tojóra eső termékeny tojások száma növelhető-e a gazdaságos szintig, vagy a jelenlegi genetikai lehetőségek korlátozzák e lépéseket. Vizsgálataink során újszerű, a szokásosnál informatívabb termékenységvizsgálatokat alkalmaztunk.

1.1. Célkitűzések

- a) különböző, szaporaságra ható technológiai változtatások (ivararány, kakascseré) hatásának vizsgálata a termékenység perzisztenciájára
- b) organikus szelén + E-vitamin takarmány-adalékok hatásának vizsgálata mindkét ivari funkcióra
- c) szintetikus GnRH előkezelések hatásának vizsgálata a hímek termékenyítőképességének (libidó, ondóminőség), valamint az állomány termékenységének fokozására
- d) mesterséges termékenyítés kiegészítő alkalmazásának hatása a termékenység perzisztenciájára a termelési ciklus második felében

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A madarak főbb szaporodásbiológiai sajátosságai

A madarak szaporodása, ivarszerveiknek felépítése és működése sok esetben sajátos és eltér az emlősökétől. E sajátosságok közül értekezésemben a munkámat érintő jellegzetességeket ismertetem.

2.1.1 A petefészek és a petesejt szerkezete

Madarak esetében – néhány kivételtől eltekintve - az egyedfejlődés során csak a baloldali petefészek és petevezető fejlődik ki és funkcionál. A jobboldali szervek apoptotikus folyamatok révén már embrionális korban elsorvadnak. A petefészek működését tekintve a petesejteket termeli, valamint hormonokat és biológiailag aktív vegyületeket állít elő (*Forgó, 2002; Johnson és Woods, 2007*). A petefészek a testüreg bal oldalán elhelyezkedő, savóshártya-kettőzettel és a hasi légzsák által fedett üregben, a *cavum serosum genitaléban* található. Tömött rostos kötőszöveti tok borítja. Különböző fejlődési stádiumban lévő, eltérő méretű fehér és sárga tüszők figyelhetők meg a kéregállományában. A működő petefészek legnagyobb részét a 8-12 kis, 4-6 középnagy, 2-4 nagy és 1 felrepedés előtt álló sárga tüsző teszi ki. Ezeken kívül számos sorvadó sárga és fehér tüsző, kisebb számban fejlődő fehér tüszők is megfigyelhetők (*Péczely, 1987*).

A petesejt a felrepedés előtt álló, sárga tüsző központi részében helyezkedik el, míg az emlősök petefészkére az excentrikus helyzetű Graaf-tüsző a jellemző. A petesejtet speciális sejthártya határolja (*mambrana vitellina*), mely két rétegből áll. A belső réteg (*oolemma*) a valódi sejthártya, mely mikrobolyhokat, bemélyedéseket és pinocitotikus betüremkedéseket tartalmaz. A külső réteg a *membrana perivitellinea*, vagy belső perivitellin membrán, mely a pete és a tüszőhámsejtek közötti résben alakul ki. Fehérjerostjai a sejthártya belső lemezével párhuzamosan rendeződtek, míg merőlegesen a belső szikmembrán mikrobolyhai és a granulosa sejtek apikális nyúlványai helyezkednek el. Ez a szerkezet (*zona radiata*) főleg az érő tüszőkben figyelhető meg, az ovuláció előtt álló tüszőkben már nagy részben visszafejlődött. A belső szikmembrán (IPVL) főként a granulosaréteg terméke, így másodlagos peteburoknak fogható fel. *Bakst és Howart (1977a)* megállapították, hogy a csírákorong területén a belső szikmembrán (IPVL) és az ott lévő sárga szik azonos struktúrájú és vastagságú. Más részről azt állítják, hogy az IPVL a csírákorong felett vékonyabb, kevesebb és kisebb rostokat tartalmaz (*Perry és mtsai., 1978*). Emlősökben a *zona*

pellucidát három glikoprotein réteg alkotja, melyeket ZP1, ZP2 és ZP3 néven ismernek (Wassarman 1988). A madarak petesejtjében kettő glikoproteint azonosítottak, ezek közül az egyik a ZP3-mal egyezik meg (Waclawck és mtsai., 1998; Takeuchi és mtsai., 1999), míg a másik a ZP1-gyel mutat nagy hasonlóságot (Bausek és mtsai., 2000). A harmadik glikoproteinről nem áll rendelkezésre adat, hogy megegyezik-e az emlősök ZP2 glikoproteinjével. Feltételezhető az egyezés és az is, hogy sokkal kisebb mennyiségben van jelen és/vagy elvész a belső szikmembrán izolálásakor (Bausek és mtsai., 2000). A ZP3 glikoproteint a petesejtet körülvevő granulosa sejtek szintetizálják, a tüsző gyors növekedési fázisában (Waclawck és mtsai., 1998; Takeuchi és mtsai., 1999; Pan és mtsai., 2001; Sasanami és mtsai., 2002). Pan és mtsai., (2001) megállapította, hogy a tesztoszteron stimulálja a granulosa sejtek ZP3 glikoprotein termelését. A ZP1 glikoprotein szintézise ösztrogén kontroll alatt áll, valamint a májban képződik, és a vérárammal jut a tüszőkhöz (Bausek és mtsai., 2000; Sasanami és mtsai., 2003).

A petesejt plazmája által képzett csírákorong gyengén fejlett endoplazmatikus retikulumot, mitokondriumot és sejtmagot tartalmaz. A megtojást követően a tojásban a csírákorong közvetlen a sejthártya alatt, a pete középső részén helyezkedik el, úgy hogy úszik a sokkal nagyobb tömegű, szikanyaggal telített deuteroplazmán. A deuteroplazma fehér és sárga szikanyagból áll, kívül egy vékony fehér szik „köpeny” fedi, ami a csírákorong alatt a pete központja felé nyomuló nyélben (*latebra*) folytatódik. A *latebra* a csírákorongot körülveve tölcészerűen kiszélesedik. A deuteroplazmát alkotó sárga és vékony fehér szikréteg a *latebra* körül koncentrikusan rétegződve helyezkednek el.

A madarak petesejtjének sejtmagja, - mint a legtöbb gerinces állaté – a második meiotikus osztódás metafázisában van az ovuláció időpontjában. Az érett petesejtnek nincs sejtközpontja, az kilökődik az első sarki sejttel. A további osztódáshoz szükséges sejtközpontot a megtermékenyítő spermium fogja szolgáltatni (Péczely, 1987).

2.1.2 A hím ivari készülék

A herék az abdominális légzsákokban helyezkednek el, a vesék *cranialis* lebenye felett. Kívülről savóshártya borítja, az alatta elhelyezkedő kollagénrostos kötőszövetes tokból vastos kötegek indulnak a szerv belsejébe, de nem oszlanak sővényekre, így a madarak heréjének *parenchymája* nem rendeződik lebenyekre (Wolfné Táskai, 1994). A here mérete funkcionális állapotától függően változik, mely főként a szezonalitást mutató madaraknál kifejezett. A tág kanyarulatós herecsatornácskák teszik ki a funkcionálisan aktív here legnagyobb részét, melynek alaphártyáján a Sertoli-sejtek ülnek. A Sertoli-sejtek, emlősökhöz hasonlóan úgy nevezett dajka

sejtekként funkcionálnak, mert védelmezik és tápanyaggal látják el a fejlődő hímivarsejt kezdeményeket (Aire, 2007a). Az emlősökhöz viszonyítva, a csatornácskák csírahámja vastagabb, ami az igen intenzív spermatogenezissel van kapcsolatban (Péczely, 1987).

A funkcionálisan aktív mellékhere legnagyobb részét a mellékhere-csatornácskák alkotják. Ezek a csatornácskák szexuálisan inaktív állapotban elsorvadnak (Lake és Furr, 1971; Bellamy és Kendall, 1985). A kanyargós lefutású mellékhere-csatornácskák szűkebb keresztmetszetű összekötő csatornába torkollanak, melyek az ondó továbbítására szolgálnak. Az összekötő csatornák a mellékhere oldalsó részén futó, tág üregű mellékherecsőbe futnak (Péczely, 1987). Emlősökkel szemben jelentős különbség, hogy a spermiumok nagyon rövid ideig tartózkodnak a mellékherében (Clulow és Jones, 1982).

Az ondóvezető a mellékherecső közvetlen folytatása. Kanyargós lefutású, táguló lumenű szerv. Kloákába való nyílása előtt, egyes fajokban ampullaszerű tágulatot, az ondóhólyagot képzí. Hámsejtjei nagyszámú lizoszómát tartalmaznak, amelyek a hibás ivarsejteket fagocitálják. Az ondó tárolása elsősorban az ondóvezetőben van (Wolfné Táskai, 1994). Énekesmadaraknál az ondóhólyag mérete a szaporodási ciklus folyamán nagymértékben változik, az aktív periódus kezdetén jelentősen megnő (Murton és Westwood, 1977).

A hím madarak páرزószervének típusát tekintve kétféle lehet. A legtöbb fajon a kisméretű páرزószerv nem emelkedik ki feltűnően a kloakából, ezért *phallus non protrudens*nek nevezik. Ilyen páرزószerv van például a tyúkfélékben és az énekesmadarakban. A másik típus viszont tekintélyes méretű, páرزáskor a kloakából kitűródik, ezért *phallus protrudens*nek hívják. Ilyen páرزószervük van például a lúdalkatúaknak, egyes papagájoknak, futómadaraknak. (Péczely, 1987; Montgomerie és Briskie, 2007).

2.1.3 A hímivarsejtek felépítése és képződése

A madarak spermiumainak szerkezete leginkább a hüllőkéhez hasonlít, de az emlősökétől is csak kismértékben tér el. A házikakas spermiumának hossza több mint 100 μm , átmérője pedig 0.5 μm (Thurston és Hess, 1987).

Az akroszóma körülbelül 2 μm hosszú (Thurston és Hess, 1987), megnyúlt kúp alakú. Az akroszóma anyaga a vizsgálatok szerint tripszinszerű anyag, mely a peptidkötéseket hidrolizálja (Langford és Howart, 1974). Az akroszóma belső membránja alatt a mag anyagába nyúló, lándzsaszerű, erősebben elektrodenz szubakroszómális anyag helyezkedik el. A feji rész legnagyobb részét a maghátyával fedett, henger alakú sejtmag tölti ki. Az elülső részén megfigyelhető bemélyedésen kívül, a hátulsó részén is van egy laposabb gödör, ahova a proximális

centriólum kapcsolódik (*Péczely, 1987*). Az emlősök spermiumán megfigyelhető un. nyaki-, vagy csatló rész nem található meg a madaraknál, a fej és a középdarab viszonylag egyszerűen kapcsolódik. A középdarab 4 μm körüli (*Grigg és Hodge, 1949*), amelyet a proximális és a disztális centriólum alkot. Mindkét centriólum 9 két vagy három tagból álló perifériás fekvésű csövecskéből áll, azonban a disztális centriólum 3-6-szor hosszabb a proximális elemnél. A középdarabot spirálisan elhelyezkedő, négy-öt tagból álló mitokondrium hüvely veszi körül. A középdarab alján megszűnik a mitokondrium hüvely, helyette egy gyűrű alakú, sötét test, az *annulus* jelenik meg (*Péczely, 1987*). A spermium leghosszabb része a vékony fark, mely körülbelül 80 μm (*Nicander és Hillstrom, 1967*). A disztális centriólumból induló tengelyfonal húzódik a központi részében, melyet a proximális részen lefelé egyre vékonyodó, un. rostos hüvely vesz körül. A fark disztális részén megszűnik a rostos hüvely és ezen a szakaszon már csak a sejthártya burkolja a tengelyfonalat (*Péczely, 1987*).

A spermatogóniumok a legkezdetlegesebb csírasejtek, melyek a sorozatos osztódásokat követően spermiumokká fejlődnek, az aktív here kanyarulat csatornácskáiban. A spermatogóniumok többszörös mitózis osztdások folyamatán keresztül spermatocitákká fejlődnek, valamint önreplikációval saját magukat is fenntartják, hogy a spermatogenezis folyamatos maradjon. *Regaud (1901)* vándorpatkányban elsőként azonosította, hogy a spermatogóniumoknak több típusa létezik. Ezt követően több szerző (*Ortavant, 1959; Courot és mtsai, 1970; Lok és mtsai., 1982; Hadley és Dym, 1983; Ekstedt, 1986*) számolt be e sejtek eltérő típusairól a különböző emlős fajokban. *Zlotnik (1947)*, *Kumaran és Turner (1949)*, *Sharma és mtsai (1956)* tyúkfajban, *Clermont (1958)* vadkacsában és *Marchad (1977)* pézsmarécében egy típusát azonosították a spermatogóniumoknak, *Lake (1956)* 2 típusú spermatogóniumról számolt be kakasban. A módszerek fejlődésének köszönhetően *Lin és Jones (1992)* 4 féle spermatogóniumot (Ad, Ap1, Ap2, B) mutatott ki japán fürjben. Ezt az eredményt követve, a tovább osztódó B sejtek hozzák létre az elsődleges spermatocitákat. Ezek a sejtek a meiózis profázisának egyes szakaszaiban vannak és több generációjuk figyelhető meg a herecsatornácskáiban, mivel a meiózis elhúzódó folyamat (*Aire, 2007b*). *Lin és Jones (1990)* nyolc féle fázisban lévő elsődleges spermatocitát azonosított japán fürjben.

A másodrendű spermatociták, az elsőrendűek felett, ritkábban közöttük helyezkednek el. A másodrendű spermatociták rövid élettartamú alakok, lényegében a meiózis köztes állapotát képviselik, mitótikusan osztódva a spermatidákat hozzák létre (*Péczely, 1987*).

A spermatidák haploid sejtek, melyek méretükben kisebbek a másodrendű spermatocitáknál. Alakjuk gömbölyded és magjukban újra megjelenik a sejtmagvacska (*Péczely, 1987*).

A spermatidákból ezután a spermiomorfozogenezis során alakulnak ki az érett spermiumok. A folyamat során a spermatidák fokozatosan megnyúlnak, magvukban és citoplazmájukban változások történnek. Japán fűrjben (*Lin és Jones, 1993*) és pulykában (*Aire, 2003*) a spermiomorfozogenezisnek 12 fázisát azonosították.

2.1.4. Spermiumtárolás és kompetíció

A madarak petevezetőjének egyik különleges funkciója a spermiumok tárolása és transzportja. A petevezetőben történő spermiumtárolás nem egyedülálló a madarakban, hanem megtalálható számos gerinces és gerinctelen állatban is. Például a méhkirálynő 4-7 évig képes tárolni a spermiumokat, anélkül hogy elvesztenék termékenyítő képességüket (*Bishop, 1920; Courier, 1921*). Spermiumtárolást figyeltek meg a nőstény cápánál és rájánál (*Clark, 1922; Metten, 1941*), néhány fajon a csontos halak osztályából (*Turner, 1937*), kétéltűeknél (*Dent, 1970*) hüllőknél (*Haines, 1940*) és az emlősök közül a denevéreknél (*Wimsatt, 1944*).

Madarakban az elsődleges spermiumtároló tubulusok az uterovaginális szűkületben, míg a másodlagosak a petevezető infundibuláris szakaszában találhatóak. Felületüket egyrétegű hengerhám borítja, a sejtek apikális részén rövid mikrobolyhok figyelhetőek meg. A citoplazma mag feletti részében néhány nagyobb lipidcsepp és lizoszómák helyezkednek el (*Péczely, 1987*).

Páráskor a spermiumok a petevezető hüvelyi szakaszának alsó részébe kerülnek, ahonnan nagy részük a hüvelyben zajló szigorú szelektív folyamatok következtében a kloákán keresztül kiürül és így elvesz a termékenyítés számára. Annyira szigorú a vaginában zajló szelektív folyamat, hogy az inszeminációt követő 24 órán belül pulykában a bejuttatott spermiumok 2%-át (*Brillard és Bakst, 1990*), míg tyúkban csak 1%-át (*Brillard, 1993*) tudták kimutatni. A ki nem ürült spermiumok az uterovaginális szűkületben található elsődleges spermiumtároló tubulusokban raktározódnak. A raktározó tubulusok számában és méretében eltérések vannak az egyes fajok között, pulykában 30000 körüli, míg házi tyúkban 5000 körül van (*Bakst és mtsai., 2010*). *Birkhead és Moller (1992)* arra a megállapításra jutottak, hogy a nagyobb testű madaraknak több raktározó tubulusuk van, és azok mérete pozitív korrelációban van a spermium koncentrációval. Logikusnak tűnik az is, hogy ha több a spermiumtároló tubulus, akkor ebből az következik, hogy több spermium éri el a termékenyítés helyét, valamint a fertilis periódus is hosszabb lesz (*Bakst és mtsai., 2010*).

A spermiumok petevezetőn belüli transzportját a saját aktív mozgásukon kívül valószínűleg, a petevezető csillós hengerhámsejtjei is segítik. A spermiumtranszport szabályozásáról nem sok adat áll rendelkezésünkre, azonban az bizonyos, hogy a vaginába jutott nagyszámú spermium nem jelenik meg a spermiumtároló tubulusokban. Megállapítást nyert azonban, hogy ha a pulykákat a

tojástermelés kezdete előtt termékenyítették, akkor kétszer annyi spermium jutott a spermiumtároló tubulosokba, mint a tojástermelés indulása után termékenyítve (*Brillard és Bakst, 1990; Bakst mtsai., 1994*). Mindezek ellenére a spermiumok száma a spermiumtároló tubulosokban 10 millió maradt, akkor is, ha 150-300 millió spermiummal termékenyítettek. Érdekes, hogy ha egy tyúkot a tojásrakás után fél órával mesterségesen termékenyítettek a vagina kifordításával, akkor sokkal nagyobb számú spermium jutott el az infundibulumba. Ez azonban megnövelte az embrióelhalás arányát és a túlzott polispermia lehetőségét. Nyilvánvaló tehát, hogy a vaginának óriási szerepe van a spermiumok szelekciójában, azonban ennek háttére még tisztázásra vár. Az is ismeretlen még, hogy mitől függ, hogy melyik spermium ér el az uterovaginális szűkületbe és melyik nem, azaz hogy milyen tényezőkön alapul a szelektálódás. *Wishart és Horrock (2000)* írta le, hogy a spermiumoknak motilisnak kell lenniük és membránjuknak bizonyos glikoproteineket kell tartalmazniuk, hogy eljussanak a vaginától az uterovaginális szűkületbe. A spermiumtároló tubulosokba csak a motilis és morfológiailag ép spermiumok lépnek be (*Allen és Grigg, 1958*). A spermiumok mozgási képessége között különbség van. Kísérletben bizonyították, hogy azok a spermiumok jutnak keresztül a vaginán, amelyek képesek sűrű közegben is előre haladni (*Froman és mtsai., 1999; Birkhead és mtsai., 1999*). Úgy tűnik, hogy a tojók szabályozzák, hogy mely spermiumok kerülnek a spermiumtároló tubulosokba és így melyek lépnek kapcsolatba a petesejttel (*Pizzari és mtsai., 2002*). Kétségtelen, hogy a spermium szelekció molekuláris alapjainak feltárása nagyban hozzájárulna a mesterséges termékenyítés tökéletesítéséhez.

A spermiumtároló tubulosokban gátlódik a spermiumok anyagcseréje és mozgása, stabilizálódik a plazmalemma membránszerkezete, stabilizálódnak az akroszomális enzimek és gátlódik az immunogenitásuk (*Bakst és mtsai., 1994*). A tubulusban elhelyezkedő spermiumok funkcióira hatással vannak egyes kationok, különösen a Zn és a Ca (*Bakst, 1985; Bakst és Richards, 1985*). A cink gátolja a spermiumok oxigén felhasználását és a motilitásukat (*Chvapil, 1973*), míg a kalcium csirkében *in vitro* körülmények között növeli a spermiumok oxigén felhasználását és motilitását (*Wishart és Ashizawa, 1987; Ashizawa és mtsai., 1989, Ashizawa és mtsai., 1992*).

Az elraktározott spermiumok szakaszosan ürülnek, tyúkfélékben kb. 30% naponta. Ha a petevezető spermiumtároló helyei nem töltődnek újra ismételt párzás révén, akkor egy idő után nem lesz elegendő mennyiségű spermium a termékenyítéshez, azaz a fertilis periódus lezárul, ami házityúkban kb. 2 hét. A tojótyúkok spermiumtároló kapacitása a genetikai tényezőkön túl nagymértékben függ a tojó korától, azaz a termelési ciklusban lévő helyzetétől (*Bakst és mtsai., 1994*). Vizsgálatok igazolták, hogy a termelési csúcsot követően a spermiumtároló csövecskék ürülése felgyorsul (*Brillard, 1993*), ami azt jelenti, hogy fiziológiai szempontból a tojások termékenységének fenntartásához a ciklus előrehaladtával mind több és több spermiumra lenne

szükség. Régóta vitatott kérdés, hogy a spermiumok mikor és hogyan ürülnek a spermiumtároló tubulusokból. Vitatott, hogy rögtön az ovuláció után, vagy az ovulációs ciklus során lassú ütemben ürülnek. *Barna (1999)* feltételezése szerint a tojásképzési ciklus során bizonyos aminosavak mennyiségének változásai csökkentik az uterus környezetében a pH értékek alakulását, továbbá a méshéjképződés következtében kialakult fiziológias acidózis is enyhén savas irányba tolja a környezeti pH-t, ami a spermiumok motilitását elnyomja, így ezen időszakok alatt a spermiumok ürülése lassul vagy akár szünetelhet is. *Froman (2003)* azt állítja, hogy a spermiumtároló tubulusok hámsejtjei által termelt folyadék segíti a spermiumokat úgymond kiűzni az uterovaginális szűkületbe. Ezt alátámasztja a tubulusok hámsejtjein lévő membráncsatornák elhelyezkedése is (*Zaniboni és Bakst 2004*). *Freedman és mtsai. (2001)* állapították meg, hogy az uterovaginális szűkület nyálkhardtájának beidegződése kiterjed a környező spermiumtároló tubulusokra, valamint a tubulusok hámsejtjének apikális részén található aktin rostok arra utalnak, hogy néhány spermiumtároló tubulus képes az összehúzódásra és így elősegíti a spermiumok ürülést. *Compton és mtsai (1978)* azt állították, hogy a spermiumok rétegződve helyezkednek a spermiumtároló tubulusokban. Ez azt jelentette, hogy az utolsó hím spermiumai ürülnek ki először a tubulusokból, tehát azok termékenyítenek először. Újabb kutatások bizonyítják (*Lessells és Birkhead, 1990; Birkhead és mtsai 1995*), hogy *Compton és mtsai (1978)* állítása nem helytálló. *King és mtsai (2002)* fluoreszcens festéket használva megállapították, hogy a spermiumok nem rétegződnek, hanem mindig másik tubulusba rakódnak be. Csak nagyon kis százalékban keverednek az előző párzásból származó spermiumokkal. Azonban az még mindig tisztázásra vár, hogy mitől függ az, hogy éppen melyik tubulus és milyen ütemben ürül ki.

Hosszú ideje elfogadott tény, hogy az infundibulumban másodlagos tárolásra szolgáló tubulusok helyezkednek el a csirkében és a pulykában (*Bakst, 1994; Wishart és Horrocks, 2000*). Ugyanakkor, vizsgálatok kimutatták, hogy az infundibulumban 48 órával a termékenyítést követően 1-3 spermiumot lehetett kimutatni (*Bakst 2003*). Ha figyelembe vesszük, hogy az uterovaginális szűkület spermiumtároló tubulusai hogyan segítik a reprodukciót és mivel csekély spermium található az infundibulumban a termékenyítés után, ebből arra következtethetünk, hogy az infundibulum spermium tárolása nem egyenértékű az uterovaginális szűkületével.

2.1.5. Megtermékenyítés

Az ivarsejtek az ovulációt követő 15 percen belül egyesülnek az infundibulum felső, tölcéses szakaszában (*Olsen és Neher, 1948*). A spermiumoknak kapcsolódniuk kell a csirakorong feletti belső szikmembránhoz, mielőtt a petesejtet az infundibulum által termelt mirigyváladék

teljesen körül nem veszi. Ez a mirigyváladék képezi az *extravitellináris*, vagy más néven harmadlagos peteburkot (OPVL) (*Stepinska és Bakst, 2007*), melyen már nem tudnak a spermiumok keresztüljutni. Az a mechanizmus, amellyel a spermiumok megtalálják a csírákorong területét, a mai napig ismeretlen.

Általánosan elterjedt az a nézet, hogy madarakban a spermiumoknak nincs szüksége a kapacitációra ahhoz, hogy elnyerjék termékenyítőképességüket (*Howart, 1984*). Ez a megállapítás azon alapul, hogy a frissen ejakulált spermiumok képesek voltak megtermékenyíteni a petesejtet *in vitro* anélkül, hogy bármilyen kapacitációs médiummal kezelték volna őket (*Nakanishi és mtsai., 1990; Olszanska és mtsai., 2002*). *Robertson és mtsai (1997)* kimutatták, hogy a frissen ejakulált spermiumok *in vitro* körülmények között 2,5 percen belül hidrolizálták a belső szikmembrán darabot. Sőt, az is bizonyosságot nyert, hogy a spermiumoknak nem kell hosszú ideig raktározódni a petevezetőben ahhoz, hogy termékenyítőképességüket elnyerjék. A vaginába (*Bobr és mtsai, 1964*), vagy az infundibulumba (*Olsen és Neher, 1948*) történő mesterséges termékenyítést követően 15 percen belül termékeny petesejtet detektáltak. *Bakst és mtsai (1994)* megállapították, hogy a spermiumtároló tubulusokban a spermiumok motilitása, anyagcseréje, enzim rendszere reverzibilisen akár hetekig gátolódik. A spermiumok a tubulusokat elhagyva a petevezetőben újra aktiválódnak. Felvetődik a kérdés, hogy ezt aktivációnak, vagy már kapacitációnak nevezhetjük-e?

Mint már fentebb említettem, a megtermékenyítés első lépése, hogy a spermiumok a belső szikmembránhoz kapcsolódnak, és ez indukálja az akroszóma reakciót. Az akroszóma külső hárttyája több ponton tapad a feji részt borító sejthárttyához. Ezekon a pontokon felszakad az akroszómát borító membrán és tripszinszerű anyag, az akrozin ömlik a szikmembránra. Az akrozint tyúk fajban (*Ho és Meizel, 1970; Froman, 1990*) és pulykában (*Richardson és mtsai., 1988*) izolálták. Az akrozin hatására körülbelül 10 µm átmérőjű nyílás keletkezik, s ezen keresztül jut be az akroszómáját vesztett spermium az *oolemmához* (*Bakst és Howart, 1977b; Okamura és Nishiyama, 1978*). Ugyanilyen nyílásokat találtak, ha *in vitro* körülmények között inkubálták a spermiumokkal a belső szikmembránt (*Howart, 1990; Steel és mtsai., 1994; Kuroki és Mori, 1997; Takeuchi és mtsai., 2001; Robertson és mtsai., 1997*). A csírákorong feletti *oolemmát* elérő spermiumok membránfúzióval jutnak át azon és ez a fajta átjutás csak az animális póluson figyelhető meg. A membránfúzió során a spermium fejének apikális membránja pontszerűen rátapad a pete sejthárttyájára, és az *oolemma* úgymond lehántja a spermium fejének membránját. Ennek eredményeképpen a szubakroszómális anyag és a mag változatlan formában kerül a sejtbe. A spermiumok behatolásának alapfeltétele, hogy apikális része kapcsolódjon az *oolemmához*, Ha a hímivarsejtek fejük oldalsó részével érik el az *oolemmát*, akkor fagocitózis eredményeként kerülnek

be az *ooplazmába*. Így nem tud *pronucleus* képződni, hanem szétesnek és felszívódnak, tehát termékenyíteni nem tudnak (Péczely, 1987).

A megtermékenyítés folyamatát és a ZP glikoproteinek szerepét leginkább az egerekben tanulmányozták. Mindhárom típusú (ZP1-3) glikoprotein nélkülözhetetlen a tüszőérés során a *zona pellucida* kialakulásában (Yanagimachi, 1994; Wassarman és mtsai., 2004). A ZP2 és ZP3 hosszú filamentumokat képeznek, melyeket a ZP1 köt össze (Wassarman és mtsai., 2004). A strukturális tulajdonságaik mellett, a ZP2 és a ZP3 a gaméták egyesülésében is szerepet játszanak. Az egér ZP glikoproteinjét mint elsődleges spermiumkötő receptort azonosították, és mint az akroszóma reakció beindítóját a megkötött spermiumban (Litscher és mtsai, 1995; Yanagimachi, 1994; Wassarman és mtsai, 2004). Az egér ZP2 glikoproteinje pedig elsősorban az akroszóma reakción átesett spermiumot köti a *zona pellucidához*, azaz másodlagos spermium receptor (Bleil és mtsai., 1988). Mivel a madarak ZP3 glikoproteinje homológ az emlősök ZP3 glikoproteinjével, ezért feltételezik, hogy ez a glikoprotein a madarakban is spermium receptorként funkcionál (Waclawek és mtsai., 1998; Pan és mtsai., 2000). Manapság úgy gondolják, hogy a belső szikmembrán ZP1 glikoproteinje felelős a spermium membránhoz kapcsolódásáért. Kísérletekben kimutatták, hogy a belső szikmembránt ZP1 ellenes antitesttel kezelve, teljesen gátlódott a spermiumok átjutása a membránon (Takeuchi és mtsai., 2001; Bausek és mtsai., 2004). Bausek és mtsai (2004) azt is megállapították *in vitro* körülmények között, hogy a spermium akroszómájához speciálisan kapcsolódik a ZP1 és a ZP3 is. Így úgy tűnik, hogy mindkét glikoproteinek szerepe van a spermium membránhoz való kapcsolódásában.

Jóllehet, a polispermiás megtermékenyítés során a spermiumok a petesejt egész felületén kapcsolódnak a belső szikmembránhoz (IPVL) és áthaladnak azon, de sokkal inkább a csírákorong feletti területet preferálják (Bramwell és Howart, 1992a; Birkhead és mtsai., 1994; Steel és mtsai., 1994; Wishart, 1997; Wishart és Staines, 1999). A csírákorong feletti területen megközelítőleg hússzor annyi spermium penetrál, mint más területeken (Bramwell és mtsai., 1995; Wishart, 1997). A csírákorong feletti területen spermiumok nyomán, a membránon keletkezett nyílások száma elérheti a több százat is (Wishart, 1997; Wishart és Staines, 1999). Azonban a mai napig csak feltételezések vannak arra, milyen tényezők hatására részesítik előnyben a spermiumok a csírákorong feletti területet (Ho és Meizel, 1975; Bramwell és Howart, 1992b; Steel és mtsai., 1994; Kuroki és Mori, 1997). Lehetséges, hogy ez a spermiumkötő receptorok eloszlásának sűrűségével magyarázható, vagy különbözhet az akroszóma reakció indukálása, vagy különbözhet a membránok fogékonysága a hidrolízisre az eltérő területeken. Kuroki és Mori (1997) kimutatta, hogy japán fűrjben a preovulációs tüszőn, a spermiumkötő receptorok a csírákorong felett koncentráálódtak. Egyes szerzők szerint az IPVL vékonyabb a csírákorong felett, azonban Bakst és Howart (1977a)

azt állapította meg, hogy az IPVL szerkezete a tojás egész felületén azonos. Az is lehetséges, hogy ez a preferencia nem a membránnal kapcsolatos, hanem magából a csírákorongból ered (*Stepinska és Bakst, 2007*).

Madarokban az IPVL szintjén nincs gátja a polispermiának, a túlzott polispermiának az OPVL szab gátat, mely az infundibulum disztális és a magnum proximális szakaszán rakodik az IPVL köré (*Bakst és Howart, 1977b; Okamura és Nishiyama, 1978*). A megtermékenyítéskor még a petevezető lumenében lévő spermiumok mintegy bele ragadnak az OPVL rostjaiba, így képtelenek áthaladni az IPVL-en. Az elmúlt években általánosan elfogadott tény volt, hogy madarakban polispermiás megtermékenyítés van, azonban a tulajdonképpeni megtermékenyítést végző spermium mindig a csírákorongba hatol be. Napjainkban azonban több olyan adat áll rendelkezésünkre, mely az ellen szól, hogy feltétlenül szükség lenne a polispermiás megtermékenyítésre. Megfigyelések szerint akkor is termékenyülhet a tojás, ha kevés számú spermium található a csírákorong felett az OPVL-ben (*Wishart, 1987; Malecki és Martin, 2002*). Más megfigyelések szerint a csírákorong központjában, ahol biztosan megtalálható a női előmag, sokkal kevesebb spermium penetrál, mint a központ körüli gyűrűben (*Perry, 1987; Waddington és mtsai., 1998*). Az is megállapítást nyert, hogy ha túl sok spermium jut át az IPVL-en a csírákorong felett, az abnormális embriófejlődést okoz. *Hrabia és mtsai (2003)* bebizonyították, hogy ha egy spermiumot juttatunk közvetlenül a csírákorongba, akkor meg tud indulni az embriófejlődés. E megállapítások alapján mondhatjuk, hogy a fiziológias polispermiára sokkal inkább azért van szükség, mert a petesejtbe képest kicsi a csírákorong mérete és biztosan legyen spermium, amely a megfelelő helyen hatol be a csírákorongba. A polispermiára tehát nem magához a megtermékenyítés folyamatához van szükség (*Stepinska és Bakst, 2007*). A túlzott polispermia megakadályozásán túl az OPVL biztosítja a petesejt épségét, mert a hidrolízis során az IPVL szerkezete gyengül (*Bakst és Howart, 1977b; Okamura és Nishiyama, 1978*). Egy termékeny tojásban tízszer annyi spermium esik csapdába az OPVL-ben, mint amennyi penetrációs nyílás keletkezik az IPVL-en (*Wishart 1997*).

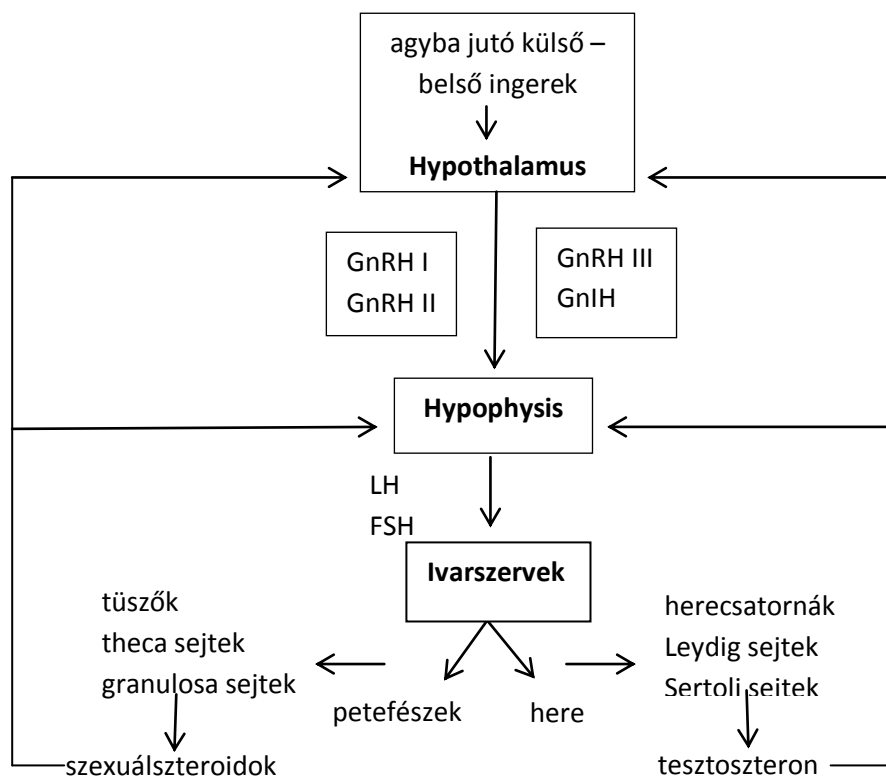
Annak a spermiumnak a maghártyája, amely behatolt a petesejtbe, gyorsan feloldódik és megindul a hím előmag kialakulása. Ennek során a mag fokozatosan legömbölyödik, anyaga megduzzad, és a körülötte levő vezikulumokból új maghártya képződik. A szubakroszómális anyag sokáig megfigyelhető a hím előmag mellett, majd feldarabolódik és fokozatosan eltűnik (*Okamura és Nishiyama, 1978*). A hím és a női előmag egyesülése ún. *Ascaris* típusú. A spermiummal a petesejtbe kerülő centroszóma diploszómát képezve először a két előmag között helyezkedik el, majd elemei a petesejt két pólusára vándorolnak. Az előmagvak maghártyája feloldódik és kialakul mindkét mag területén a haploid kromoszóma garnitúra. Mindkét ivar kromoszómái a

középtengelyben keveredve rendeződnek, majd mitótikusan osztódnak. A tojásképződés során a sorozatos osztódások eredményeképpen blasztoderma alakul ki, vagyis ekkor már blasztula állapotba kerül az embrió. Az embrió fejlődése ebben az állapotban áll meg a letojt tojásban (Péczely, 1987; Stepinska és Bakst, 2007).

2.1.6. A szaporodás hormonális szabályozása

2.1.6.1. Az ivarszervek endokrin működésének szabályozása

Az ivarszervek működését az emlősökhöz hasonlóan a *hypothalamus-hypophysis-gonád* tengely szabályozza (1. ábra). A *hypothalamus*nak kiemelt szerepe van a szabályozásban, mivel az agynak ez a része az összekötőkapocs az idegrendszer és az endokrin rendszer között. A *hypothalamus* viszonylag kis területe az agyalapnak. Neuronjainak jelentős hányada endokrin sejt, mert hormonok felszabadításával reagálnak az idegi hatásokra (Forgó, 2002).



1. ábra: A *hypothalamus-hypophysis-gonád* tengely szabályozása

A fajoként változó szerkezetű *gonadotrophormon releasing hormon* (GnRH-I) a *hypothalamusból* irányítja a gonadotropinok felszabadulását a *hypophysisből* (Millam és mtsai., 1989). A 80-as években mutatták ki, hogy madarakban két különböző GnRH létezik, melyeket GnRH-I és GnRH-II-ként különböztetnek meg (King és Millam, 1982; Myamoto és mtsai., 1983). Azóta Shimizu és Bedecarrats 2006-ban a fehér Leghornban a GnRH III-at is azonosította. A GnRH-I *in vivo* és *in vitro* LH felszabadulást vált ki. A fény stimulálja a GnRH szekréciót, melynek hatására az LH kiáramlása is növekszik, viszont a szexuáliszteroidok magas plazma szintjének hatására csökken. Nőivarban az ösztrogén és progeszteron, hímivarban a tesztoszteron képes változtatni a GnRH hatását az LH szekréciójára (Davies, 1976). Nőivarú madarakban a progeszteron egyaránt gátolhat és stimulálhat, ezzel szemben az ösztrogén a ciklus során csupán negatív *feedback* hatással rendelkezik (Wilson és mtsai., 1976). A szexuáliszteroidok negatív *feedback* hatása az LH felszabadulására a *hypothalamus* szintjén érvényesül (Stetson, 1972), mivel a részletesebb vizsgálatok azt mutatják, hogy a gonadális szteroidok a *hypophysis* szintjén inkább serkentőleg hatnak az LH felszabadulására (Knapp és mtsai., 1987).

Madarokban az LH az ovuláció kiváltásában játszik fontos szerepet (Kowalski és mtsai., 1991). A szaporodásban betöltött szerepének megfelelően lassan, fokozatosan emelkedik az LH szint az infantilis madarakban, majd a prematuráció időszakára viszonylag magas szintet ér el (Johnson és van Tienhoven., 1984). A tojásrakás időszakában átmeneti csökkenést követően preovulációs LH csúcsok alakulnak ki, a progeszteron csúcsokat követően (Etches és Cunningham, 1976). Az LH szintje lecsökken a szaporodási ciklus végén (Burke és Dennison, 1980). A költést követő fotorefrakteritás időszakát szintén alacsony LH szint jellemzi (John és mtsai., 1983). Hímivarban a here androgéntermelését az LH szintje szabályozza. Fokozza az *interstitialis* sejtek tesztoszteron termelését, még *in vitro* körülmények között is, viszont nem hat a heretubulusok spermatogenetikus aktivitására, valamint a Sertoli-sejtek *hyperplasiáját* sem okozza (Péczely, 1987).

A *hypothalamus* irányítása az FSH szekréciójára kevésbé világos, mert *in vitro* injektált GnRH csak kis mértékben befolyásolta az FSH mennyiségét (Kirby és mtsai., 2005). Az FSH serkenti a petefészekben a kis fehér és kis sárga tüszők fejlődését, a középnagy sárga tüszőkben folyó progeszterontermelést (Calvo és Bahr, 1983), valamint a kis fehér tüszőkben a progeszteron, androszténion és ösztrogén szekrécióját (Kowalski és mtsai., 1991). Szexuálisan inaktív madárban az FSH a herecsatornácskák hámrétegének osztódását, így megvastagodását és a Sertoli-sejtek *hyperplaziáját* okozza. Hatására a Sertoli-sejtek megnagyobbodnak és számuk is növekszik, utalva arra, hogy az FSH hatás a Sertoli-sejtek receptorain keresztül e sejteket aktiválva valósul meg (Brown és mtsai., 1975).

A „klasszikus” neuro-endokrin hatással egyidejűleg a GnRH és szintetikus analógjai neuromodulátor hatásaikkal változtatni képesek a reprodukciós kapacitást, ezzel széles spektrumú magatartás-élettani hatást váltanak ki (*Péczely és mtsai., 1988*). Emellett a GnRH az ivarszervekben is termelődik, ahol lokális - ma még kevésbé ismert - hatást fejt ki. A szintetikus GnRH analógok közös tulajdonsága a nagyobb receptor-kötődési affinitás, amely hosszabb hatást eredményez, így mind a gonadotrop hormonok erőteljesebb felszabadításával, mind magatartás-élettani hatásával számos közlemény szerint alkalmas humán és állati szaporodási hypofunkciók kiküszöbölésére (*Skarin és mtsai., 1984*). A hím madarakban a here gametogenetikus és endokrin működésének tartós befolyásolására kétféle GnRH agonista tűnt sikeresnek az eddigi eredmények alapján. E vegyületek kis dózisának mérsékelt számú, ismételt alkalmazásával ondótermelés fokozódást és libidóemelkedést tudtak elérni (*Péczely, 1989*).

2.1.6.2. A petefészek endokrin működése

A petesejt termelése mellett a szteroid hormon szintézis az egyik legfőbb feladata a petefészeknek. Ez a feladat elengedhetetlen az ivarszervek fejlődéséhez és működésük fenntartásához. A szteroidok a reprodukciós folyamatok egyes részeit specifikusan szabályozzák (*Forgó, 2002*).

A petefészek tüszői gyors növekedési fázisba kerülnek az ivarérettség során, melynek hatására létrejönnek a legnagyobb fehér tüszők. A folyamat hormonális irányításában fontos szerepe van a 17β -ösztradiol-koncentráció növekedésének a plazmában (*Senior, 1974*). Az ösztradiol szint emelkedésével egyidőben az LH-szint hirtelen csökken, s a progeszteron szintén alacsony szintre süllyed (*Johnson és van Tienhoven., 1984*). Sajnos ez ideig semmit nem tudnak a plazma FSH-koncentrációjában történő változásokról, ebben az időszakban.

A plazma LH-szintjének csökkenésével egybeeső alacsony progeszteron koncentráció arra enged következtetni, hogy az előzőekben magas LH-szint nemcsak eredménye, de fenntartója is volt a fokozott progeszteron-szekréciónak. A maturáció kezdetén, az eddig ingadozó hormon ingadozásmentessé válik (*Murray és mtsai., 1980a; 1980b*). Ebben az időszakban a kis sárga tüszők hormontermelő képességét mutatja az alacsony progeszteronkoncentráció. A sárga tüszők érése folyamán tehát csökken az ösztrogén és nő a progeszteron-szekréciónak (*Péczely, 1987*).

Fraps (1946) állapította meg kísérletei alapján, hogy a tojásrakás sorozatokban (*clutch*) történik. Vadmadarakban a tojásrakási ciklus a sorozattal befejeződik. Más fajok esetében viszont egy-két napos szünet után újabb sorozat indul. Az ovulációk közötti időt egy sorozaton belül, a tojás képződéséhez szükséges idő határozza meg. A madár petefészkeben egyidejűleg jelenlévő

különböző fejlődési stádiumban lévő tüszők nagyon megnehezítik a gonadotropinok és a szexuáliszteroidok közötti pozitív visszacsatolós kapcsolatok értelmezését. Az FSH szerepéről keveset lehet tudni, valamint a posztovulációs tüsző hormontermelésének jelentőségéről is.

Az elsődleges tüszők progeszterontermelésének fontos szerepe van a preovulációs LH-csúcs kialakításában. A progeszteronkoncentráció jelentős növekedése hasonló jellegű preovulációs csúcsot hoz létre, valamivel megelőzve az LH-szintjének növekedését (*Johnson és van Tienhoven, 1984*). A progeszteron szerepét több kísérlettel is igazolták. Például intakt állatokban ösztrogén és progeszteron előkezelést követően progeszteroninjekcióval peteleválást váltottak ki (*Péczely, 1987*). A progeszteron szintjének növekedése gyorsan lezajlik, és még az ovuláció előtt igen kis értékre esik vissza (*Hertelendy és Asem, 1984*). *Celebi és Güven (2001)* lúdban vizsgálták a progeszteron változását az ovulációs ciklus során. Eredményeik szerint a preovulációs csúcs közel annyi idővel előzi meg az ovulációt lúd esetében is, mint azt a tyúknál, a japán fürjnél és a pulykánál már leírták.

A preovulációs LH-csúcs kialakításában nincs közvetlen szerepe az ösztrogéneknek. Ezt bizonyítja az a tény is, hogy az ovulációt megelőző néhány órában nincs a progeszteroncsúcsához hasonló ösztrogénszint emelkedés. A rendszertelenül megfigyelhető ösztrogéncsúcsok ugyan néha egybeeshetnek a progeszteron preovulációs maximumával, de ez rendszeresen nem fordul elő (*Péczely és mtsai., 1987*). *Senior (1974)* vizsgálatai során megállapította, hogy a plazmában található ösztrogén mennyisége nem csak a sárga és nagy fehér tüszőből származik. Ha a bal petefészket eltávolítják, a fejletlen jobb petefészek képessé válik az ösztrogén szekréciójára.

A tesztoszteron a nőivarú madarakban fontosabb élettani szerepet tölt be, mint nőtény emlősökben. Az ivarérés kezdetén szintje szabályosan ingadozik a plazmában, ami a peteérés szabályozásában játszott szerepére enged következtetni (*Murray és mtsai., 1980a*). Ha van F₁ típusú tüsző a petefészekben, akkor a tesztoszteron fokozza az LH kiáramlását (*Wilson és Sharp, 1976*).

2.1.6.3. A here endokrin működése

Hím madarakban az FSH, az LH és az androgének szintje egyidejűleg növekszik a maturáció során. Szexuálisan inaktív hím-madárban az FSH a herecsatornácskák hámrétegének osztódását, így megvastagodását és a Sertoli-sejtek *hyperpláziáját* okozza. Hatására a Sertoli-sejtek megnagyobbodnak és számuk is növekszik, utalva arra, hogy az FSH hatás a Sertoli-sejtek receptorain keresztül e sejteket aktiválva valósul meg (*Brown és mtsai., 1975*). A here aktiválódásával együtt jár a plazma androgén-, FSH- és LH-szintjének növekedése, amely a here tömegének növekedése előtt indul meg. A legtöbb madárban a here működése szezonális jellegű, melyet tömegének változása jelez. A szezonális reaktiváció idején a kanyarulatot

herecsatornácskákban megindul és intenzívvé válik a spermatogenezis (*Murton és Westwood, 1977*). A spermatogenezis idején a Leydig-sejtek is a maximális aktivitás jellemzőit mutatják. A Leydig-sejtek LH hatásra jól reagálnak, hasonlóan, mint a fotostimuláció hatására, megnagyobbodnak. A megnagyobbodást a plazma tesztoszteronszintjének növekedése kíséri. A here aktivitásának csúcsideszakában a tesztoszteronszint kissé csökken, ezután viszont állandó szinten marad a kopulációs időszakban (*Péczely, 1987*).

2.2. A termékenységet meghatározó tényezők

A brojler szülőpár tenyésztés során a szaporasági mutatók közül a termékenység az egyik legfontosabb faktor, hiszen ez határozza meg leginkább a tenyésztés finansiális sikerét. A szülőpár tenyésztés során a legnagyobb feladat maximalizálni az egy tyúkra jutó csibeszámot. Azonban a végtermék esetében a legfontosabb szempont a nagy növekedési erély és a kiváló húskihozatal. Tehát a szelekció elsősorban arra irányul, hogy a legnagyobb tömegű kakasok kiválogatásával a legrövidebb idő alatt legnagyobb tömeggyarapodást elérő brojler populációt hozzák létre. Ezek a tulajdonságok azonban negatív korrelációban vannak a szaporasági mutatókkal (*Reddy és Sadjadi, 1990; Robinson és mtsai., 2007*).

A nagymértékben felgyorsult testtömeg-növekedés szaporodásra gyakorolt hatását két külön részre lehet bontani. Az első jelek az 1960-as években jelentkeztek a nőivarban és az 1980-as években a hímivarban. Ekkor szembesültek a túlzott mértékű táplálékfelvétel és így az elhízás káros következményeivel (*Eitan, 2001*). Ezt követően a nőivarban, az 1980-as években, míg a hímivarban az 1990-es években merültek fel újabb problémák. Ekkor detektálták, hogy természetes megvilágítás mellett, ahogy közeleg a szaporodási időszak vége, csökken a tojástermelés és a termékenység. Felismerték, hogy fényprogrammal befolyásolható a testtömeg növekedése és az ivarérés (*Eitan, 2001*). A nagy testtömeg és a megnövekedett zsírlerakódás láb problémákhoz, korai ivaréréshez és felgyorsult tüszőéréshez vezet, valamint megnövekedik a többszörös ovuláció száma is (*Beer, 2007*). Megfelelő takarmányozási programmal növelhető a szaporodási teljesítmény. Az ivarérés késleltetésének egyik eszköze a táplálékfelvétel korlátozása (*Yu és mtsai., 1992; Heck és mtsai., 2004; Onagbesan és mtsai., 2006*). A korlátozás hatására csökken az elhullás (*Katanbaf és mtsai., 1989; Heck és mtsai., 2004*), csökken a túl nagyméretű follikulusok képződése (*Hocking és mtsai., 1989; Heck és mtsai., 2004*), valamint csökken a tojás derformitások előfordulásának mértéke is (*Fattori és mtsai., 1991; Yu és mtsai., 1992; Heck és mtsai., 2004*). Az ismertetett előnyöknél még fontosabb, hogy vizsgálatok igazolták, hogy korlátozott takarmányozás mellet

tartott tyúkok több tojást termeltek, mert hosszabb ideig maradtak termelésben és a termelési időszakon belüli ciklusaik is hosszabbak voltak (*Robinson, 1991; Fattori és mtsai., 1991; Yu és mtsai., 1992; Heck és mtsai., 2004; Onagbesan és mtsai., 2006*).

A takarmány mennyiségén túl fontos annak megfelelő összetétele is. A szaporodási időszak mindkét nemben, de főként a nőtény madarak szervezetében az anyag- és energiaforgalom nagymértékű megnövekedésével és átrendeződésével jár. Alapvető tehát, hogy a szaporodási ciklus során a hím és nőtény madár mennyiségileg és minőségileg megnövekedett fehérjeigényét megfelelő összetételű takarmánnyal elégítsük ki (*Péczely, 1987*). Az optimális termeléshez a szükségleteknek megfelelő energia-, fehérje-, és vitaminellátáson felül a megfelelő makro-, illetve mikroelemek ellátásáról is gondoskodni kell. Munkám során a szerves szelén, mint az egyik létfontosságú mikroelem és az E-vitamin szaporodásra gyakorolt hatását vizsgáltam, ezért ezek szerepét részletezem.

A szelén azon nyomelemek egyike, amely mint számos szelenoprotein alkotóeleme, a szervezet antioxidáns rendszerének nélkülözhetetlen alkotója. Az elmúlt évtizedben számos enzimről kiderült, hogy a szelén nélkülözhetetlen alkotórészük. Szerepe elsődlegesen az un. szabadgyökök megkötésében van (*Surai és mtsai., 1999*), élettani hatását a természetes antioxidánsként funkcionáló E-vitaminnal együtt, több lépcsős biokémiai folyamatban fejti ki. Az állati szervezet a szerves formáját tudja hatékonyabban hasznosítani, ezáltal tud a szervekhez, szövetekhez eljutni és az izomszövetben, valamint a tojásban akkumulálódni. A nem megfelelő szelén ellátottságnak a baromfityenyésztésre gyakorolt hatása főként a csökkent termelési és szaporodási teljesítményben, valamint a káros stresszhatások kivédésének gyengülésében nyilvánul meg. Jóllehet, a lehetséges stresszfaktorok listája telepenként más és más, de az állapotra a szabadgyökök túltermelése és az antioxidánsok iránti szükséglet a jellemző (*Surai és mtsai., 2006*).

A spermiumok membránjában nagy mennyiségű többszörösen telítetlen zsírsav található, ezért fokozott antioxidáns védelemre szorulnak (*Long és Kramer, 2003*). A szerves szelén hatására a spermiumok ellenállóbbak a lipidperoxidációval szemben (*Surai és mtsai., 1998*). Több kutatás arról számol be, hogy a kakasok termékenyítőképességére, az ondóminőségre pozitív hatással van a 0,3 mg/kg mennyiségben adagolt organikus szelén (*Hansen és Deguchi, 1996; Edens, 2002*). Modellszintű kísérletek bizonyították, hogy a brojler szülőpárok szaporasági problémáinak megoldásában a szerves eredetű szelénnek nagy jelentősége lehet. Az eddigi eredmények biztatóak, miszerint mind a hím-, mind a nőivarban számszerűleg kifejezhető pozitív hatása van az organikus szelénnek (*Sefton és Edens, 2004*).

Az E-vitamin a vitamineredetű antioxidánsok csoportjába tartozik. Az E-vitamin elnevezés nyolc, kémiaailag hasonló vegyület (tokoferolok) gyűjtőneve. Antioxidáns hatása révén a sejtmembránban, illetve az extracelluláris térben lévő többszörösen telítetlen zsírsavakat védi a reaktív oxigénradikálok káros hatásaitól (*Bjelakovic és mtsai., 2007*). Az E-vitamint először 1981-ben pulyka spermában mutatták ki és megállapították, hogy a sperma E-vitamin tartalmának 88%-a magában a spermiumban található (*Khan, 2011*). Mint ahogy az előzőekben említettem, az ivarszervek esetében a szelén és E-vitamin hatása együttesen jelentkezik. Kölcsönhatásuk egyes hiánytünetek esetében egyértelmű, azonban a kórokok megszüntetésében nem minden esetben pótolhatják egymás hatását. *Surai és mtsai (1997)* szerint a kakasok termékenyítőképességének csökkenéséhez a herében csökkent E-vitamin szint társul az életkor előrehaladtával.

Az E-vitaminnak nem csak a hímivarban van nagy jelentősége, hanem a nőivarban is. A tojássárgájában az E-vitamin a legfontosabb antioxidáns, mely beépül a fejlődő embrióba. A vizsgálatok során azonban bebizonyosodott, hogy a takarmány E-vitamin tartalmának növelése nem minden esetben volt pozitív hatással a tojás minőségére és a kelthetőségre (*Surai és Fisinin, 2012*).

A termékenységre jelentős hatást gyakorol a környezet hőmérséklete. Amikor a hőmérséklet oly mértékben emelkedik, hogy az anyagcsere fokozódása teljes mértékben az állat testének hűtésére irányul, a produkciós-energia termelés meredeken csökken és a szaporodási tevékenység megszűnik (*Murton és Westwood, 1977*). Az éjszakai órákban jelentkező magas hőmérséklet erőteljesebben gátolja a szaporodást, mely azzal magyarázható, hogy az ovulációk nagy száma erre az időszakra esik, illetve a tojáshej is ekkor képződik (*Péczely, 1987*). *Cowan és Michie (1980)* eredményei szerint az életkorral csökken a hőtűrőképesség. Vizsgálatuk szerint a megnövekedett hőmérséklet nagyobb mértékben csökkentette az egy éves tyúkok tojástermelését, mint azokat, melyek éppen elkezdték a termelést.

A tojások termékenységében alapvetően a hímivar, és a nőivar a meghatározó. Hogy melyik ivar hatása jelentősebb a tojások termékenységében, a mai napig vitatott (*Hocking és Bernard, 2000*). A termékenységi problémákért sokáig inkább a hímivart tették felelőssé, azonban az elmúlt években bebizonyosodni látszik, hogy a nőivarnak éppen akkora a felelősége, ha nem nagyobb (*Pierson és mtsai., 1988; Fasenko és mtsai., 1992; Bramwell és mtsai., 1996; Gumulka és Kapkowska, 2005*). A termékenységet a hímivar oldaláról az ondó minősége és a kakasok libidója (párási hajlandóság), a nőivar részéről a tojás összetétele, a tojó spermiumbefogadó-készsége, illetve -képessége határozza meg. Több vizsgálat számol be arról, hogy az ondó minősége romlik az életkorral (*Sexton és mtsai., 1989; Renden és mtsai., 1991; Hocking és Bernard, 1997*). Az általános

nézettel szemben a kakasok ondóminőségének romlása *Bramwell és mtsai. (1996)* szerint a kor előrehaladtával nem olyan mértékű, ami jelentős termékenységsökkenést okoz. Nagyobb gond a kakasok elhízásából adódó alkati lábgyengeség, valamint libidócsökkenés (*Duncan és mtsai., 1990*), ami miatt a párzások gyakorisága feltehetőleg csökken. A másik, inkább szexuáletológiai probléma, hogy a kakasok az egyhangú környezetben 4-5 hónap elteltével valószínűleg „ráunnak” a háremükbe tartozó tojókra (*Wishart és Wood, 1994*).

A tojótyúkók spermiumtároló kapacitása döntően befolyásolja a termékenységet, mely a genetikai tényezőkön túl (raktározó tubulusok mérete, száma) nagymértékben függ a tojó korától, azaz a termelési ciklusban levő helyzetétől. Vizsgálatok igazolták, hogy a termelési csúcsot követően a spermiumtároló csövecskék ürülése felgyorsul, azaz rövidebb ideig képesek a tojók tárolni a spermiumokat (*Brillard, 1993*), ami azt jelenti, hogy fiziológiai szempontból a tojások termékenységéhez a ciklus előrehaladtával mind több és több spermiumra van szükség. *Birkhead és Brillard (2007)* foglalta össze, hogy mely körülmények gátolhatják a megtermékenyülést:

1. nem vagy csak kevés spermium jut el a spermiumtároló tubulusokig,
2. probléma jelentkezhet a tubulusok feltöltődése, illetve kiürülése során,
3. nem jut el spermium a termékenyítés helyszínére, az infundibulumba,
4. nem jutnak át a spermiumok a perivitellin membránon,
5. a *pronucleus*ok nem egyesülnek.

Minél több spermiumtároló tubulus található az uterovaginális szűkületben, annál több spermium jut a termékenyítés helyére, ebből adódóan magasabb termékenység várható (*Bakst és mtsai., 2010*).

A megfelelő ivararány meghatározása szintén nagymértékben befolyásolja a termékenységet. Az Aviagen Ltd. Ross 308 hústípusú szülőpárok – melyekkel a kísérleteinkben dolgoztunk - tartási technológiája szerint (*Technological description of ROSS Breeders Limited*) a termelés indulásakor 9 kakas / 100 tojó ivararányt kell biztosítani, majd a termelés előrehaladtával folyamatosan csökkenteni kell a kakasok létszámát, ami a ciklus végére 6 kakas / 100 tojó arányra csökken. Ennek célja a technológiai leírás szerint a tojók kímélése, a párzások zavartalanságának biztosítása, az agresszió csökkentése, a kakasok több mozgásra készítése a nagyobb hárem biztosításával. Ismert, hogy a tojók tojástermelésének csökkenése a ciklus második felében nem azt jelenti, hogy az állomány 30-50 %-a végleg abbahagyja a termelést, tehát kevesebb kakas is elég a termékenység fenntartásához, hanem azt, hogy az un. *clutch*-ok közötti rövid szünetek fognak hosszabbodni, tehát több-kevesebb tojást a tojók zöme a ciklus végéig termel (*Etches, 1996*). Ez azt jelenti, hogy a gyakori párzásokra továbbra is szükség van, sőt a spermiumtároló tubulusok

gyorsabb ürülése, valamint a spermatermelés állítólagos gyengülése miatt jóval több spermium szükséges a termékenység magas szinten tartásához.

2.3. A termékenység meghatározásának módszerei

Egy baromfiállomány szaporításának eredményességét a termékeny tojások százalékában fejezik ki. A tojások termékenységének meghatározása a gyakorlatban általában lámpázással történik. A lámpázás a keltetés bármely napján elvégezhető, de – ideális esetben – az első lámpázásra a legmegfelelőbb időszak a keltetés első kritikus szakasza után van, ami tyúkfajban a 6-7. nap. A második ellenőrzésre a keltetés félidejében, az extraembrionális hárttyák záródásakor kerül sor, mely tyúkfajban a 11-12. napon történik meg. A harmadik lámpázás pedig a bujtatógépbe való átrakással egy időben történik, tyúkfajban a 19. nap végén (*Bogenfürst, 2004*). Az első átvilágítás alkalmával a terméketlennek tűnő tojásokat, az un. véres tojásokat, valamint a rendellenes embriófejlődést mutató tojásokat távolítják el. A keltetés félidejében végzett lámpázással leginkább a fejlődés üteméről és a magzatburkok fejlettségéről kapunk információkat. A bujtatáskor végzett átvilágítás alkalmával eltávolítják az elhalt embriókat tartalmazó tojásokat és minősítik a magzatok fejlettségét (*Bogenfürst, 2004*). E módszerek hátránya azonban, hogy a terméketlenségre csak több hetes késéssel derül fény, így az esetleges termékenységi problémákra késve lehet csak reagálni és a szükséges intézkedéseket megtenni.

A lámpázás során a terméketlen tojások közé kerülnek azok a tojások is, melyekben az embriófejlődés kezdetén, még a petevezetőben, a vérszigetek kialakulása előtt következett be embrióelhalás. Egyes vélemények szerint ezeknek a tojásoknak a jelenléte nem termékenységi problémára vezethető vissza, hanem a tojások belső minőségéből adódik (*Bogenfürst, 2004*). *Eyal-Giladi és Kochav (1976)* volt az első, aki leírta a csirke embrió fejlődését a petevezetőben és I-VI szakaszt állapított meg. A tojások feltörésével és a csírákorong propidium-jodidos festésével megállapítható a tojások „valódi” termékenysége, tehát az igen korai embrióelhalások aránya (*Liptói és mtsai., 2004*).

A termékenység megítélésének egy másik gyakori módszere a nem inkubált tojásokban a csírákorong egyszerű vizuális vizsgálata, az un. Kosin-teszt (*Kosin, 1945*). E módszernek az alapja, hogy a megtermékenyített csírákorong a sejtosztódás következtében nagyobb és jól látható körkörös gyűrűket tartalmaz. A terméketlen csírákorong kisebb, kompakt, középpontjában fehér, átlátszó sejttöregeket figyelhetünk meg. E módszer egyik hátránya, hogy a termékenység csak kb. 80%-os biztonsággal állapítható meg.

Az előzőekben említett két módszer további lényeges hátránya a termékenység megítélésében rejtőzik, ugyanis a tojás termékeny volta csupán arról ad tájékoztatást, hogy egyetlen spermium megtermékenyítette-e a petesejtet vagy sem, azonban nem tudjuk, mi van a feltételezhetően ott levő többi százmillió spermiummal, azaz a későbbiekben várható termékenységgel. Ugyanis a termékenyítés hatékonysága, a fertilis periódus hossza, a normális fejlődésű embriók aránya a petevezetőben jelenlevő hímivarsejtek mennyiségétől függ, ezért érthető, hogy a termékeny tojások százalékos arányának ismerete nem eléggé informatív.

A sikeres spermium-transzport meghatározásának közvetlenebb módja a letojt, nem inkubált tojásokban kimutatható spermiumok meghatározása, amelyek a termékenyítés idején és helyén körülveszik a petét, azaz kapcsolatba kerülnek a szikhártyával. Az itt kimutatható akár több ezer spermium a szaporítás hatékonyságáról sokkal többet árul el, mint az egyszerű kétesélyes „termékeny – nem termékeny” meghatározás. (*Wishart, 1997*). Ennek egyik lehetséges módszere, azoknak a spermiumoknak a kimutatása, melyek a külső perivitellin membránban, úgymond csapdába estek (OPVL-spermiumok). Több szerző is rávilágított arra, hogy az inszeminált spermiumok száma és az OPVL spermiumok száma között összefüggés van (*Wishart, 1987; Brillard és Antoine, 1990; Wishart és mtsai., 1992*). *Wishart (1997)* megállapította, hogy 3 OPVL-spermium/m²-nél már biztos a termékenység. Egy évvel később kimutatták, hogy egy állomány tojásaiban található OPVL-spermiumok mediánja szorosan összefügg az állomány termékenységével (*Staines és mtsai., 1998*). A módszer hátránya, hogy a spermiumok kimutatásához karcinogén fluoreszcens festékre és viszonylag nagy nagyítású fluoreszcens mikroszkópra van szükség (*Staines és mtsai., 1998*).

A petesejttel kapcsolatba kerülő spermiumok (IPVL spermiumok) kimutatásának másik módszere, az akroszóma reakció során keletkező hidrolizált nyílások számának meghatározása. A csírákorong fölött található nyílások száma akár 1000 is lehet, bár már 6 nyílás jelenléte jelzi, a petesejt termékenyülhetett. Ha 6-nál kevesebb a nyílások száma, kicsi a valószínűsége a termékenyülésnek, és ha nincsenek nyílások, biztos, hogy nem termékenyült a tojás (*Wishart, 1997*). Nagy előnye a módszernek, hogy elvégezhető egy egyszerű, sötétlátóteres mikroszkóppal és fiziológiás sóoldattal.

2.4. Mesterséges termékenyítés

A baromfi mesterséges termékenyítésével kapcsolatos első vizsgálatok *Iwanow (1912)* nevéhez fűződnek, aki leölt kakas ondóvezetőjéből nyert spermát (*Busch és mtsai., 1991*). A mesterséges

termékenyítés első úttörője *Burrows és Quinn (1935)* volt, akik a spermavétel céljából kidolgozták a *dorso-abdominalis* masszázst. Ezt követően több szerző számolt be az ondógyűjtésről, kezeléséről és a mesterséges termékenyítés folyamatáról (*Sexton, 1979; Lake, 1986; Donoughe és Wishart, 2000*). A mesterséges termékenyítésnek a baromfitenyésztésben a nagy súlyú pulykahibrideknél és a mulard előállításánál van jelentősége. A többi fajnál gazdaságossági szempontok miatt nem elterjedt (*Schramm, 2005*).

Tyúkfajban egy ejakulátum mennyisége 0,3-1,0 ml és a sejtkoncentráció $2,5-5,5 \times 10^6/\mu\text{l}$. Az ondó hígítására különféle hígítók állnak rendelkezésre, a hígítási arány általában 1:1, vagy 1:3. Az irodalmi adatok szerint egy kakas ondójával hígítás után 100 tojó termékenyíthető. A legmagasabb termékenységi eredményeket akkor kapjuk, ha kb. 100 millió motilis sejttel, a spermavételt követő 20 percen belül termékenyítünk. A termékenyítésre legalkalmasabb a kora délután, amikor a petevezetőben már nem található meszes héjú tojás. A mesterséges termékenyítés eredményességét a sperma mennyiségre és minőségre történő szelekcióval próbálják javítani (*Schramm 2005*).

2.5. A stressz hatása a szaporodási folyamatokra

Stressz-tényező jelentkezésekor a szervezetben két fiziológiai folyamat aktiválódik, melyek kapcsolatban vannak egymással, de egymástól függetlenül is jelentkezhetnek. Az első a Cannon-féle vészreakció, mely a *simpatico-adrenalis* rendszer mozgósításával jár. Ez a reakció ugyan nagyhatású, de rövid ideig tart: a szimpatikus idegrendszer aktiválódásának eredményeképpen a mellékvesében az adrenalin szekréciója fokozódik (*Zulkifli és mtsai., 1995*). Ezt követően a második folyamat aktiválódik: a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely, amit Selye szerint „általános adaptációs szindróma”-ként ismerünk (*Zulkifli és mtsai., 1995*). Az adaptációs mechanizmusnak három szakasza figyelhető meg: az alarm-reakció, amelyet ACTH és ennek eredményeként a glükokortikoidok szekréciójának növekedése jellemez. A második szakasz az ellenállás szakasza, melyet a tartósan magas ACTH és glükokortikoid szint (emlősöknél főként kortizol, míg madaraknál kortikoszteron) jellemez. A későbbiek során, mivel a glükokortikoidoknak ellenálló képességet gyengítő hatásuk van, ezért a harmadik, ún. kimerülési szakasz jelentkezik, amely a hipofízis, a mellékvesekéreg, a nyirok- és a vérképzőrendszer regressziójával és az energiatartalékok kimerülésével jár, ami végül az állat elhullásához is vezethet (*Husvéth, 1994; Zulkifli és Siegel, 1995*). A környezeti stresszorok abiotikus (fény viszonyok, hőmérséklet, kémiai elemek) és biotikus tényezőket (rangsor, takarmányozás, különböző fertőzések) foglalnak magukba, melyek felléphetnek önállóan és együttesen is (*Bijlsma és Loeschcke, 2005*).

Az emlősökhöz hasonlóan madarakban is gyorsan reagál a CRF-ACTH-kortikoszteron tengely a stressz-hatásokra. Azt, hogy a madarat mekkora stressz érte, jól jelzi a (vér, tojás) kortikoszteron koncentrációjának növekedése. Az akut stresszt követő emelkedő glükokortikoid szint számos élettani és viselkedésbeli változást válthat ki (*Holmes és Phillips, 1976*). A kedvezőtlen környezetben való túlélést direkt módon segíthetik ezek a változások, de ennél is fontosabb, hogy a krónikus stressz hatását segítik elkerülni (*Wingfield, 1994*). A kortikoszteronnak fontos szerepe van a viselkedési és élettani változások összehangolásában is. A kortikoszteron-válasz függ az egyedtől (*Silverin, 1986*), az ivartól, ugyanis e hormon szint emelkedése bizonyos helyzetekben, pl. a költési idényben kedvezőtlen lehet, mert a fészek elhagyását is kiválthatja (*Astheimer és mtsai., 1994*). A kortikoszteron szint és szekréciós ráta jellegzetes napi változást mutat, legmagasabb értékét a fotoperiódus kezdetén, a legalacsonyabbat a fotoperiódus vége előtt 1-2 órával lehet mérni (*Majsa és mtsai., 1976; Beuving és Vander., 1978; Kovács Péczely, 1983*).

A környezeti stresszorok, mint például az állatok áttelepítése, új fajtársak közé kerülés, vagy a tojófészkek mozgatása késleltetheti az tojásrakást (*Duncan, 1970; Hughes, 1979; Hughes és mtsai., 1986; Watt és Solomon, 1988*). Ezek a körülmények egyben jellegzetes tojásbéj deformitásokat okoznak, melyek jelentős bevétel kieséssel járnak (*Hughes és mtsai., 1986*). Ennek magyarázata, hogy stressz hatásra válaszként adrenalin szabadul fel, mely gátolja az *uterus* összehúzódásait, így késlelteti a tojásrakást (*Weiss és Sturkie, 1952; Sykes, 1955; Hughes és Black, 1976*).

Sokáig általánosan elfogadott volt az a nézet, hogy az emlősöknél igazolt intrauterinális anyai hatások az *ovipara* madárban nem jelentkeznek. *Schwabl (1993)* megállapította azonban, hogy a tojás szikanyagában jól mérhető és eltérő mennyiségű szteroid hormon mutatható ki. A szteroid hormonokról viszont tudott, hogy mint transzkripciós faktorok a gének expresszióját jelentősen képesek módosítani. Tehát jelentős megállapítás, hogy a szik szteroid tartalma változik, például a tesztoszteron mennyisége fokozatosan nő a lerakott tojások számával. Feltételezhető, hogy a növekvő szteroid koncentráció kompenzálja a később lerakott tojásból kikelő utód un. hátrányos helyzetét (*Schwabl, 1996*). A szik tesztoszteron tartalma és a kikelt fióka agresszivitása és életképessége között szoros pozitív korrelációt mutattak ki. Bizonyított emellett, hogy a kelés szinkronizálásához is hozzájárul a tesztoszteron (*Eising és mtsai., 2001*). *Hayward és Wingfield (2004)* vizsgálatai szerint, ha japán fűrj tojókba kortikoszteron implantátumot ültettek, akkor magasabb kortikoszteron koncentrációt mértek a tojásszikben, majd a kelési százalék is alacsonyabb lett, sőt ezen túl a kikelt csibék lassabban is nőttek a kontroll társaikhoz képest. *Szőke (2008)* munkája során arra a megállapításra jutott, hogy stresszhatásra a tojásban megemelkedett kortikoszteron szint együtt jár a tojásméret és az embrióelhalások arányának növekedésével. Ezáltal

igazolta, hogy az embrióelhalások mögött nem csak genetikai okok állhatnak, hanem a tojómadáron keresztül a tojásba jutott hormonmennyiség is befolyásolhatja a kelés sikerességét.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérleti állatok és tartásuk

Kísérleteinket a jelenlegi Haszonállat-génmegőrzési Központ jogelődjeként működő Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet területén végeztük Ross 308 húshibrid szülőpár állománnyal. Az állatokat a brojler szülőpár tartás minden feltételének és előírásának megfelelő kísérleti istállóban helyeztük el 20 hetes korban, „Farádi” Mezőgazdasági Szövetkezet, farádi telepén neveltek fel számunkra. Ezt követően a Ross 308 tartástechnológiájának megfelelően az **1. táblázatban** bemutatottak szerint emeltük mind a megvilágított időtartamot, mind a fényerősséget. Az állatok testtömegét hetente ellenőriztük és ennek megfelelően alakítottuk a takarmányadagokat. A kakasokat a 24. élethétig külön fülkékben tartottuk, ezt követően alakítottuk ki a kísérleti csoportokat.

1. táblázat: Megvilágítási program

ÉLETHÉT	VILÁGÍTOTT ÓRÁK (10-12% CV)	FÉNYERŐSSÉG
20	11	60 lux
21	12	
22	12	
23	13	
24	13	80 lux
25	14	
26	14	
27	15	

A technológiai előírásoknak megfelelően a kísérleti csoportokban is megoldottuk az ivarok elkülönített takarmányozását, melyre naponta egyszer került sor. A takarmányadagokat a tojástermelés indulása előtt fokozatosan, heti 5 gramm/madár emeltük, míg el nem értük a maximális 135 grammot. A csúcstermelés után, a testtömegtől függően csökkentettük a takarmányadagokat heti 2-3 gramm/madár mennyiséggel. Tojásgyűjtés naponta kétszer történt, a reggeli és a délutáni órákban. A tojások heti rendszerességgel kerültek a keltetőbe, addig az általunk kialakított, klimatizált tárolóban tároltuk.



2. ábra: Kísérleti állatok elhelyezése

Azokban a kísérletekben, ahol ondóvizsgálatot végeztünk, a kakasokat mélyalmos, egyedi ketrecekben tartottuk (**3.ábra**). Ezeknél az állatoknál szintén ellenőriztük a testtömeget és ennek függvényében változtattuk a takarmányadagokat. A körülmények azonosak voltak a csoportos kísérletekével, mert egy légtérben zajlottak.



3. ábra: Kakasok egyedi ketreces elhelyezése

3.2. Kísérleti protokollok

3.2.1. *Különböző ivararányok és kakascserék hatásának vizsgálata - I. kísérlet*

A különböző ivararány, illetve a termelés folyamán 1-2 alkalommal végzett különböző arányú kakascserék hatásának elemzését a bevezetőben ismertetett tények indokolják. A kísérlet alapja tehát az a feltételezés, hogy a termékenységi problémák alapvető oka a kevés spermium, illetve a spermiumhiány a női nemi utakban. Ezekben a vizsgálatainkban különböző ivararányokban

állítottunk be csoportokat, így a kakasok létszámának hatását vizsgáltuk. A kakasok életkorának hatását különböző korban és arányban fiatal kakasok (26 hetes) betelepítésével (kakasfrissítés, spiking), a „ráunás” tényét két csoport között a kakasok kicserélésével teszteltük. A kakasmanipulációk okozta stresszhatásokat szintén vizsgáltuk és összefüggéseket kerestünk a termékenységi mutatókkal, illetve az embrióelhalásokkal. Ebben a kísérletben 7 kísérleti csoportot alakítottunk ki, melynek elrendezését a **2. táblázat** mutatja.

2. táblázat: Az I. kísérlet elrendezése

csoportok	kezelések	kiindulási ivararány a 26. élethéten	ivararány változásai				kakascere	ivararány a 49. élethéttől
			36. élethét	40. élethét	44. élethét	49. élethét	44. élethét	
1	kakasok lecserélése 100%-ban	80 ♀ + 8 ♂	-1♂	-1♂	-1♂		100%	80 ♀ + 5 ♂
2	kontroll (technológiai ajánlás)		-1♂	-1♂	-1♂			80 ♀ + 5 ♂
3	kakasok kicserélése a 6. csoporttal		-1♂	-1♂	-1♂			80 ♀ + 5 ♂
4	kakasok lecserélése 50%-ban		-1♂	-1♂	-1♂		50%	80 ♀ + 5 ♂
5	kakaslétszám növelése		+1♂	+1♂	+1♂	+1♂		80 ♀ + 12 ♂
6	kakasok kicserélése a 3. csoporttal		-1♂	-1♂	-1♂			80 ♀ + 5 ♂
7	kakaslétszám szinten tartása (nincs beavatkozás)		-	-	-			80 ♀ + 8 ♂

A termelési ciklus során, azaz a 27-59. élethét között, a termékenységet lámpázással, valamint friss tojások vizsgálatával (PSPA) ellenőriztük. Meghatároztuk a „valódi” termékenységet (VT%), vagyis az „igen” korai embrióelhalások mértékét és nyomon követtük a keltetési adatokat. Etológiai megfigyelésekkel ellenőriztük, hogy a kakasok kora hogyan befolyásolja a párzások gyakoriságát.

3.2.2. Szerves Se és E-vitamin hatásának vizsgálata a hímivarban – II. kísérlet

Ebben a kísérletben egyedi ketrecekben helyeztünk el 20 db Ross 308 kakast. A kísérleti csoportba tartozó kakasok (10 db) a takarmányban lévő szerves szelén (nátrium-szelenit) és E-vitamin mennyiségen felül 0,3 mg/kg Sel-Plex-et[®] (Alltech Ltd.) és 200 mg/kg Lutavit E 50 S (DL- α -tokoferol-acetát, BASF), a kontroll csoportba tartozó állatok a premixekben szokásos szerves szelént (0,2 mg/kg nátrium-szelenit) és 100 mg/kg E-vitamint kaptak a takarmányban. Az ondóvételre történő trenírozást követően hetente kétszer, *Burrows és Quinn (1935)* módszerét követve masszázstechnikával vettünk ondót. A spermatermelés és a spermaminőség alakulását heti egy alkalommal vizsgáltuk, az állatok 31. és 61. élethete között. Az ondó minősítéséhez a makroszkópos vizsgálaton túl mikroszkópos, egyfunkciós vizsgálatokat végeztünk. A szaporodási ciklus lezárásakor here mintákat gyűjtöttünk szövettani vizsgálatra.

3.2.3. Szerves Se és E-vitamin hatásának vizsgálata mindkét ivarban – III. kísérlet

Négy kísérleti csoportot alakítottunk ki 80 tojó/8 kakas létszámmal. Az ivararányt minden csoportban a technológiai előírásoknak megfelelően változtattuk, azaz csökkentettük a kakasok létszámát a 36., a 40. és a 44. életheteken. Tehát az 1., vagyis a kontroll csoport a technológiai előírásoknak megfelelő kakaslétszámmal termelt, szerves szelén és E-vitamin kiegészítés nélküli táppal takarmányozva. A 2. csoportban a kakasok, a 3. csoportban a tojók, míg a 4. csoportban mindkét ivar takarmányához 0,3 mg/kg szeleno-metionint tartalmazó Sel-Plex[®] (Alltech Ltd.) és 200 mg/kg Lutavit E 50 S (DL- α -tokoferol-acetát, BASF) takarmány-adalékokat kapott a takarmányba keverve, a 20. élethétől a termelés befejezéséig. A termelési paraméterek nyomon követése és az 1. kísérletben végzett vizsgálatok mellett, különböző életkorokban a petevezetők uterovaginális és infundibuláris szakaszából és a herékből szövettani mintákat gyűjtöttünk. A szerves szelén stressz-védő szerepének ellenőrzésére szteroid analízist is végeztünk bélsár és tojásszék mintákból.

3.2.4. Szintetikus GnRH előkészítés hatásának vizsgálata a hímivarban –IV. kísérlet

A hímivarban a termelési ciklus második felében jelentkező spermaminőség-romlás mérséklésére, valamint a csökkent libidó emelésére szintetikus GnRH (Ovurelin; Reanal) készítménnyel történő kezelést végeztünk a maturáció szenzitív szakaszában. 40 db ROSS 308 kakast 20 hetes korban egyedi fülkékbe helyeztünk, mesterséges megvilágításban. A GnRH kezelések időpontját nem az életkorhoz, hanem a külső ivarjelleg alakulása alapján határoztuk meg (4. ábra). A GnRH1 csoportot 23 hetes korban, a GnRH2 csoportot 25 hetes korban, míg a GnRH3 csoportot 42 hetes korban kezeltük szintetikus GnRH analóggal 5 mg/kakas/nap dózisban, *intramuscularis* applikálással, egy héten át három alkalommal, másnaponta. Az ondóvételre történő trenírozást 26 hetes korban kezdtük meg, majd az ondóminősítést 28 hetes kortól. 28 és 32 hetes kor között hetente 2x, majd hetente 1x minősítettük az ondómintákat, de az ondóvétel folyamatosan heti 2 alkalommal történt.



4. ábra: Az ivarérés különböző szakaszában levő kakasok fejfüggelékeinek állapota

3.2.5. Szintetikus GnRH előkészítés hatásának vizsgálata a termékenységre – V. kísérlet

Természetes párzás mellett is teszteltük az ivarérés különböző idejében adott szintetikus GnRH analóg hatását a termékenységre, illetve a szexuális viselkedésre. 3 kísérleti csoportot alakítottunk ki, melyekbe 80 tojó + 8 kakas tartozott. Az 1. csoport volt a kontroll, a 2. csoportban (GnRH1) 21 hetes korban kezeltük a ROSS 308 kakasokat két naponta 3 alkalommal, a 3. csoportban 23 hetes korban (GnRH2), míg a 4. csoportban 25 hetes korban (GnRH3) 5 mg szintetikus GnRH analóg/kakas/nap dózisban, *intramuscularis* applikálással. A vizsgálat során a termelési paraméterek rögzítése mellett etológiai megfigyeléseket végeztünk.

3.2.6. *Mesterséges termékenyítés kiegészítő alkalmazásának vizsgálata – VI. kísérlet*


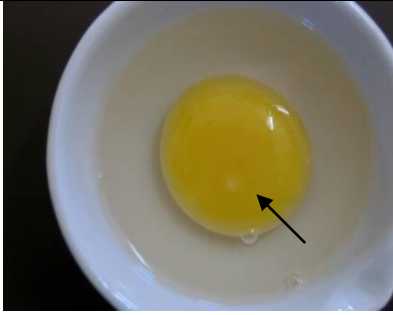


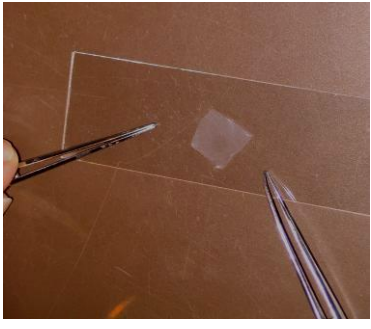
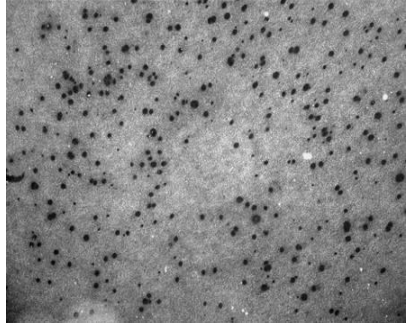
Annak a feltételezésnek az igazolására, miszerint a brojler szülőpárok terméketlenségi problémájának hátterében elsősorban a párzások csökkent száma, valamint a tojók fokozott spermiumürítése, tehát valójában egy „hiányos spermium-állapot” áll, mesterséges termékenyítés kiegészítő hatásának vizsgálatát is szükségesnek tartottuk. A termékenyítéseket attól az időponttól kezdtük, amikor az előzetes tojásvizsgálatok alapján csökken a spermiumtranszport a nőivarban. Ezzel célunk az volt, hogy a rátermékenyített csoportban a felgyorsult spermiumürülést extra spermiumadással próbáljuk kompenzálni. Ebbe a kísérletbe 60-as tojólétszámú csoportot, a tartástechnológiában javasolt kakaslétszámmal vontunk be. A csoportot teljes mértékben a technológia ajánlása (takarmányadag, fény, kakaslétszám stb.) szerint termeltettük. A kiegészítő termékenyítéseket a tojók 45. élethétben kezdtük, fiatal kakasok (28 hetes) spermájával hetente 1 alkalommal a kora délutáni órákban, mindig ugyanazon a napon. Az inszeminálási dózis a 45. és 55. hét között 200-300 millió spermium/tojó/hét volt, ezt követően 400-500 millió/tojó/hét-re emeltük az adagot. A csoport eredeti „öreg” kakasai ott maradtak az állományon, tehát valóban csak rásegítettünk a termékenyítésekkel.

Vizsgáltuk a termelési paramétereket, a termékenyítéssel járó stressz hatását, valamint a tojók petevezetőjében a spermiumpopuláció változását.

3.3. Vizsgálati módszerek

3.3.1. *A termékenység vizsgálata*

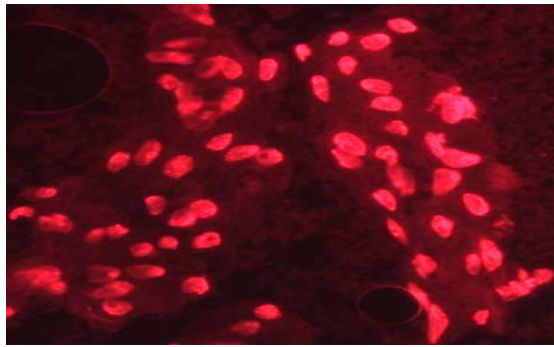
A termékenységet egy újszerű módszerrel, a *PSPA* módszerével végeztük (*Staines és mtsai., 1998*). A 26. héttől hetente, a modell szintű kísérletek csoportjaitól 20-20 db, míg az üzemi kísérletben 90-90 db értékelhető friss tojás szikmembrán vizsgálatát végeztük el. A vizsgált tojások minden hét azonos napjáról származtak. A vizsgálat első lépéseként az ép tojássárgáját nyertük ki a tojásból. A fehérjétől való elválasztás után a sárgáját fiziológias sóoldatban mostuk le. Ezt követően, a sárgáját körülvevő szikmembránból egy kb. 1x1 cm-es darabot vágunk ki a csírákorong felett. A membrándarabról szintén fiziológias sóoldatban, többszöri mosással távolítottuk el a rátapadt tojásfehérjét és -sárgáját. A megtisztított membrán darabot tárgylemezen ráncmentesen szétterítettük és fedőlemezzel lefedtük. A csírákorong területén található penetrációs nyílások sötétlátóteres mikroszkóp 4x-es objektívvel egyszerűen számolhatóak (*Steel és mtsai, 1994*). A vizsgálat menetét az **5. ábra** szemlélteti.

		
A tojássárgája kinyerése	A csírákorong megkeresése	A szikmembrán kimetszése,
		
A szikmembrán-darab	A szikmembrán-darab	Penetrációs nyílások

5. ábra: Perivitellin Sperm Penetration Assay (*Staines és mtsai, 1998*)

A termékenységet a gyakorlatban használt lámpázással is ellenőriztük a keltetésre betett tojásokon, melyet az inkubáció 7. napján végeztünk. A lámpázás során eltávolított terméketlen, illetve véres tojásokat tovább elemeztük.

Az üresnek kilámpázott tojások feltörése után a sárgáját szintén fiziológiás sóoldatban mostuk le. A csírákorongot eltávolítottuk a sárgájából és propidium-jodiddal (PI) festettük meg. A munkaoldat 5 µg PI-t tartalmazott 1 ml 0,9 %-os NaCl oldatban (*Liptói és mtsai., 2004*). Ezt követően fluoreszcens mikroszkóppal bíráltuk el a mintákat és állapítottuk meg a „valódi” termékenységet, azaz a petevezetőben történt korai embrióelhalások mértékét (**6. ábra**).



6. ábra: Osztódó embrionális sejtek lámpázással természetlenek ítélt csírákorongban
(Fotó: Dr. Liptói Krisztina)

Az inkubáció 1-6. napján történt embrióelhalások fenotípusait sztereomikroszkóppal szintén meghatároztuk. Az alábbi fenotípusos kategóriákat alkalmaztuk:

- pozitív fejlődésmenet (positive development - PD): A membránfelületek csak ekto- és endodermális szöveteket tartalmaznak. Vérszigetek nem alakultak ki.
- embrió nélküli blasztoderma (blastoderm without embryo - BWE): Ektodermális, endodermális és mezodermális szöveteket lehet megfigyelni. A vérszigetek kialakultak.
- elhalt embrió (dead embryo – D2-5): Az inkubáció 2-5 napja során különböző fejlődési stádiumban elhalt embriók.
- abnormális embrió (abnormal embryo - AE): Élő embriók, amelyek rendellenesen fejlődnek, vagy lassú növekedést mutatnak.
- nagyon korai (death in oviduct – DO), megtojás előtt, még a tojócsőben történt embrióelhalások
- Eok = normális fejlődésű, élő embrió

Ezen túl az 1. kísérletben a ki nem kelt, un. befulladt tojásokat is felnyitottuk és meghatároztuk a magzat elhalásának idejét, illetve lehetséges okát. Az elhalás idejét aszerint határoztuk meg, hogy az inkubáció első, második vagy harmadik harmadában, illetve a keléskor történt. A lehetséges okokat a következőképpen állapítottuk meg: normális fejlődésű magzat, rendellenes fejlődésű, illetve rendellenes fekvésű magzat.

3.3.2. *Ondóvizsgálat*

Az ondóminősítésekhez mikroszkópos egyfunkciós vizsgálatokat végeztünk. A spermiumok koncentrációját fotométerrel határoztuk meg, amelyhez előzőleg az optikai denzitás mértékéhez

igazított tényleges sejtszámmal egy standard görbét állítottunk fel. A standard görbe meghatározásánál minden esetben kevert ondómintákat használtunk és minden kísérletben elvégeztük a precíz eredmények érdekében, mivel minden kísérletben más és más állatok szerepeltek. A spermiumok motilitását egy 0-5 terjedő skálán szubjektív pontozással határozzuk meg, amely szakirodalomban is elfogadható értékelési rendszer, ha ugyanaz a gyakorlott személy végzi a minősítést. A számítógépes motilitás-meghatározástól eltekintettünk, mivel több szerző szerint az extrém nagy hígítások következtében fals eredményeket produkálhat a számítógépes program. A spermiumok membrán-integritásának (élő/holt sejtarány), valamint morfológiai rendellenességeinek vizsgálatához *anilinkék-eozin* festés alkalmazásával keneteket készítettünk és mikroszkóppal, olaj immerzió alatt határoztuk meg az egyes rendellenes sejtípusok, valamint az elhalt sejtek %-os arányát (**7. ábra**).



7. ábra: Anilinkék- eozinnal festett kakas spermakenet

3.3.3. A szexuáliszteroidok és a stresszhormon meghatározása

A hormonális összefüggések vizsgálatához a jelentős stresszel járó vérvétel helyett a szteroidokat non-invazív módon bélsár, illetve tojásszék mintákból határoztuk meg. Madárban a bélsár keveredik a vizelettel és együttesen alkotja az. Ismerve ezt a jelenséget, a hormonvizsgálatokhoz mindig körültekintően úgy jártunk el, hogy mintavételkor a bélsár részt a vizelettől, illetve a vakbélből származó ürüléktől leválasztva gyűjtöttük be, tudván hogy az megzavarja a hormonok kimutatását.

A szexuáliszteroidok és a kortikoszteron, mint stresszhormon meghatározását a 3. és 6. kísérletekben végeztük el. A 3. kísérletben annak céljából, hogy a felmérjük a szerves-szelén és E vitamin feltételezett stresszvédő hatékonyságát, szintén bélsár mintákat gyűjtöttünk a 24., 30., 36.,

42., 48., 54. és 60. életheteken. Ezt a vizsgálatot kiegészítettük azzal, hogy tojásszik mintákat is gyűjtöttünk, a 28., 36., 44., 48., 54. és 60. életheteken. A szik mintákat egyrészt a lámpázás során kiesett un. véres tojásokból, illetve normál embriót tartalmazó tojásokból gyűjtöttük. Feltételezésünk szerint, az embrióelhalások mögött magas kortikoszteron koncentráció is állhat, melyet *Ferencziné Szőke (2008)* tökéletesen bizonyított.

A 4. kísérletben a hormon szintek elemzésével a GnRH kezelés szteroid hormonokra történő hatását vizsgáltuk, valamint azt, hogy a spermavételhez mennyi idő alatt szoknak hozzá az állatok. Így alap bélsár mintákat az első ondóvétel előtt gyűjtöttük, majd ezt követően minden spermavétel után 4-5 órával mintákat szedtünk. Sajnálatos módon, ezt a vizsgálatot, az állatok illegális eltulajdonítása miatt, csak az 52. élethéig tudtuk végezni.

A 6. kísérletben a mesterséges termékenyítés okozta stresszhatás felmérését tűztük célul, valamint annak meghatározását, hogy mennyi idő alatt adaptálódnak az állatok ehhez a procedúrához. A bélsár mintákat a 44. élethétől hetente gyűjtöttük, a termékenyítést követő napon. Tojásszik mintákat szintén hetente gyűjtöttünk, a termékenyítést követő második napon tojt friss tojásokból. A mintagyűjtéseket követően a laboratóriumi munkákig a mintákat fagyasztva tároltuk.

Mind a bélsárból, mind a tojásszikkból kortikoszteront (B), tesztoszteront (T) és 17- β -ösztradiolt (E2) határoztunk meg Radio Immuno Assay (RIA) módszerével. Az analíziseket 500 mg súly-állandóságig beszárított bélsár mintákból és 500 mg szikmintákból végeztük. Az extrakció előkészítéseként a bélsár és szik mintákhoz 500 μ l desztillált vizet adtunk, 30 mp-ig vortexeltük, majd fél órát állni hagytuk. Ezt követően a mintákra 200 μ l 1%-os SDS (sodium-dodecyl-sulphate, Sigma) oldatot, míg a szik mintákhoz 200 μ l 1%-os Triton-X-100 (Reanal) oldatot mértünk. Ezzel a delipidációs eljárással elősegítettük a zsírszerű anyagok, így a szteroidok kioldódását, ami magát a RIA-t tette eredményesebbé (*Kelemen és mtsai., 2003*). A kezelés után 30 percet szobahőmérsékleten hagytuk a mintákat állni. A fél óra letelte után 5 ml/minta mennyiségű dietil-éterrel, illetve diklór-metánnal háromszoros extrakciót végeztünk. Minden extrakciót követően fagyasztással különítettük el a fázisokat, a felülúszókat un. Wassermann-csövekben egyesítettük. Az így nyert mintákat vízfürdő felett szárazra pároltuk és abszolút etanolban -20 °C-on tároltuk a meghatározásig. A bélsárból és tojásszikkból nyert szteroid tartalmú alkoholos extraktumokat szárazra pároltuk, majd több lépésben szintén abszolút etanollal hígítottuk, úgy hogy a végső meghatározás 2.5 mg bélsár-, illetve szikmintának megfelelő extraktumból történjen. A mintákat újból szárazra pároltuk, majd a ^3H jelölt szteroidokat és a specifikus antiszérumot tartalmazó foszfát puffer aliquotjával Vortex-mixerrel szuszpendáltuk. Egy éjszakán át +4°C-os tárolást követően a szteroid tartalmú oldatokból a Charcoal-os szeparálással különítettük el az antiszérumhoz kötött

ún. kötött (bound: B) és a szabadon maradt (free:F) radioaktivitást. Az F radioaktivitást, illetve az antiszérumhoz nem kötött szteroidokat a Dextrán-T-70-nel kezelt aktív szénszemcsék abszorbeálták és ezt hűthető centrifugálással tökéletesen el lehetett szeparálni. A felülúszó leszívásával és mérőküvetékbe történő mérésével lehetőség adódott annak B radioaktivitásának meghatározására LKB-Wallack típusú Szcintillációs Spektrométer segítségével.

A Szcintillációs Spektrométer által lemerített B radioaktivitásokból, standard görbékhez viszonyítva, a SZIE Szaporodásbiológiai Laboratóriumában szerkesztett computer program segítségével meghatároztuk a végső szexuálszteroid koncentrációkat.

A RIA során felhasznált anyagok:

1. Foszfát-puffer:

Foszfát-puffer pH 7,4-7,6

A komponens: 1,095g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 80 ml bidesztillált víz

B komponens: 15,0525g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 420ml bidesztillált víz

A+B komponens (500 ml) + 0,05 g zselatint.

2. A kötőanyagok az egyes szteroidok szerint a következők voltak:

Tesztoszteron: 20 ml puffer

100 μl ^3H -tesztoszteron hígítás: 60000X

33 μl T-antibody

17- β -ösztradiol: 20 ml puffer

100 μl ^3H -ösztradiol hígítás: 20000X

50 μl E₂-antibody

Kortikoszteron: 20 ml puffer

100 μl ^3H -kortikoszteron Hígítás: 500x

4 ml B-antibody

3. Szcintillációs koktél (toluol-Triton-X-100, PPO-POPOP primer és szekunder Szcintillátor)

4. Aktív szén (Charcoal) Dextrán T-70-nel bevonva

3.3.4. Etológiai vizsgálatok

Etológiai megfigyeléseket az 1. és az 5. kísérletben végeztünk. Az 1. kísérletben azt kívántuk feltérképezni, hogy a kakascserék milyen hatással vannak a viselkedésre csoporton belül. Milyen gyorsan alakulnak ki a háremek és mekkora agressziót okoz az új kakasok megjelenése, valamint

hogyan változik a párzási kedv az egyes csoportokban. Az etológiai megfigyelésekre vonatkozó irodalmi adatok megismerése és feldolgozása után konkrétan meghatároztuk, hogy mikor tekinthető a kopuláció tényleges párzásnak, illetve rögzítettük az udvarlások számát is, ily formán meghatározásra kerültek az udvarlás formái is, hogy világosan el tudjuk különíteni a valódi párzás magatartás-formáitól. A vizsgálatokat mindig ugyanaz a kettő személy végezte és az egyes csoportok között soha nem cseréltük fel a megfigyelést végző személyt. Természetesen bizonyos fokú szubjektívitás elkerülhetetlen az ilyen típusú vizsgálatoknál, azonban az életkor előrehaladtával bekövetkező változások között ez kizárható, mivel egy csoportban mindig ugyanaz a személy végezte a megfigyelést.

Az etológiai megfigyeléseket közvetlenül a kakasmanipulációkkal egy időben kezdtük (**3. táblázat**), a 44. élethétén az 1. csoportban (100% kakascsere), a 4. csoportban (50% kakascsere) és a 3. csoportban (6. csoport kakasait helyeztük át). A megfigyelések délután 15 órától a világítási program befejeződéséig tartottak (19 óra), majd a következő hajnalban a világítási program kezdetekor (3 óra) folytatódott és reggel 7 óráig tartott. Ezt követően ugyanilyen beosztásban vizsgálatuk a csoportokat egy héttel a beavatkozás után (45. élethét), ellenőrizvén, hogy egy hét alatt kialakult-e az új szociális rangsor, illetve az új hárem. A vizsgálatokat egy hónap elteltével újra megismételtük (52. élethét).

3. táblázat: Az etológiai megfigyelések időpontjai az 1. kísérletben

m= megfigyelés

élethét	csoportok			
	100%-os kakascsere	50%-os kakascsere öreg kakasai	50%-os kakascsere fiatal kakasai	kakasok kicserélése két csoport között
44 (kakascsere)	m	m	m	m
45	m	m	m	m
52	m	m	m	m

Az 5. kísérletben a GnRH hatását kívántuk vizsgálni a szexuális viselkedésre. Az 1. kísérlet tapasztalatai alapján a megfigyelések hosszát módosítottuk. A világítási program befejezése előtt 3 órán keresztül, illetve a hajnali órákban a világítás bekapcsolása után 3 órán keresztül végeztük a megfigyelést. A megfigyelések időpontjait a szerint határoztuk meg, hogy melyik csoport mikor kapta a szintetikus GnRH kezelést. Az egyes kísérleti csoportokkal egy időben, mindig a kontroll csoportot is megfigyeltük. A megfigyelések időpontjait a **4. táblázat** mutatja.

4. táblázat: Az etológiai megfigyelések időpontjai az 5. kísérletben

m= megfigyelés

élethét	csoportok			
	kontroll	GnRH1 (kezelés a 21. élethéten)	GnRH2 (kezelés a 23. élethéten)	GnRH3 (kezelés a 25. élethéten)
25	m	m		
27	m		m	
29	m			m
34	m	m		
36	m		m	
38	m			m
44	m	m		
46	m		m	
48	m			m
56	m	m		
58	m		m	
60	m			m

Ebben az elrendezésben azt is nyomon tudtuk követni, hogy a kontroll csoportban a kor előrehaladtával hogyan változik a párzási kedv. A megfigyeléseket természetesen szintén ugyanaz a személy végezte és rögzítette az eseményeket.

Az eredmények értékelésénél a párzások gyakoriságát 10 perces időintervallumokba rendeztük, így az 1. kísérletben 48, míg az 5. kísérletben 36 megfigyelési egységet kaptunk.

3.3.5. Szövettani vizsgálatok

Szövettani vizsgálatokat a 2. kísérletben és a 3. kísérletben végeztünk. A 2. kísérletben a szerves szelén és E-vitamin hatását vizsgálatuk a hímivarban és a spermológiai vizsgálatok mellett szövettani vizsgálattal is ellenőrizni kívántuk, hogy van-e jótékony hatása a szerves szelén és E-vitamin adagolásának a csírahám változásaira. Így a termelési ciklus végén 5-5 here mintát gyűjtöttünk szövettani vizsgálatra a kezelt és kontrol csoportok kakasaiból. A 3. kísérletben szintén a szerves szelén és E-vitamin hatását elemeztük kiscsoportos kísérletben. Azonban ennél a kísérletnél eltérő életkorokban gyűjtöttünk here, illetve petevezető mintákat, azért hogy az életkorral történő változásokat is nyomon tudjuk követni. A kontroll és a kezelt csoportokból a termelés során 5 alkalommal (24. élethét: a termelés kezdete előtt; 34. és 44. élethét: csúcstermelés; 54. élethét: a termelés leszálló ága; 60. élethét: termelés befejezése), 5-5 mintát gyűjtöttünk. A

mintavétel során az állatokat elvéreztettük és a tojókból a hasüreg felnyitása után a petevezető uterovaginális (UVJ = *uterovaginal junction*) és infundibuláris szakaszából 1-1 cm-es darabot kimetszettünk. A hímvivarban pedig a heréből metszettünk ki egy 1 cm² darabot. A metszetek elkészítéséig Bouin oldatban tároltuk a mintákat. A szövettani metszeteket és vizsgálatokat a SZIE ÁOTK Anatómiai- és Szövettani Tanszékén végezték. A szövettani metszeteket a szakma szabályai szerint készítették el, hematoxilin-eozin festék felhasználásával. A fénymikroszkópos szövettani értékelésnél a csoportokat átlagban értékelték, minden csoportról 5-12 fénymikroszkópos felvétel készült különböző nagyításokkal (40x-800x), különös tekintettel arra, hogy a nyálkahártya jellegzetességei mind kis, mind nagy nagyításnál megfigyelhetőek legyenek (hámréteg, propria, propria képletei, mirigyek, Sertoli-sejtek, spermatogóniumok).

3.3.6. Statisztikai analízis

Az eredmények értékeléséhez a termelési ciklust 3 részre bontottuk a következők szerint:

- 1. harmad: 27-37. élethét
- 2. harmad: 38-48. élethét
- 3. harmad 49-59. élethét

Az adatok statisztikai elemzését a *Statistica 7.0 program* segítségével végeztük el. A spermiumok által, a belső szikmembránon hidrolizált nyílások nem mutatnak normál eloszlást, ezért az ábrázolásnál az értékek mediánjait kell használni, mely korábbi vizsgálatok alapján szorosan korrelál a termékenységgel (*Wishart, 1997; Hazary és mtsai., 2000*). A csoportok medián értékeinek összehasonlítására *Mann-Whitney U-test-et* végeztünk, valamint a görbe alatti terület értékeket is meghatároztuk. A csoportokon belüli változások analizálásához *Wilcoxon próbát* végeztünk. A százaléokban kifejezett és ábrázolt adatok esetén *arcsin transzformációt* követően (*Harnos és Reiczigel, 2006*) ANOVA-t, illetve *egymintás t- próbát* használtunk. Az etológiai megfigyelések értékelését ANCOVA-val végeztük. A bélsár- és szik mintákból kimutatott hormon koncentrációk összehasonlítását *Repeated Measure ANOVA* használatával végeztük.

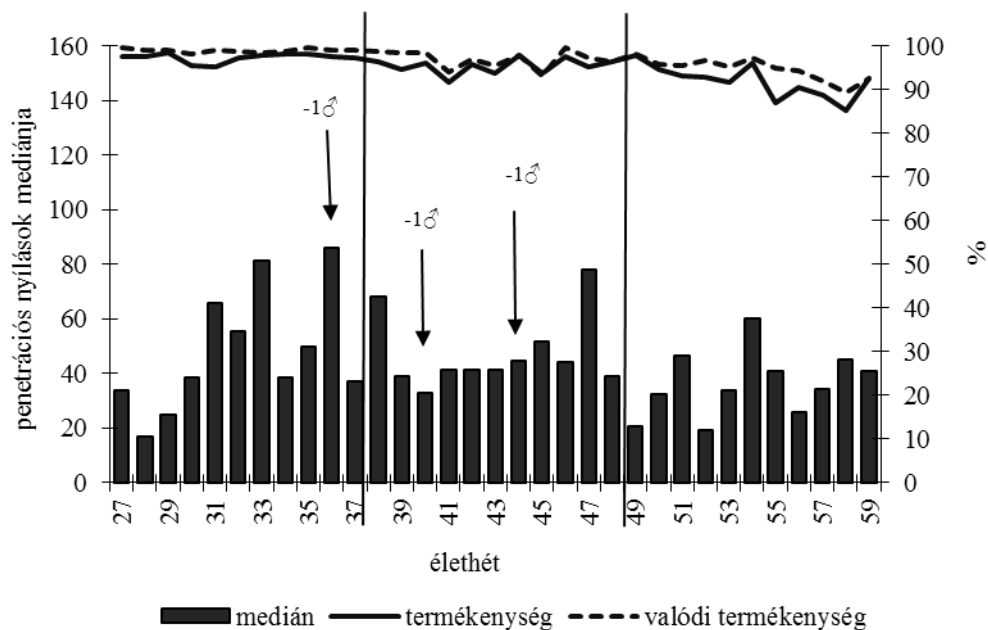
4. EREDMÉNYEK

4.1. I. Kísérlet eredményei - Különböző ivararányok és kakascserék hatásának vizsgálata

4.1.1. A penetrációs nyílások, a lámpázási és a „valódi” termékenység vizsgálatának eredményei

Ebben a kísérletben vizsgálatunk arra irányult, hogy az 50. élethét után jelentkező termékenység csökkenését, hogyan lehetne kiküszöbölni az ivararány, illetve „spiking” azaz kakascserés technikák alkalmazásával. A vizsgált időszakot három részre bontottuk (1. harmad: 27-37. élethét; 2. harmad: 38-48. élethét; 3. harmad: 49-59. élethét), hogy az egyes csoportokon belüli változásokat is nyomon tudjuk követni.

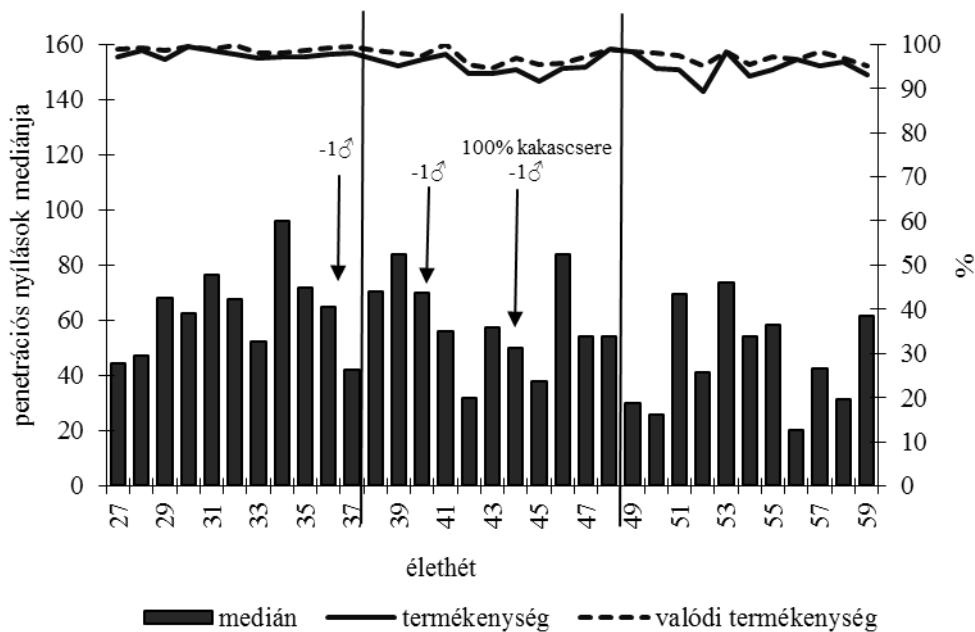
A 2. csoport (technológiai kontroll) eredményeit a **8. ábra** mutatja, ahol látható, hogy az 1. harmadban folyamatosan növekszik a penetrációk száma és a 31 és 38. hetek között találtuk a legtöbb penetrációs nyílást a tojásmintákon, a median maximum értéke 86 volt. A 2. harmadban nem csökkent jelentősen a spermiumok mennyisége, azonban a 3. harmadban a csökkenés szignifikáns ($p \leq 0,05$) volt.



8. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a 2. csoportban (technológiai kontroll)

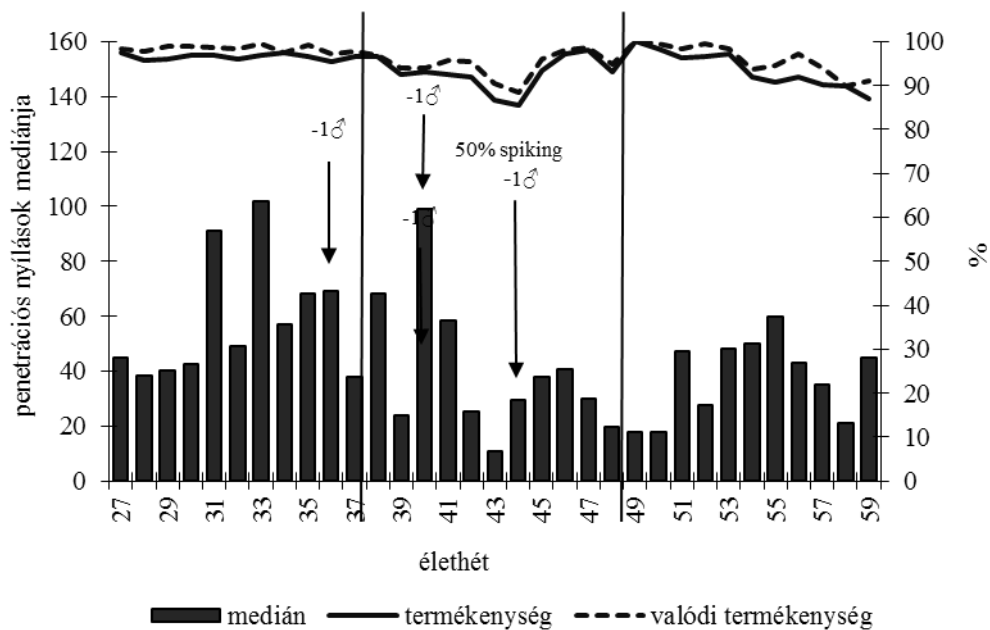
A termelési ciklus végére mind a lámpázási termékenység, mind a „valódi” termékenység szignifikánsan ($p \leq 0,05$) csökkent. A két termékenység közötti különbség is szignifikánsnak ($p \leq 0,05$) mutatkozott a termelés leszálló ágában, ami arra utal, hogy a termelés vége felé a korai embrióelhalások mértéke növekedett.

Az 1. csoportban, ahol 100%-ban lecseréltük az „öreg” kakasokat fiatalra (**9. ábra**), a 30. és a 40. hét között figyelhető meg tartósan magas spermiumtranszport. Ám ez a magas transzport jelentős mértékben ($p \leq 0,05$) csökkent a termelés végére, annak ellenére, hogy a 44. élethéten minden kakast fiatalra cseréltünk. Az IPVL hole-ok mediánja a 36. élethéten volt a legmagasabb, 96-os értékkel. Mindkét termékenység a ciklus egésze alatt 90% körül alakult, a 2. harmadban csökkent ($p \leq 0,05$), ezt követően a 3. harmadban már nem csökkent jelentősen. A lámpázási eredményekből számolt, illetve a „valódi” termékenység közötti különbség ebben a csoportban is kis mértékben megnövekedett a termelés 3. harmadában.



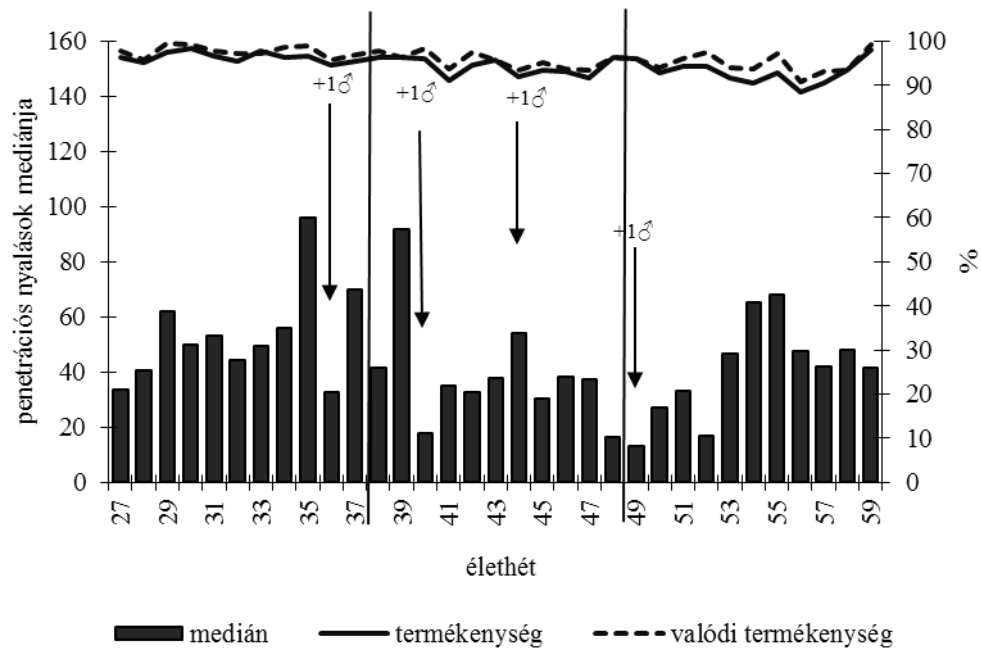
9. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása az 1. csoportban (100% kakascserere)

A 4. csoportban, ahol a kakasok felét cseréltük le a 44. élethéten, (**10. ábra**) a 31. és a 40. élethét között volt a legmagasabb az IPVL hole-ok száma, 102 max. median értékkel. Az 1. harmadhoz képest a 2. harmadban szignifikánsan ($p \leq 0,01$) alacsonyabb volt a spermiumtranszport. A 3. harmadban, a kakascserét követő 6. héttől növekvő tendencia mutatkozott a spermiumok transzportjában, így a 3. harmadban szignifikánsan ($p \leq 0,05$) növekedett a spermiumok száma. A termékenységek a 2. harmadban szintén csökkentek ($p \leq 0,05$). Bár a kakascserét követően kissé növekedett mindkét termékenység, de ez csak rövid távú volt a 46. és az 52. hét között és összességében a 3. harmadban nem jelentett szignifikáns növekedést.



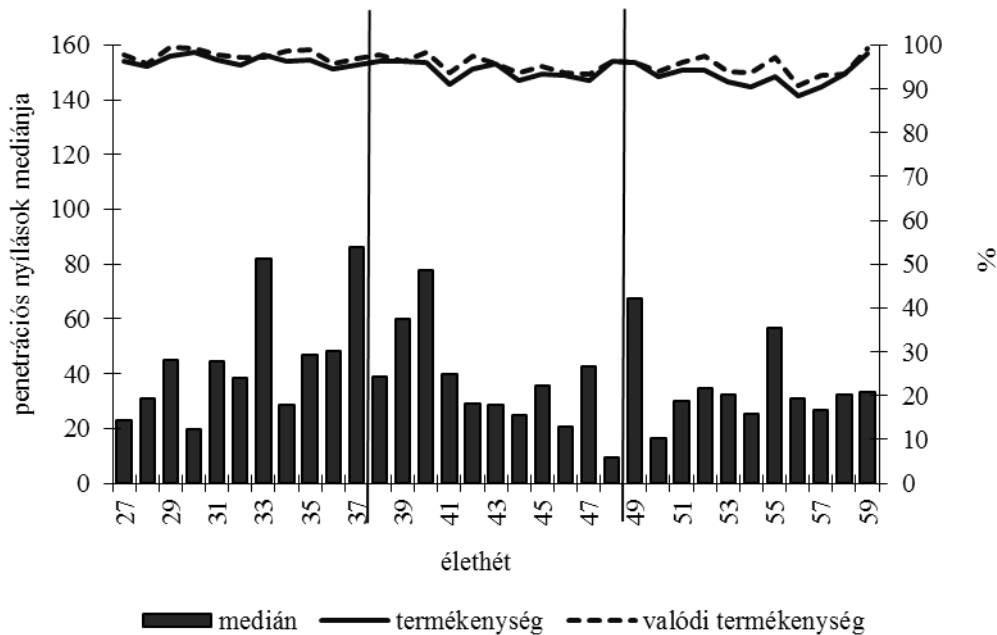
10. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a 4. csoportban (50% kakascseré)

Az 5. csoportban, ahol növeltük a kakasok számát (**11. ábra**), a spermiumtranszport a 33. és 39 élethét között volt a legintenzívebb, 96-os maximális median értékkel. Az 1. és a 2. harmad között csökkent ($p \leq 0,01$) a spermiumtranszport, viszont a 3. harmadban növekedett ($p \leq 0,05$) az IPVL hole-ok száma. A „lámpázási” termékenység és a „valódi” termékenység a 2. harmadban az IPVL hole-ok számával párhuzamosan csökken ($p \leq 0,05$), azonban a 3. harmadban nem változott, annak ellenére, hogy növeltük a kakasok számát.



11. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása az 5. csoportban (kakaslétszám növelése)

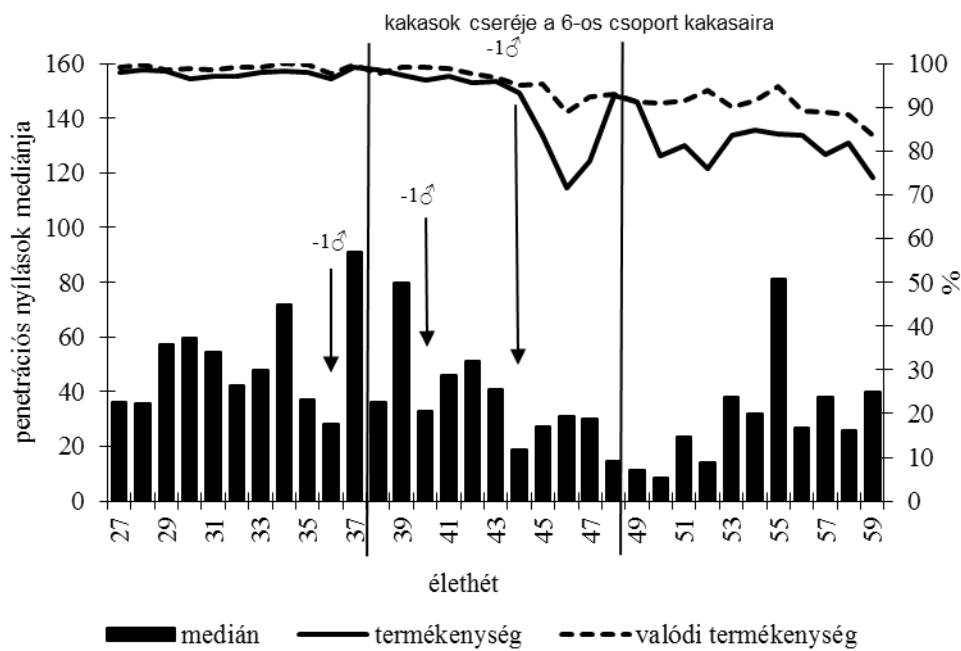
A 7. csoportban, ahol nem változtattunk sem a kakasok számán, sem az életkorukon (**12. ábra**), 86-os maximális medián értékkel a legtöbb spermiumot a 33. és 40. hetek között találtunk a tojásokon és mindkét termékenység ebben az időszakban volt a legmagasabb. A penetrációs nyílások száma szignifikánsan ($p \leq 0,01$) csökkent az 1. és 2. harmadok között, azonban a 3. harmadban nem figyeltünk meg további lényeges csökkenést. A termékenységek értékeinek alakulása összhangban volt a penetrációs nyílások alakulásával.



12. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a 7. csoportban (kakasok létszámának szintentartása)

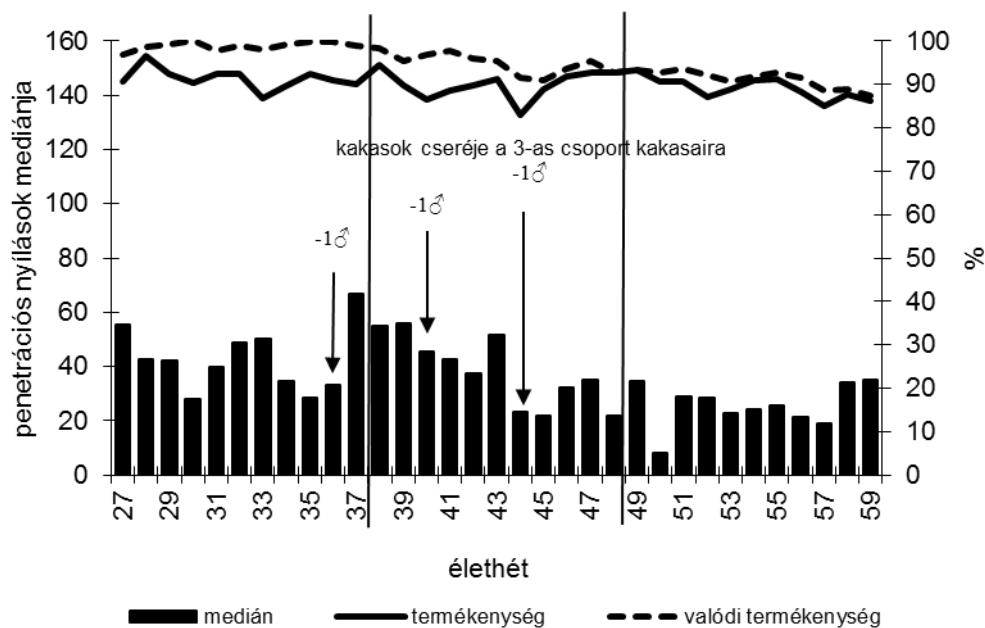
A 3. és a 6. csoport kakasait a 44. héten kicseréltük egymással, hogy teszteljük azt az elméletet, miszerint az egyhangú környezetben a kakasok egy idő után ráunnak a tojókra (**13. és 14. ábra**). A 3. csoportban a legtöbb spermiumot a 37. élethéten találtuk, 96-os medián értékkel. Ezt követően mind a 2., mind a 3. harmadban csökkent a spermiumok mennyisége, bár a csoportok közötti kakascserét követően enyhe növekedést figyelhettünk meg, ami folytatódott a 3. harmadban is, de ez nem eredményezett szignifikáns javulást sem spermiumtranszportban, sem a termékenységek alakulásában. Sőt, miután a 6. csoport kakasai átkerültek a 3. csoport tojóira, ott egy meredek termékenységszökkenést tapasztaltunk lámpázáskor, míg a „valódi” termékenység magas szinten maradt. Látható, hogy a 6. csoportban a ciklus első felében az átlagos spermiumtranszport mellett is alacsony volt a lámpázási, míg magas a „valódi” termékenység, aminek az oka a PD fejlődési rendellenesség magas aránya volt. A kakasok kicserélése nem okozott

emelkedést a spermiumtranszportban, de a lámpázási termékenység csökkenése nem volt jelentős, bár szignifikánsan csökkent a ciklus 1. feléhez képest. Ez arra utal, hogy most ott nőtt meg a PD rendellenesség aránya a tojásokban, tehát feltételezhetően a 6. csoport kakasai hordozták a rendellenességet. Annak ellenére, hogy a ciklus utolsó harmadában nőtt a párzások száma, a lámpázási termékenység tovább csökkent. Megállapíthatjuk, hogy a csoportok közötti kakascseré szignifikánsan nem növelte a párzásokat és így nem tudott javítani a ciklus 2. felében jellemző lámpázási termékenység csökkenésén.



13. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a 3. csoportban (kakások cseréje a 6-os csoport kakasaira)

A 6. csoportban (**14. ábra**) is a ciklus első felében figyelhető meg a legintenzívebb spermiumtranszport, max. 67 hetes mediánnal a 37. élethéten. Érdekesnek tűnik az az eredmény, hogy a viszonylag magas spermiumszám mellett is alacsony volt a lámpázási, míg magas a „valódi” termékenység, aminek az oka a korai embrióelhalások magas aránya lehet. A kakasok kicserélése nem okozott emelkedést a spermiumtranszportban, de a lámpázási termékenység csökkenése nem volt jelentős a termelés előrehaladtával. A 3. csoport kakasainak áthelyezése után, jóllehet a termékenység kis mértékben növekedett csak, a két termékenység közötti különbség csökkent, tehát feltételezhető, hogy a korai embrióelhalások mértéke is csökkent, illetve a terméketlen tojások aránya növekedett.



14. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a 6. csoportban (kakasok cseréje a 3-as csoport kakasaira)

AZ IPVL hole-ok mediánjainak görbe alatti területei is jól szemléltetik a termelés egyes harmadaiban a spermiumtranszport változásait (**5. táblázat**). A termelés 1. és 2. harmada között minden csoportban csökkentek a görbe alatti területek értékei. A 2. és 3. harmad között az 1. csoportban 21,35%-kal, a 2. csoportban 21,1%-kal, a 3. csoportban 13,9%-kal, a 6. csoportban 35,7%-kal és a 7. csoportban 12,3 %-kal csökkent azon spermiumok száma, melyek elérték a petesejtet. Ezzel ellentétben a 4. csoportban 7,6%-kal, míg az 5. csoportban 13,9%-kal, növekedett a görbe alatti terület értéke.

5. táblázat: Görbe alatti területértékek csoportonként a termelési ciklus egyes harmadaiban

	1. harmad	2. harmad	3. harmad
1. csoport	650,25	587,75	462,25
2. csoport	496,25	468	369,25
3. csoport	498	383,75	313,75
4. csoport	619	399,75	430
5. csoport	559,75	405	461,25
6. csoport	408,75	384,5	247,25
7. csoport	439	383,25	336

A kísérleti csoportok IPVL hole mediánjait a kontroll csoportéhoz hasonlítva elmondható (**6. táblázat**), hogy a termelés kezdetén az 1. csoportban szignifikánsan ($p \leq 0,05$) magasabb volt a spermiumtranszport. A csúcstermelés időszakában (2. harmad) ez a különbség kiegyenlítődt, valamint a 3., 4. és 7. csoportokban alacsonyabb medián értékeket találtunk, a kontroll csoporthoz képest. A termelés utolsó harmadában azonban a kontroll (2. csoport) csoportban csak a 3. és 6. csoportokhoz képest volt szignifikánsan intenzívebb a spermiumtranszport. A lámpázási adatokból számított termékenység a termelés kezdetén a 6. csoportban alacsonyabb ($p \leq 0,05$) volt a kontroll viszonyítva. A számunkra legérdekesebb periódusban, a 3. harmadban a termékenységben nem volt különbség a csoportok között, kivéve a 3. csoportot, ahol szignifikánsan alacsonyabb ($p \leq 0,05$) volt. A „valódi” termékenységgel kapcsolatban is hasonló tendencia mutatkozott, azonban a 3. harmadban a 3. és a 6. csoportok mutattak szignifikánsan ($p \leq 0,05$) alacsonyabb értékeket.

6. táblázat: A penetrációs nyílások mediánértékei a termelési ciklus egyes harmadaiban

	1. harmad	2. harmad	3. harmad
1. csoport (100% kakascseré)	58 a,c	57 a	42,5 b
2. csoport (technológiai kontroll)	45 a,d	42 a,f	37 b,i
3. csoport (6. csoport kakasaira cserélve)	48 a	34,5 b,g	25 c,j
4. csoport (50% kakascseré)	57 a,c	32 b,g	41,5 c
5. csoport (kakas létszám növelése)	50 a	36,5 b	42 c
6. csoport (3. csoport kakasaira cserélve)	39a	37 a	23,5 b,j

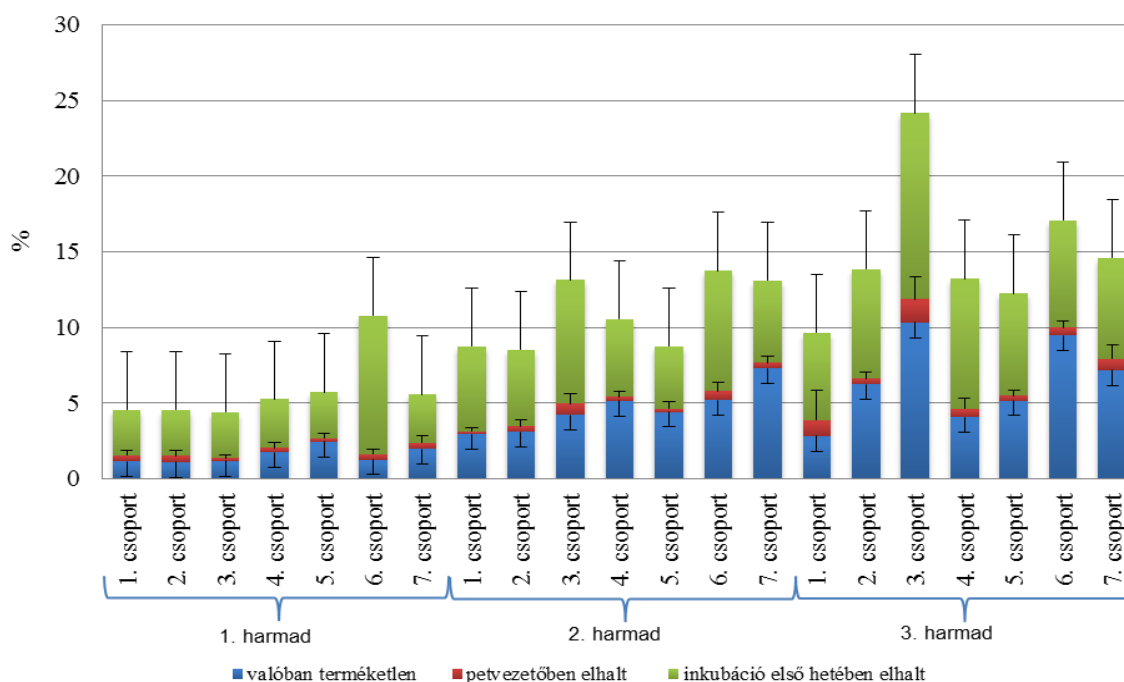
A szignifikáns eltéréseket mutató első betűk a csoporton belüli változásokat, míg a második betűk a technológiai kontroll (2. csoport) csoporthoz viszonyított különbségeket szemléltetik. ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$)

4.1.2. A korai embrionális elhalások vizsgálatának eredményei

A lámpázás során kiesett tojások további vizsgálata során az értékeléshez három kategóriába soroltuk a mintákat. A „valóban” terméketlen kategóriába tartoztak azok a tojások, melyekben a propídium-jodidos festéssel sem tudtuk kimutatni embrionális sejtsztódást. A következő kategóriába a PI festéssel kimutatott embriók tartoztak azok, melyek már a petevezetőben elhaltak. Az inkubáció első hetében történő embrióelhalások fenotípusait is meghatároztuk, azonban az egyes fenotípusok csekély számban fordultak elő és a csoportok között sem mutatkozott lényeges különbség, ezért jobbnak láttuk az értékelés során ezeket a fenotípusokat összevonni és egyben értékelni, mint a keltetés első hetében történt elhalásokat.

Az ismertetett három kategória megoszlását, a keltetőgépbe rakott tojások százalékában kifejezve a **15. ábra** mutatja. A „valóban” terméketlen tojások aránya, illetve mennyiségének változása a termelési periódus során, megegyezik az előzőekben bemutatott „valódi” termékenység változásával, hiszen azt ezekből az adatokból fejeztük ki. A petevezetőben elhalt embriók aránya a termelési harmadokban egyformának mutatkozott minden csoportban, kivétel a 3. csoportban, ahol a második harmadban megnövekedett ($p \leq 0,05$) és az 1. csoportban, ahol pedig a 3. harmadban mutatott magasabb értéket ($p \leq 0,05$). Az inkubáció első hetében elhalt embriók aránya az 5. és 6. csoportokat kivéve minden csoportban növekedett az 1. és 2. harmadok között, majd ezt követően a 3. harmadban már egyik csoportban sem változott lényegesen.

A termelés első harmadában minden csoportban az inkubáció első hetében történt embrióelhalások aránya volt a legmagasabb (3,05% - 9,16%). A legmagasabb 9,16%-os érték a 6. csoportban volt, amely szignifikánsan ($p \leq 0,05$) magasabb volt a kontroll csoporthoz (2. csoport) képest. A „valóban” terméketlen tojások és a petevezetőben elhalt embriók előfordulása között nem volt különbség, kivéve az 5. csoportot, ahol az embriót egyáltalán nem tartalmazó tojások magasabb arányban (2,45%) fordultak elő, ami a kontroll csoporthoz (1,1%) képest is magasabb ($p \leq 0,05$) volt. A 2. harmadban megnövekedett a „valóban” terméketlen tojások aránya (1,1% - 2,45% értékekről 2,92% - 7,27%-ra). Ennek ellenére a 4. 5. és 7. csoportokat kivéve, a többi csoportban még mindig az inkubáció első hetében elhalt embriók fordultak elő legnagyobb arányban. Az említett három csoportban nem volt szignifikáns különbség a „valóban” terméketlen tojások és a keltetés első hetében elhalt embriók előfordulása között. Az egyes csoportok kategóriánkénti eredményeit a kontroll csoporthoz viszonyítva elmondhatjuk, hogy a petevezetőben elhalt embriók arányai nem különböztek egymástól, míg a 3. és 6. csoportokban (8,6%; 7,95%) szignifikánsan ($p \leq 0,05$) magasabb volt az első héten elhalt embriók aránya a kontroll csoporthoz (5,07%) képest.



15. ábra: A „valóban” terméketlen tojások, a petevezetőben elhalt embriók és a keltetés első hetében elhalt embriók megoszlása csoportonként az egyes harmadokban ($\bar{x} \pm SD$)

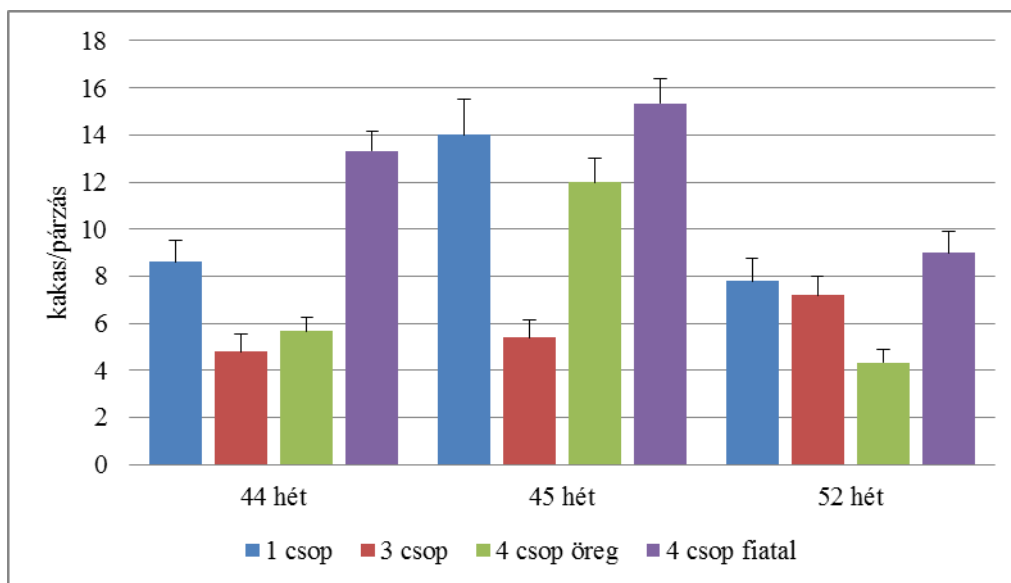
A számunkra legfontosabb termelési periódusban, azaz a 3. harmadban az 1., és a 4. csoportokban legnagyobb arányban az első héten elhalt embriókat tartalmazó tojások fordultak elő, míg a 6 csoportban a „valóban” terméketlen tojások voltak többségben, a 2., 3. 5. és 7.

csoporthoz viszonyítva az 1. és a 3. csoportokban szignifikánsan ($p \leq 0,05$) több embrió halt el a petevezetőben és a 3. csoportban az első héten elhalt embriók is nagyobb mennyiségben fordultak elő.

4.1.3. Etológiai megfigyelések eredményei

Az etológiai megfigyelések során az egy kakasra jutó párzások számát vizsgáltuk. A kakasok cseréje és az ivararányok csak csekély mértékben fokozták az állatok harci kedvét, így az agresszió, mint negatív hatás – a várakozással ellentétben – nem jelentkezett, ezért nem is ábrázoltuk. Sőt megfigyeléseink szerint a kakasok sokkal inkább versengtek a táplálék megszerzéséért, mint a tojókért és a háremek kialakításáért.

A 44. élethéten, közvetlenül a kakascseréket követően a legtöbb párzást a 4. csoportba bekerült fiatal kakasok produkálták (13,3 párzás/kakas), amit feltehetően a csoportban maradt öreg kakasokkal történt rivalizálás indukált (**16. ábra**).



16. ábra: Az egy kakasra jutó párzások száma csoportonként és megfigyelési hetenként

A második legtöbb párzást a 100%-ban fiatal kakasra cserélt csoportban figyeltünk meg (8,6 párzás/kakas). A 3. csoportba átkerült öreg kakasok és a 4. csoportban maradt kakasok közel azonos intenzitással párzódtak (4,8 és 5,6 párzás/kakas). A párzások tekintetében egy hét elteltével is a vegyes korosztályú kakascsoportból (4. csoport) a fiatal kakasok voltak a legaktívabbak (15,3

párazs/kakas), azonban az öreg kakasok is intenzívebben pároztak (12 párazs/kakas). Az 1. csoport 100%-ban fiatal kakasainak is nőtt az előző héthez képest a szexuális kedve (14 párazs/kakas).

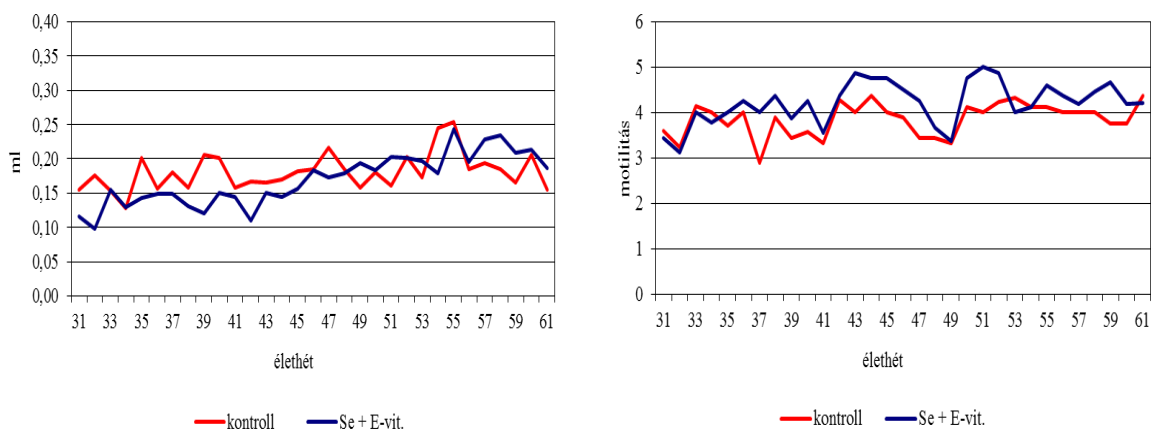
Egy hónap elteltével a párazások gyakorisága csökkent, kivéve a 3. csoportban, ahol még kis mértékben növekedett is. Az 52. héten a legalacsonyabb számú párazást a 4. csoport öreg kakasainál rögzítettünk (4.3 párazs/kakas), ami abból adódhat, hogy az un. öreg kakasok kifáradtak a tyúkokért és a táplálékért folyó küzdelemben. A legnagyobb aktivitást azonban ennek a csoportnak a fiatal kakasai mutatták (9 párazs/kakas).

4.2. II. Kísérlet eredményei - Szerves Se és E-vitamin hatásának vizsgálata a hímivarban

4.2.1. Ondóvizsgálatok eredményei

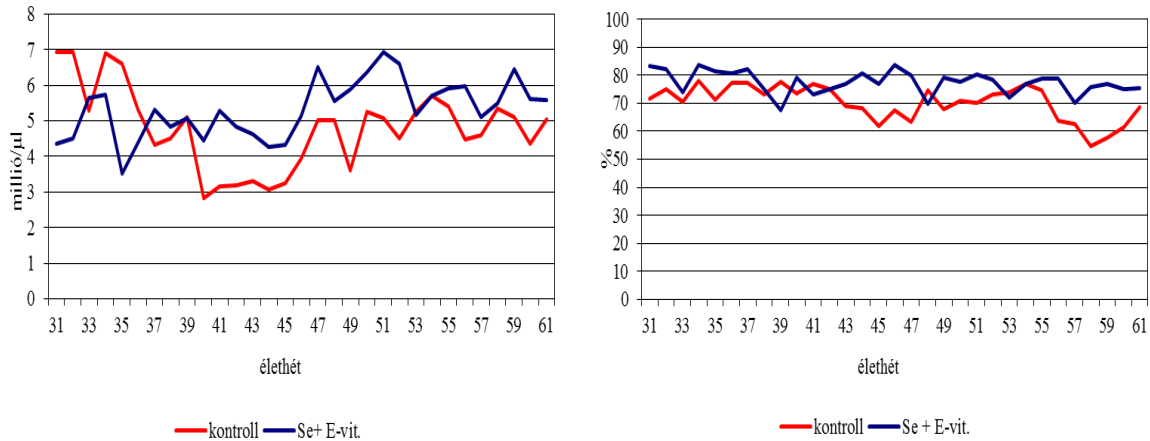
A 17.-20. ábrák szemléltetik a 2. kísérlet eredményeit, amelyben a 0.3 mg/kg Sel-Plex (Alltech Ltd.) és 200 mg/kg Lutavit E 50 S (BASF) hatását vizsgáltuk a hímivarban. Az értékelés során, úgy mint az előzőekben itt is három részre osztottuk a vizsgált periódust, azért hogy megállapíthassuk azt is, hogy csökken-e a sperma minősége oly mértékben a termelési ciklus előrehaladtával, mely indokolná a termékenység visszaesését.

Az alábbi grafikonokból látszik, hogy a *kontroll csoport* kakasainál a sperma mennyisége és a motilitása nem változott a ciklus során, míg a koncentráció a 2. harmadban csökkent, majd ezt követően újra növekedett ($p \leq 0,05$).



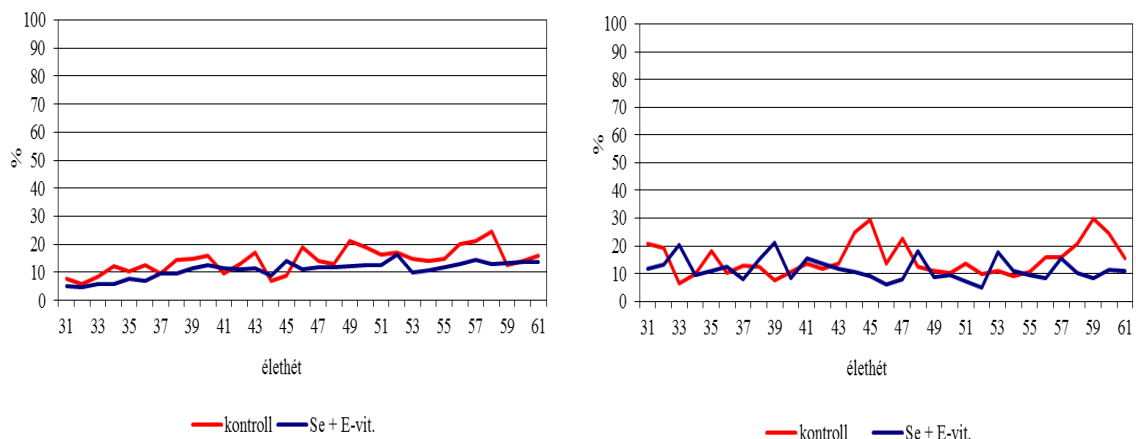
17. ábra: Az ondómennyiség és a spermiumok motilitásának alakulása a kontroll és a kezelt csoportban

A morfológiai vizsgálatok szerint az élő, ép morfológiájú sejtek aránya szignifikánsan csökkent ($p \leq 0,01$), míg a rendellenes spermiumok száma növekedett ($p \leq 0,05$) a 2. harmadban, majd ezt követően a két paraméter lényegesen nem változott.



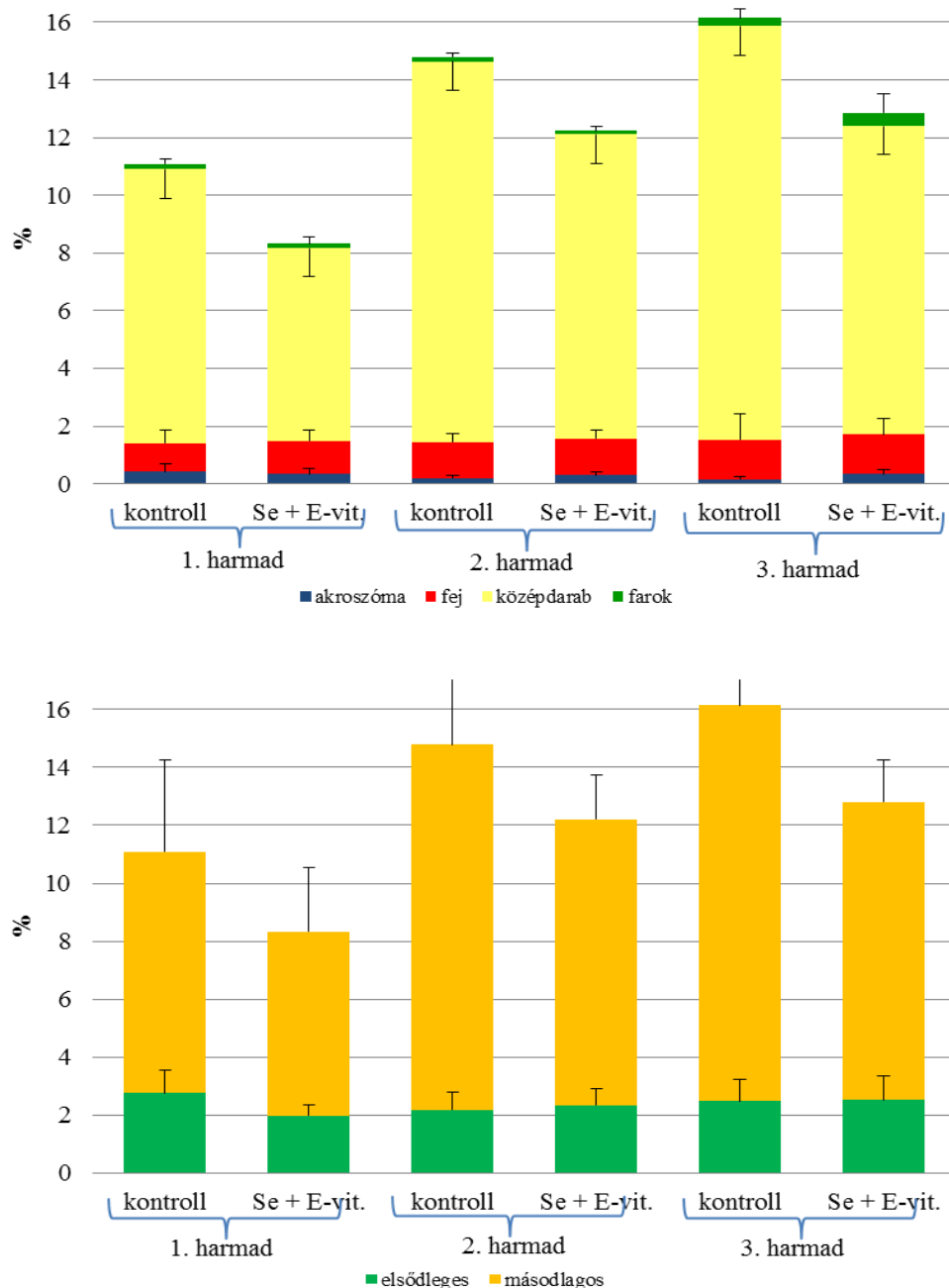
18. ábra: A spermiumok koncentrációjának és az élő, ép spermiumok arányának alakulása a kontroll és a kezelt csoportban

A *kezelt csoportban* az ondó mennyisége növekvő tendenciát ($p \leq 0,05$) mutatott az egyes harmadok között, valamint a sejtek motilitása is növekedett ($p \leq 0,05$) a 2. harmadban. Az élő, ép morfológiájú spermiumok, és az elhalt sejtek aránya nem változott a vizsgált időszakban, a rendellenes spermiumok mennyisége azonban ebben a csoportban is növekedett a 2. harmadban.



19. ábra: Az élő, rendellenes morfológiájú spermiumok és az elhalt spermiumok arányának alakulása a kontroll és a kezelt csoportban

A rendellenes spermiumokat részletesebben vizsgálva elmondható, hogy a 2. harmadban az akroszóma rendellenességek aránya csökkent, azonban a középdarab rendellenességek aránya pedig növekedett ($p \leq 0,05$). A rendellenességeket elsődleges és másodlagos rendellenességekre bontva elmondható, hogy a másodlagos rendellenességek aránya növekedett ($p \leq 0,05$) a 2. harmadban. Az egyes morfológiai rendellenességek közül a *kezelt* csoportban is a középdarab rendellenességek növekedtek, valamint a farki rendellenességek aránya növekedett ($p \leq 0,05$) a 3. harmadban.



20. ábra: A spermium-morfológiai rendellenességek megoszlása a kontroll és a kezelt csoportban

($\bar{x} \pm SD$)

Az egyes morfológiai rendellenességek tekintetében a szerves Se és E-vitamin hatására csökkentek a középdarab rendellenességek és ebből adódóan a másodlagos rendellenességek aránya. Valamint érdekes eredménynek mutatkozik az is, hogy a sikertelen spermavételek aránya kétszer annyi a kontroll csoportban (11,9%), mint a kísérleti csoportban (5,5%).

A grafikonokból jól látszik, hogy a vizsgálat kezdetén a kontroll csoport szignifikánsan ($p \leq 0,05$) több ondót termelt, majd ezt követően ez a különbség kiegyenlítődt. A spermiumok motilitása és száma az egységnyi ondóban, a 2. harmadtól szignifikánsan ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$) jobb volt a kísérleti csoportban. Az élő, ép morfológiájú sejtek aránya végig alacsonyabb ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$), ezzel egy időben az elhalt sejtek aránya magasabb ($p \leq 0,05$) volt a kontroll csoportban. A rendellenes morfológiájú sejtek aránya az 1. és 3. harmadokban volt magasabb ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$) a kontroll csoportban.

Összességében megállapítható, hogy a kontroll csoportban nem tapasztaltuk az ondó minőségének oly mértékű romlását, mely indokolná a termékenység nagymértékű csökkenését a termelési ciklus előrehaladtával. Azonban a szerves szelén- és E vitamin-kiegészítéssel mégis javítani tudtunk a spermaparamétereken, hiszen szignifikánsan javította a spermiumok motilitását ($p \leq 0,01$), a sejt-koncentrációt ($p \leq 0,05$), valamint az élő, ép spermiumok arányát ($p \leq 0,01$). Ezzel párhuzamosan alacsonyabb arányban voltak rendellenes és elhalt sejtek a mintákban a kontroll kakasok adataihoz képest. Az sem elhanyagolható eredmény, hogy a szerves Se és E-vitamin kiegészítés hatására csökkent a másodlagos rendellenességek aránya a mintákban, amely azt mutatja, hogy javult a spermiumok ellenálló képessége a környezeti hatásokkal szemben.

4.2.2. A kakashere szövettani vizsgálatának eredménye

Általánosságban elmondható, hogy a kezelésektől függetlenül a herék interstitiuma gyengén fejlett, csekély peritubuláris kötőszövet jelenléte jellemző, amely normálisnak tekinthető (**2. számú melléklet**). A herecsatornák alakjában (átmetszetükben), rendezettségében kóros elváltozás nem tapasztalható. Különbség az egyes csoportok között a csírahám szerkezetében, vastagságában, ill. a csatornák lumenjének méretében, spermiumteltségben voltak.

A kontroll csoport mintáiban jól megtartott, magas csírahám, a herecsatornácskák ürege tágas, a lumen határa éles, üregében jellemzően érett spermiumok igen alacsony számban figyelhetők meg. A spermiumok lazán helyezkednek el, a csatornák gyakran üresnek tűnnek. A spermogén sejtek a Sertolli sejtek között lazán rendeződnek. A meiotikus sejtmagalakok a

csírahám alapjára rendeződnek. Lényeges eltérés az egyes hereminták között nem tapasztalható a csoporton belül.

A kezelt csoportban (szerves Se és E-vitamin kiegészítés), jól megtartott, magas csírahám, a herecsatornácskák ürege tágas, a lumen határa éles, üregében érett spermiumok alacsony számban figyelhetők meg, de egyértelmű a spermiumszám növekedés a kontrollhoz képest. A spermiumok lazán helyezkednek el, a csatornák ürege gyakran üresnek tűnik, csak nagy nagyításon láthatóak szórványosan spermiumok. A spermiogén sejtek a Sertolli sejtek között lazán rendeződnek, de gyakran megfigyelhető a lumenhez közel, a Sertolli sejtek apikális részén 10-15-ös csoportokban a még nem teljesen érett spermiumok ami a spermiogenezis megnövekedett aktivitását tükrözi. Lényeges eltérés az egyes hereminták között nem tapasztalható a csoporton belül (**7 + 8 táblázatok**).

7. táblázat: A szövettani vizsgálat eredményének összefoglalása

Jelmagyarázat: ritka, kevés, nem jellemző: +
nagyon sok, gyakori, jellemzően: +++++

	Csírahám vastagsága	Lumen tágassága	Osztódó sejtalakok a csírahámban	Spermiogén sejtek a lumenben	Spermiumok mennyisége a lumenben
Kontroll	+++	+++++	++	+++	++
Se + E-vitamin kezelt	+++++	+++	+++++	+++	+++++

8. táblázat: A herecsatornák és spermiumok átlagos mennyisége

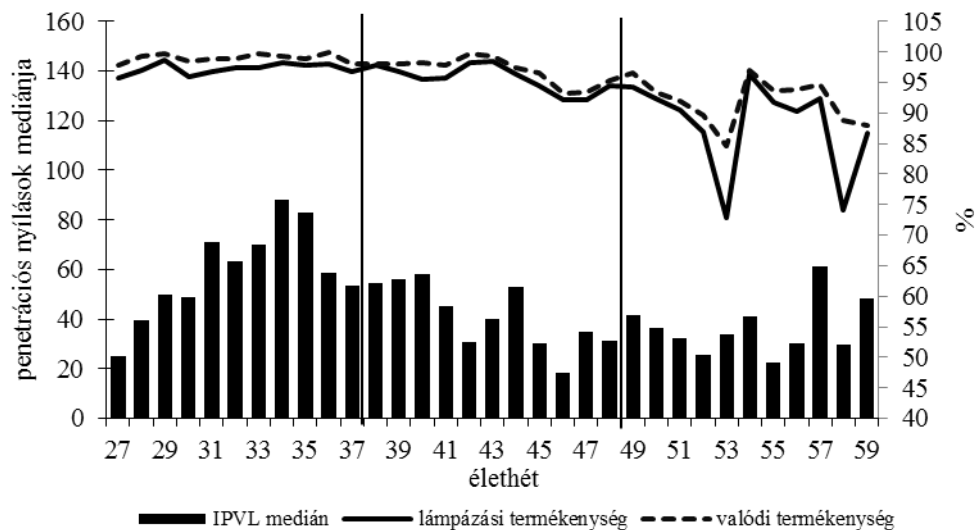
Csoport	Csatorna átmetszet 100x nagyításnál/látómező (átlag)	Jellemző spermiumszám/csatornaprofil átlag
Kontroll	19	31
Kezelt	17,4	88,8

4.3. III. Kísérlet eredményei - Szerves Se és E-vitamin hatásának vizsgálata mindkét ivarban

4.3.1. A penetrációs nyílások, a termékenység és a „valódi” termékenység vizsgálatának eredményei

A harmadik kísérlet során ellenőrizni kívántuk, hogy a szelén képes-e befolyásolni *állomány szinten* a termékenységet. Mivel az előző munkaszakasz eredményei szerint a szerves kötésű szelén és E-vitamin a spermológiai paraméterek javítását igazolta hímivarban a termelés leszálló ágában, ami a kritikus pontja a termelés gazdaságosságának, feltételezhető, hogy képes magas szinten tartani egy adott állomány termékenységét a ciklus utolsó harmadában. Vizsgálni kívánjuk, hogy a tojók takarmányának hasonló kiegészítése eredményez-e javulást a termékenységben. Azt is teszteltük, hogy ez a javulás a termékenyülésben is megmutatkozik-e. Elegendő-e a termékenység emeléséhez csak az egyik ivarban kiegészítéseket alkalmazni? Ezért olyan kísérleti csoportokat állítottunk be, ahol vagy csak a kakasok, vagy csak a tojók, vagy mindkét ivar kapta a szelén kiegészítést.

A nátrium-szelenitet és E-vitamint kisebb mennyiségben tartalmazó takarmányt fogyasztó kontroll csoport jó termékenységi eredményeket mutatott (**21. ábra**), jóllehet a ciklus végén a valódi és lámpázási termékenység értékei távolodtak egymástól, azaz a korai embrióelhalás kissé nőtt.

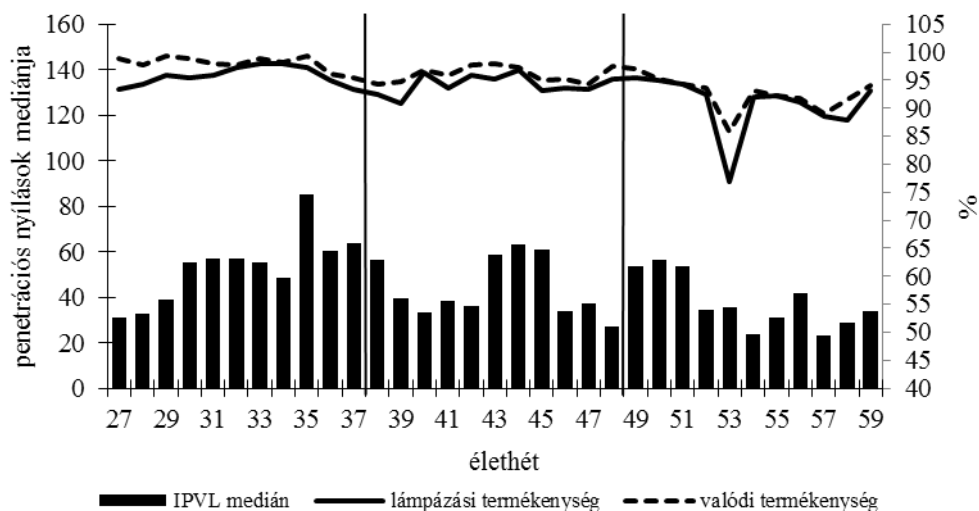


21. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a kontroll csoportban

A legmagasabb spermiumtranszport az 1. harmadban figyelhető meg, melynek maximális medián értéke 88 volt. Ezt követően szignifikánsan ($p \leq 0,01$) csökkent a termékenyítés helyszínére jutó spermiumok mennyisége a 3. harmadban. A termelés előrehaladtával mindkét termékenységi paraméter hasonló tendenciát követett.

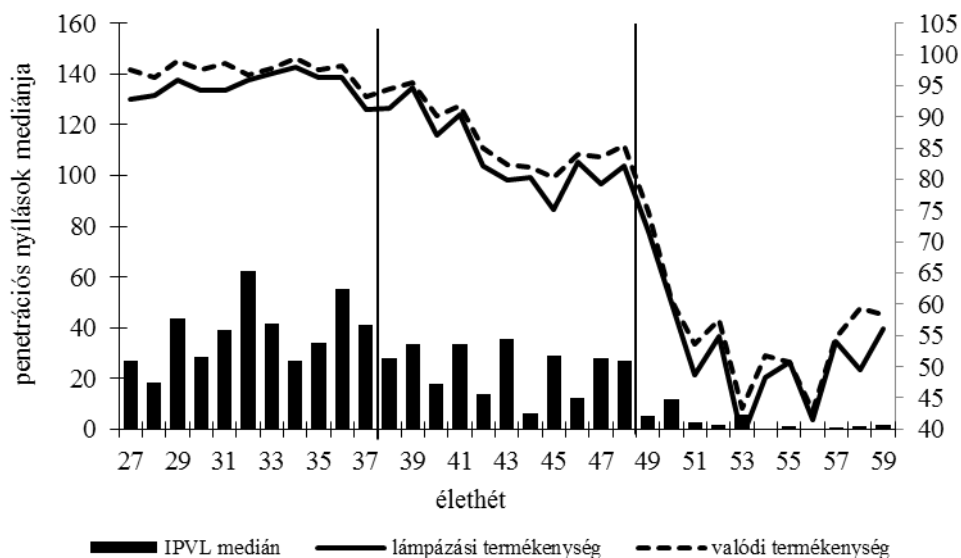
Abban a csoportban, ahol csak a tojók kaptak szelено-metionin kiegészítést (22. ábra), a spermiumtranszport a ciklus egész tartamában viszonylag magas szinten volt, ezzel együtt a termékenységi értékek is.

A spermiumtranszport maximális értéke 85-ös mediánnal, a 35. élethéten figyelhető meg. A spermiumok mennyisége a 2. harmadban nem csökkent, azonban a 3. harmadban itt is szignifikánsan alacsonyabb ($p \leq 0,05$) volt. A termékenységi eredmények is csökkentek a termelés utolsó fázisában, azonban a két termékenység között nem volt szignifikáns különbség, tehát nem növekedett a korai embrióelhalás.



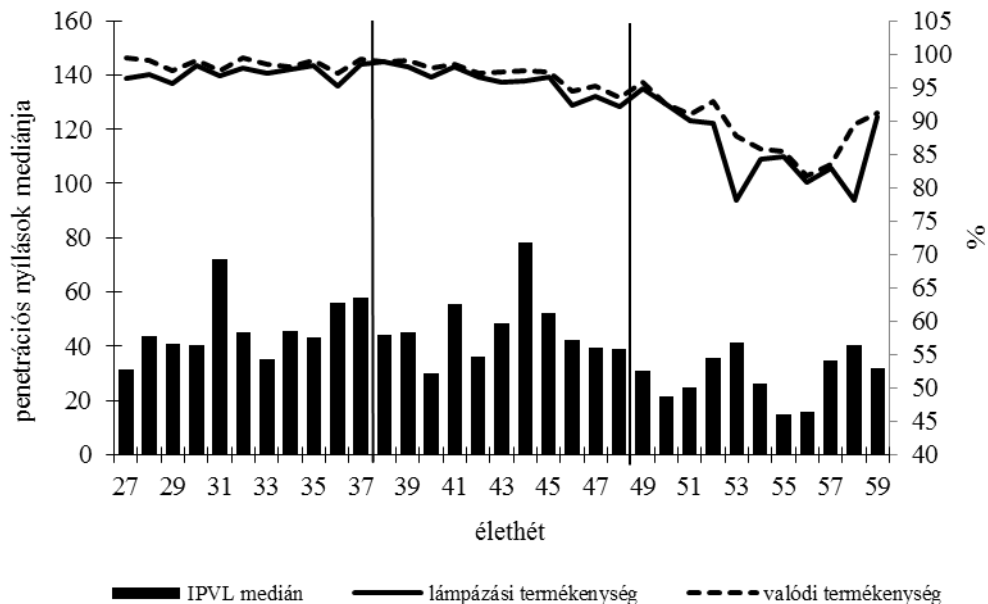
22. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a Se + E-vitamin tojó csoportban

A következő csoportban (**23. ábra**) csak a kakasok takarmányát egészítettük ki szelenometioninnal és E-vitaminnal, de annak ellenére, hogy az előző kísérletben szignifikáns javulást mutattunk ki a spermaminőségben a kezelt kakasoknál, a csoportvizsgálatban ez nem fejeződött ki. Sőt, minden általunk vizsgált paraméter ebben a csoportban volt a legrosszabb, pedig a termelés során (46. élethéten) lecseréltük a kakasokat, a csoport teljesítményén így sem tudtunk javítani. Természetesen a legmagasabb spermiumtranszport a termelés 1. harmadában jelentkezett itt is, 62,5 maximális mediánnal, a 32. élethéten. Ezt követően, a 2. harmadban még tartotta magát, de a 3. harmadban drasztikusan ($p \leq 0,05$) csökkent és nulla közeli medián értékeket mutatott. Ezzel párhuzamosan a 48. élethetet követően a termékenységi eredmények is mélypontra csökkentek. Feltételezésünk szerint ebben a csoportban sokkal inkább a tojókkal lehetett probléma, mint a kakasokkal. A 60. élethéten a tojók petevezetőjének szövettani vizsgálatát is elvégeztettük, melynek során a petevezetőkben nem tudtak spermiumot kimutatni, de nem találtak rendellenességre utaló szerkezeti elváltozásokat sem.



23. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a Se + E-vitamin kakas csoportban

A **24. ábra** mutatja a spermiumok mennyiségének és a termékenységi értékek változásait abban a csoportban, ahol mindkét ivar szeleno-metioninnal és E-vitaminnal kiegészített takarmányt fogyasztott. Ebben az esetben viszonylag hamar, már a 31. élethéten csúcs értéket (medián 72) mutatott, majd a 44. élethéten újabb maximum érték (medián 78) figyelhető meg a spermiumok mennyiségében. Ennek ellenére a membránon található penetrációs nyílások mennyisége a termelés 3. harmadában itt is szignifikánsan csökkent ($p \leq 0,01$). Ebben a csoportban is jó termékenységi eredményeket kaptunk, azonban azok változása a termelés során, egybeesik a spermiumtranszport változásaival. A lámpázási és valódi termékenységek között itt is kisebb különbség detektálható, azaz a ciklus végére jellemző korai embrióelhalás szintje valamivel alacsonyabb volt. Úgy tűnik tehát, hogy a szerves Se + E-vitamin és a korai embrióelhalások között összefüggés lehet.



24. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a SE + E-vitamin tojó + kakas csoportban

A mediánok által meghatározott görbe alatti területek alapján is elmondható, hogy az 1. és 2. harmad között minden csoportban csökkentek a terület értékek, kivéve a Se + E-vitamin tojó+kakas csoportban, ahol még egy 1%-os növekedést is megfigyeltünk. A 3. harmadban azonban minden csoportban csökkentek a görbe alatti területek, legdrasztikusabban a Se kakas csoportban, ahol 88,53%-os csökkenést mutattunk ki.

A csoportokat összehasonlítva (**9. táblázat**) megállapítható, hogy a termelés kezdetén a kontroll csoportban volt a legintenzívebb a spermiumtranszport, majd ez a különbség a termelés csúcs időszakában, illetve leszálló ágában kiegyenlítődött, kivéve a Se + E-vitamin kakas

csoporthoz, ahol minden csoport teljesítményét végig szignifikánsan ($p \leq 0,01$) alulmúlta. A kétféle termékenységgel kapcsolatban elmondható, hogy a termelés kezdetén szignifikánsan magasabb volt a kontroll ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$) csoportban a Se + E-vitamin tojó és Se + E-vitamin kakas csoportokhoz képest, azonban ez a különbség a Se tojó csoport esetében kiegyenlítődt.

9. táblázat: A penetrációs nyílások medián értékei a termelési ciklus egyes harmadaiban

	1. harmad	2. harmad	3. harmad
kontroll	52a,d	47,5a,f	36b,h
Se + E-vitamin ♀	49a	40b	34c
Se+ E-vitamin ♂	35a,e	25b,g	1c,i
Se + E-vitamin ♀ és ♂	43,5a	43a	27b

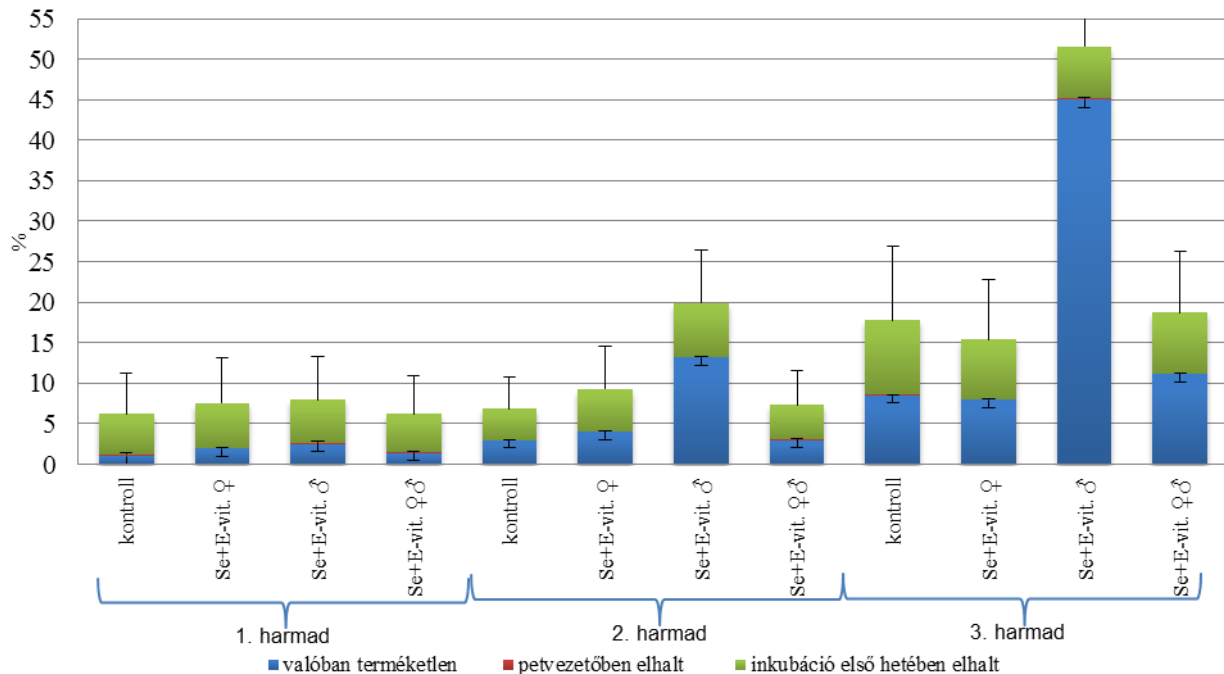
A szignifikáns eltéréseket mutató első betűk a csoporton belüli változásokat, míg a második betűk a kontroll csoporthoz viszonyított különbségeket szemléltetik. ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$)

Összefoglalva megállapítható, hogy bár a tojók bizonyos szinten reagáltak a szerves szelén és E-vitamin adagolására (kontroll csoport jobb teljesítményének kompenzálása), azonban a termékenységben szignifikáns javulást ezzel együtt sem tudunk igazolni.

4.3.2. A korai embrionális elhalások vizsgálatának eredményei

A 25. ábra szemlélteti a „valóban” terméketlen tojások, a petevezetőben elhalt embriók és a keltetés első hetében elhalt embriók megoszlása csoportonként az egyes harmadokban. Látható, hogy azoknak a tojásoknak a mennyisége, melyek valóban nem tartalmaztak embriót, a termelés során minden csoportban növekvő tendenciát mutat. A petevezetőben történt elhalások csak nagyon csekély százalékban fordultak elő a termelési ciklus egésze alatt és mennyiségük sem változott lényegesen. A keltetés első hetében elhalt embriók mennyiségéről azonban elmondható, hogy csak a kontroll csoportban növekedett szignifikánsan ($p \leq 0,05$) a termelés utolsó harmadában. Ebből következik, hogy a termékeny tojásokra vetített kelési % is ebben a csoportban csökkent nagyobb mértékben. A kontroll, a Se + E-vitamin tojó és a Se + E-vitamin tojó+kakas csoportoknál elmondható, hogy a termelés kezdetekor legnagyobb mennyiségben az elhalt embriót tartalmazó tojások estek ki a keletetőből, míg a termelés további részében az elhalt embriót tartalmazó, illetve az embriót nem tartalmazó tojások mennyisége közel hasonló arányban fordult elő. A Se + E-vitamin kakas csoportban a termelés 2. és 3. harmadában a „valóban” terméketlen tojások mennyisége volt a legmagasabb.

A Se + E-vitamin tojó és Se + E-vitamin tojó+kakas csoportokban a ciklus 3. harmadában néhány %-kal alacsonyabb volt a korai embrióelhalások gyakorisága (7,4% és 7,5%) a kontroll csoport (9,15%) adataihoz képest. Tehát hasonlóan a termékenységi adatokhoz, a szelenometioninnak bizonyos pozitív hatását ki lehet emelni a termelési ciklus végén megnövekvő korai embrióelhalások tekintetében.



25. ábra: A „valóban” terméketlen tojások, a petvezetőben elhalt embriók és a keltetés első hetében elhalt embriók megoszlása csoportonként az egyes harmadokban ($\bar{x} \pm SD$)

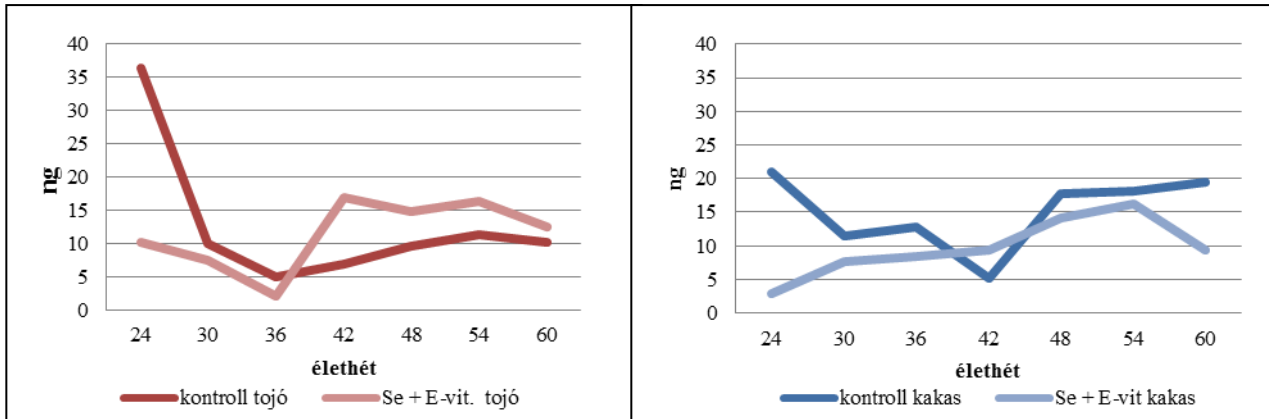
4.3.3. A hormonvizsgálatok eredményei

E vizsgálat során teszteltük a szelén-kiegészítés és a stressz-tűrőképesség összefüggését. Összehasonlító szteroid hormonvizsgálatokat végeztünk a tojókon és a kakasokon a kontroll (szerves szelén-mentes) és abban a csoportban, ahol mindkét ivar kapott szelén-kiegészítést.

4.3.3.1. Fekális szteroid analízisek eredményei

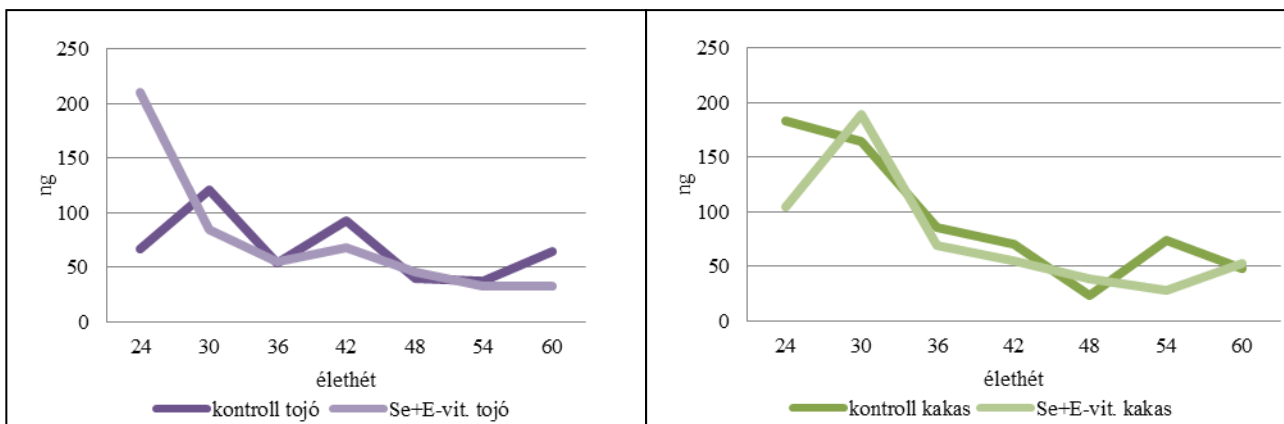
A kortikoszteron értékek alakulása a **26. ábrán** látható. A kontroll csoport tojóinál a kezdeti magas kortikoszteron érték ellenére sincs statisztikailag is igazolható különbség a Se + E-vitamin tojó+kakas csoport adataihoz képest. Sőt a kontroll csoport kezdeti magas értékei a 40. hét körül a szelén tojók adatainál alacsonyabb értéket mutattak. A termelés kezdetén mindkét ivarnál kiugróan magas kortikoszteron értékeket kaptunk, amit azzal magyarázunk, hogy ez a csoport volt

az istálló bejárati ajtaja mellett, valamint itt volt elhelyezve a ventilátor, ami az időszakos bekapcsolások alkalmával hangos zajt keltett. Ehhez a stresszhatáshoz azonban pár hét alatt adaptálódtak a madarak, mert a 30. élethétre a fiziológiás szintű a kortikoszteron értéket detektáltunk. Mindkét csoportnál, mindkét ivarban a termelési ciklus második felében a kortikoszteron-szint emelkedő tendenciát mutat, ami arra utal, hogy a madarak stresszérzékenysége az életkor előrehaladtával növekszik. Ezt a fiziológiás jelenséget a szelén a tojók esetében nem, a kakasoknál bizonyos mértékig befolyásolni tudta



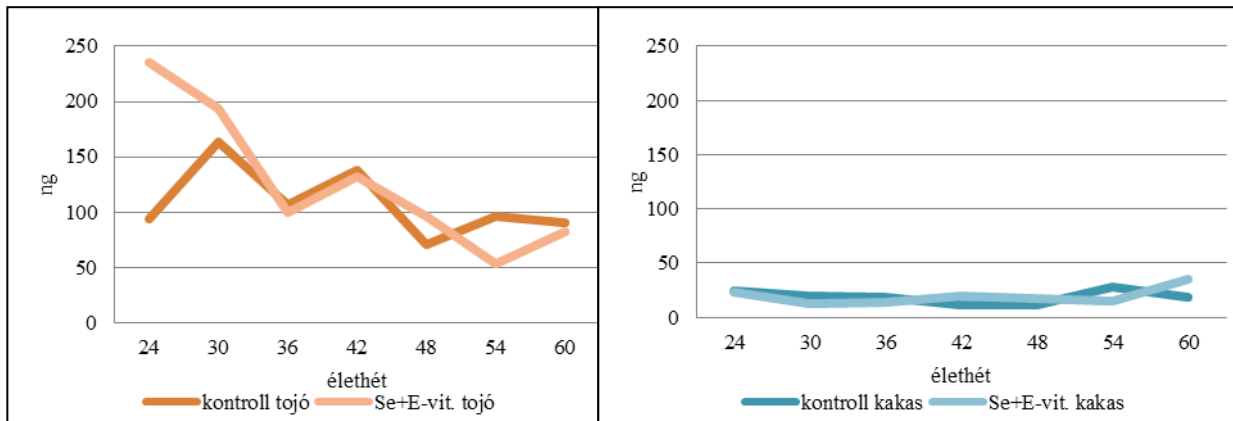
26. ábra: A kortikoszteron koncentrációk alakulása az egyes ivarokban és csoportokban

A fekális tesztoszteron-szintekben (27. ábra) nem volt kimutatható különbség az egyes csoportok között egyik ivarban sem. A tesztoszteron szintek a ciklus előrehaladtával csökkentek, a termelés beindulásakor voltak a legmagasabbak, amikor a párzási intenzitás a legerősebb az állományokban.



27. ábra: A tesztoszteron koncentrációk alakulása az egyes ivarokban és csoportokban

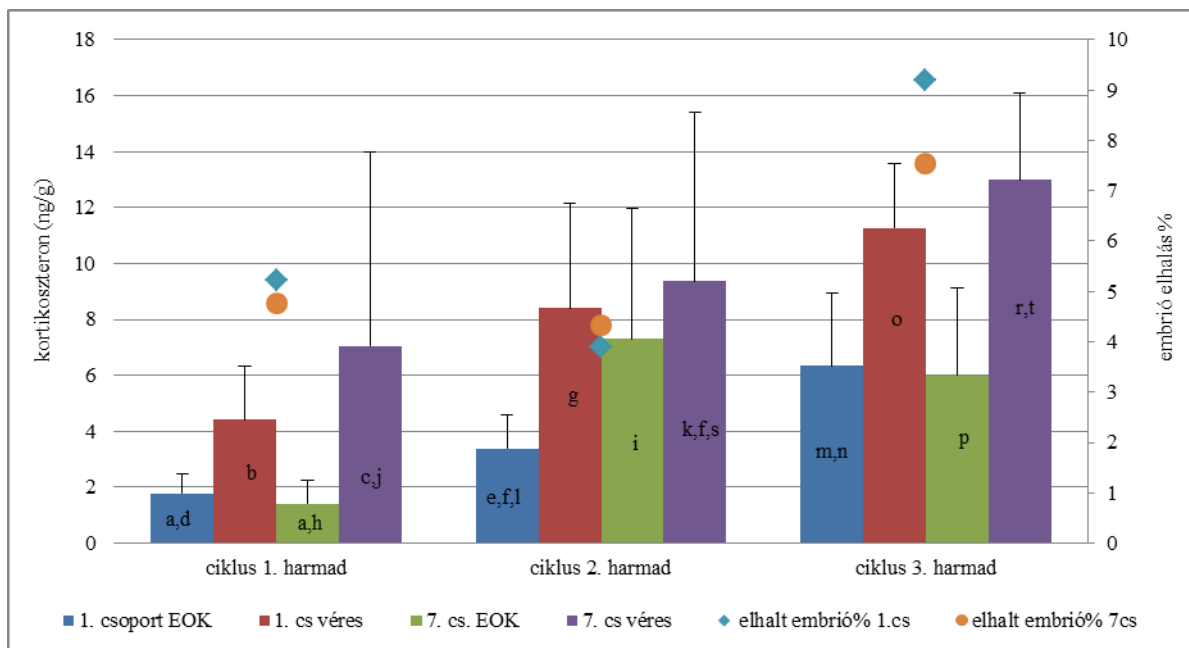
Az egész ciklus tekintve az ösztrogén szintek (28. *ábra*) közt sincs szignifikáns különbség az ivarokon belül. A kakasoknál a ciklus teljes hosszában egyenletes, alacsony ösztrogénszint mutatható ki, míg a tojóknál a termelés kezdetén induló magasabb szint a 30. élethétől csökkenő tendenciát mutat, ami egybeesik a tojástermelés és a termékenység csökkenésével. Látható, hogy a kontroll csoportban a ciklus elején alacsony ösztrogénszint párosul a magas kortikoszteronnal, mely összefüggésbe hozható a ciklus elején mért 1,5 %-kal alacsonyabb tojástermeléssel.



28. *ábra*: Az ösztrogén (E₂) koncentrációk alakulása az egyes ivarokban és csoportokban

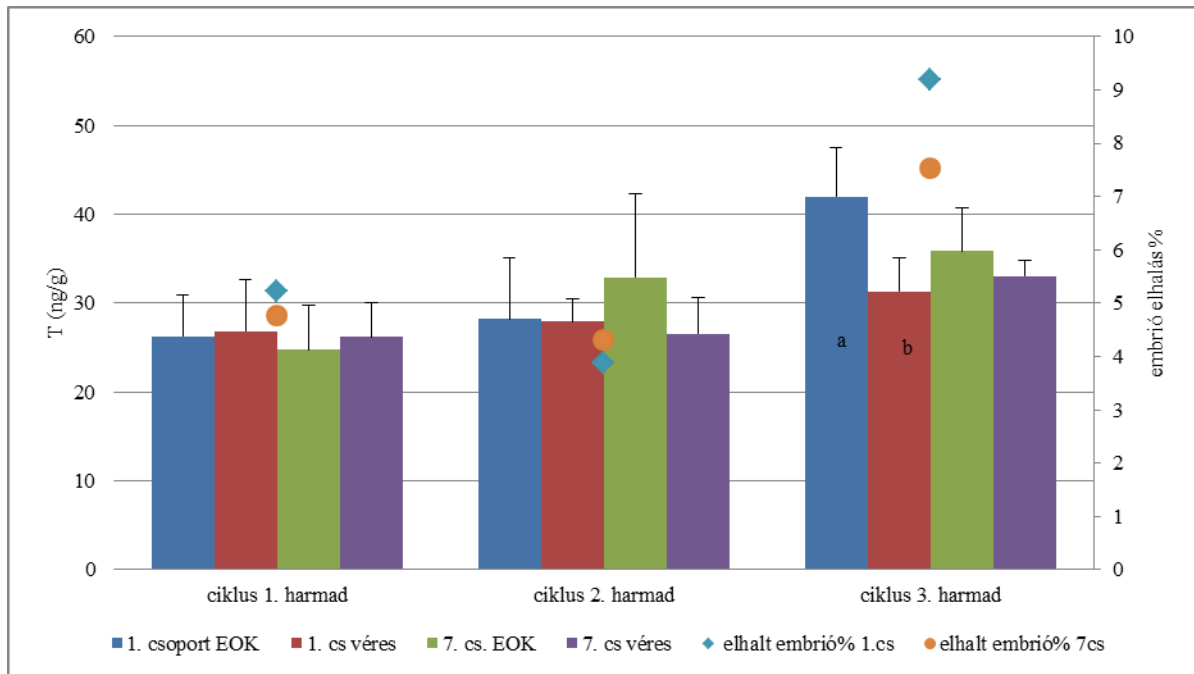
4.3.3.2. Tojásszík szteroid analízisek eredményei

A **29. ábra** alapján elmondható, hogy párhuzamosan a kortikoszteron-emelkedéssel nő az elhalt embriókat tartalmazó tojások aránya is, azonban a ciklus 3. harmadában a kontroll csoporthoz viszonyítva bizonyos mértékben csökkent az embriómortalitás annak ellenére, hogy a szikben magas glükokortikoid szint mérhető. Feltételezésünk szerint a szikbe is bejutott Se pozitív hatással lehet az embriógenézisre, így a ciklus végén a Se + E-vitamin etetés csökkenti az embrióelhalás arányát, mintegy ellensúlyozva a stresszhormon káros hatásait.



29. ábra: A tojásszík kortikoszteron tartalmának változásai a termelési ciklus során az embrióelhalással összefüggésben ($\bar{x} \pm SD$)

A szik tesztoszteron-tartalma (**30. ábra**) a ciklus 3. harmadában a legmagasabb, itt az emelkedett T szintnek stresszvédő szerepe lehet, ugyanis a magasabb androgen tartalom kismértékben ellensúlyozni képes a kortikoszteron hatását.



30. ábra: A tojásszik tesztoszteron tartalmának változásai a termelési ciklus során az embrióelhalással összefüggésben ($\bar{x} \pm SD$)

Összefoglalva, a tojásszikben a stresszhormon esetében, mindkét csoportban, az elhalt embriót tartalmazó és normál embriófejlődést mutató tojások közt jelentős, több mint kétszeres különbség mutatható ki. Megállapítottuk, hogy a ciklus előrehaladtával párhuzamosan nő a szikbe deponált kortikoszteron-tartalom is. Ezzel párhuzamosan nőtt az elhalt embriót tartalmazó tojások aránya is, azonban a Se kiegészítést kapott csoportban a ciklus 3. harmadában a kontroll csoporthoz viszonyítva csökkent az embriómortalitás aránya, annak ellenére, hogy a szikben magas glükokortikoid szint mérhető. A tojástermelés utolsó harmadában az emelkedett stresszhormon szint kompenzálására, nő a szikbe deponált tesztoszteron, aminek stresszvédő szerepe lehet. Ismert, hogy a tesztoszteron serkenti az *in ovo* embriófejlődést, míg a kortikoszteron lassítja azt.

4.3.4. Szövetteni vizsgálatok eredményei

A vizsgálat során több kérdésre kerestünk választ:

- változik-e a petevezető szövetteni morfológiája a spermium-tároló helyeken egy teljes termelési ciklus során (uterovaginális szűkület, infundibulum)?
- van-e különbség az uterovaginális szűkületben levő, valamint a infundibulum spermium tároló csövecskéiben a spermiumok mennyiségét, illetve a nyálkahártya állapotát illetően a termelési ciklus egyes szakaszaiban?
- a szerves kötésű szelén és E-vitamin hatással van-e a petevezető állapotára?

A szövetteni metszetek (**3. számú melléklet**) értékelése során megállapítást nyert, hogy az életkor előrehaladtával a petevezető vizsgált területein határozott változások következnek be, amely újszerű eredmény. Egyrészt fokozódik a tubulusokban a szekréciós aktivitás, a nyálkahártya vastagodik, tömöttebbé válik, a kötőszöveti elemek rostokban gazdagodnak, a tubulusok szerkezete is változik - kitágulnak és vékonyodik a faluk, feltételezhetően a szekrétum kiszorítja a spermiumokat, azok csak a szűkebb csövecskékben láthatók. Mindezek a változások mindkét kísérleti csoportban megfigyelhetők és azonosan alakulnak.

Figyelemre méltó adat, hogy az infundibulumban - sem a lumenben, sem a spermiumtároló tubulusokban - nem lehetett spermiumokat kimutatni, jóllehet itt zajlik a termékenyítés az ovulációt követően és az infundibulum distalis szakaszában levő csövecskék ún. „másodlagos spermiumtároló” helyként ismertek. Elképzelhető, hogy ez a genotípusra jellemző tulajdonság, amely a testsúlyra történő szelekció negatív vonzata.

A **10. táblázatból** egyértelműen látszik, hogy a szerves kötésű szelén E-vitaminnal a vizsgált paraméterekben (tubulusok mennyisége, spermium-teltség, szekréciós aktivitás) semmilyen hatással nem volt a petevezető morfológiájára. A tubulusok spermiumteltsége az uterovaginális szakaszban a 34. héttől növekszik, legmagasabb szintű az 54-60. héten. Jellegzetes a petevezető szekréciós aktivitásának növekedése is a kor előre haladtával, ami a legkifejezettebb a termelés végén (60. hét). A raktározó csövecskék mennyisége minden egyednél meghatározott, az életkorral nem változik, tehát a látóterenként eltérő számú tubulus inkább azok teltségével, fejlettségével, a hámréteg vastagságával, illetve a szövetteni metszet sikerével lehet összefüggésben.

10. táblázat: A szövettani vizsgálatok eredményeinek összegzéseJelmagyarázat: ritka, kevés, nem jellemző: **+**nagyon sok, gyakori, jellemzően: **++++**

Életkor	Petevezető- szakasz	Spermium- teltség		Szekréción aktivitás		Tubulusok (SST) mennyisége	
		<i>Kontroll</i>	<i>Szelén + E vit</i>	<i>Kontroll</i>	<i>Szelén + E vit</i>	<i>Kontroll</i>	<i>Szelén + E vit</i>
24. hét	Infundibulum	:		+		+	
	UVJ	-		+		++	
34. hét	Infundibulum	:	:	++	++	+	+
	UVJ	++	+++	++	++	++	++
44. hét	Infundibulum	:		++++	++++	+++	++++
	UVJ	++++	+	++	++	++	+++
54. hét	Infundibulum	:	:	++	+++	+++++	++++
	UVJ	+++	++++	+	+	++	++
60. hét	Infundibulum	:	:	+++++	+++++	+++++	++++
	UVJ	++++	++++	+++++	+++++	+++++	++++

Összefoglalva megállapítható, hogy szövettani vizsgálattal igazolható volt, miszerint a petevezető struktúrája a termelési ciklus során változik, ami a nyálkahártya vastagodásában, a propria lazulásában, a spermium-tároló mirigyek tágulásában és szekréttummal való nagyobb feltöltődésben nyilvánul meg. Fontos adat, hogy sem az infundibulum tároló mirigyeiben, sem a lumenében sem mutatkoztak spermiumok. Ezzel megkérdőjeleződik az infundibuláris tubulusok

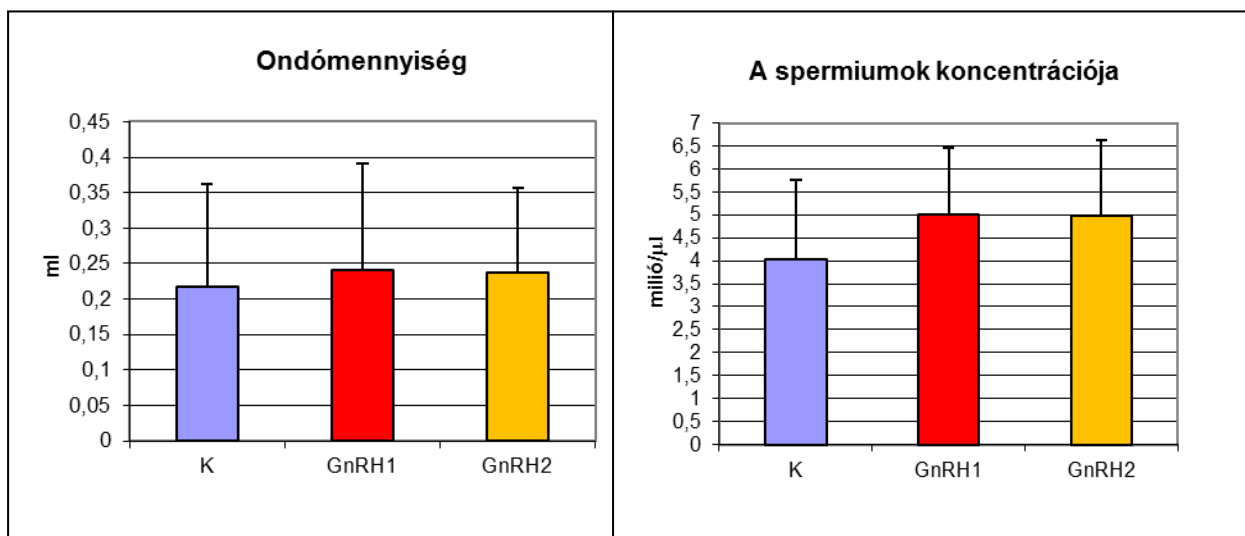
funkciója is. A két tároló hely struktúrája között lényeges különbségek voltak. Igazoltuk, hogy a szerves kötésű szelén és E-vitamin kiegészítés ebben a koncentrációban *nem volt képes* befolyásolni a tojók petevezetőjének spermiumtároló kapacitását.

4.4. IV. Kísérlet eredményei - Szintetikus GnRH előkészítés hatásának vizsgálata a hímivarban

4.4.1. Az ondóvizsgálatok eredményei

Az ondóvételt történő trenírozást 26 hetes korban, majd az ondóminősítést 28 hetes kortól kezdtük meg. 28 és 32 hetes kor között hetente 2x, majd hetente 1x minősítettük az ondómintákat, de az ondóvétel a spermiogenezis aktív állapotban tartása miatt folyamatosan heti 2 alkalommal történt.

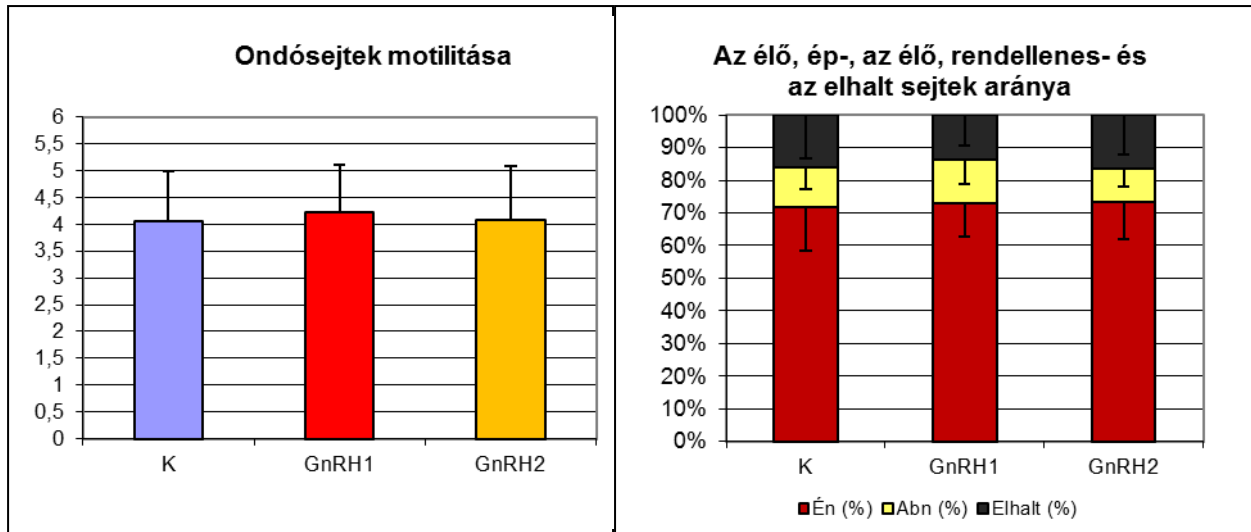
Az ondóvizsgálatok során értékelt paraméterek eredményeit mutatják be a **31.-32. ábrák**, a kontroll és a GnRH-val kezelt csoportokban. Az ondó mennyiségét illetően nem volt szignifikáns különbség a csoportok között, míg a spermium-koncentráció mindkét GnRH csoportban szignifikánsan jobb volt ($p \leq 0,01$), mint a kontroll csoportban.



31. ábra: Az ondó mennyiség átlagos értékeinek és az átlagos spermium-koncentráció alakulása a kontroll, a GnRH1 (kezelés a 23. élethétén) és GnRH2 (kezelés a 25. élethétén) csoportokban ($\bar{x} \pm SD$)

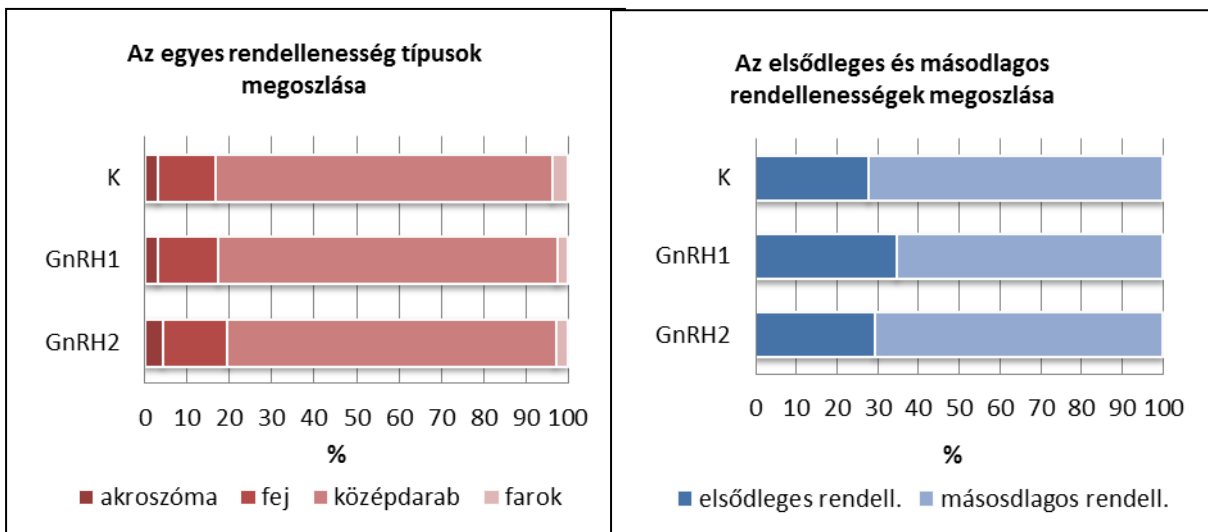
A spermiumok motilitása a *GnRH1* csoport kakasainál szignifikánsan ($p \leq 0,05$) jobb volt, mint a másik két csoportnál. Jóllehet, az élő normális sejtek aránya az egyes csoportokban azonosan

alakult, a *GnRH1* csoportban szignifikánsan magasabb volt az élő rendellenes sejtek aránya a másik két csoporthoz képest.



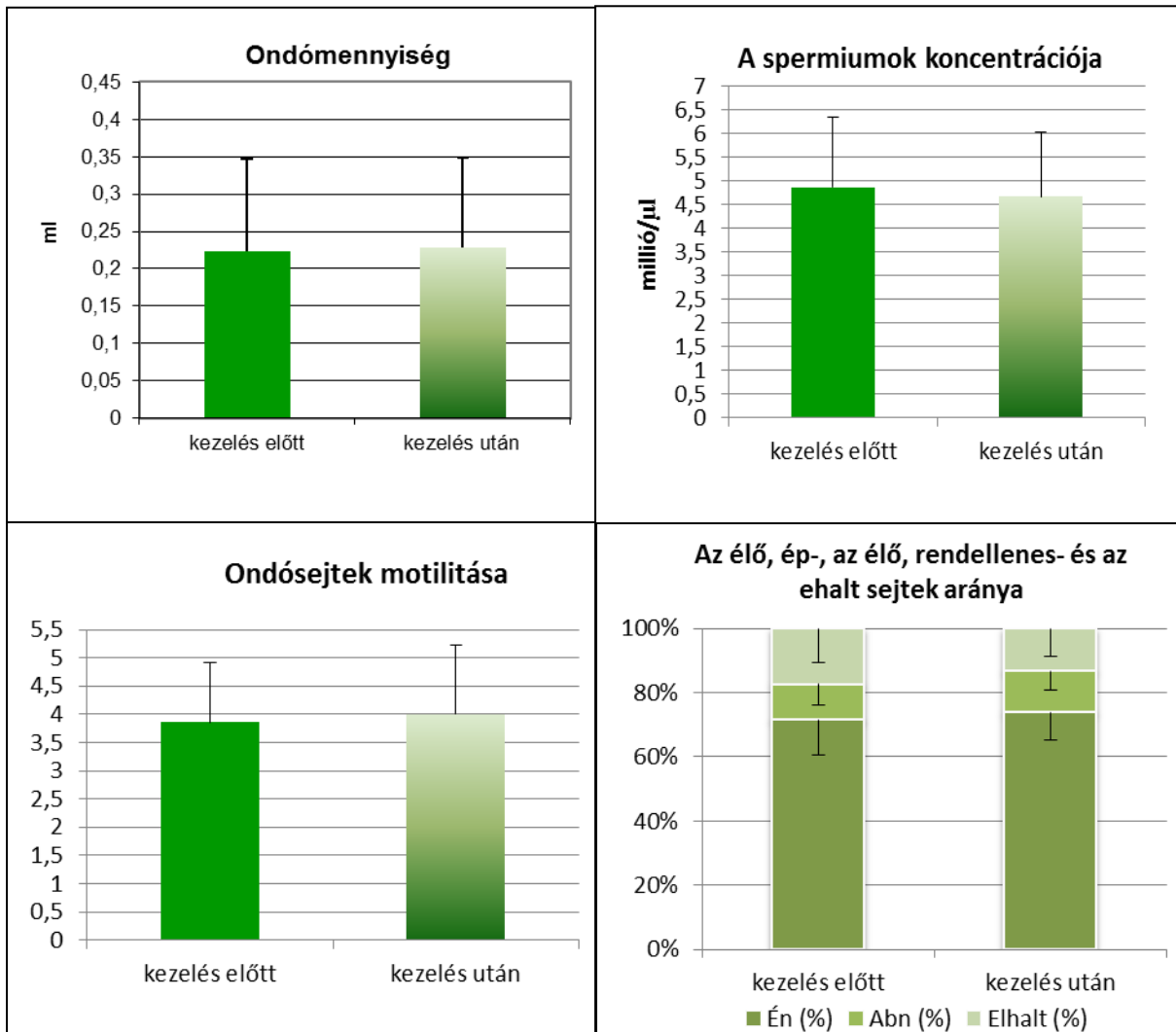
32. ábra: Az ondósejtek motilitásának és az élő ép-, az élő rendellenes morfológiájú spermiumok és az elhalt spermiumok arányának alakulása a kontroll, a GnRH1 (kezelés a 23. élethétén) és GnRH2 (kezelés a 25. élethétén) csoportokban ($\bar{x} \pm SD$)

Az egyes rendellenesség típusok megoszlásában nem volt különbség a csoportok között (**33. ábra**). Az elsődleges, azaz herei eredetű rendellenességek magasabb arányban ($p \leq 0,05$) fordultak elő a *GnRH1* csoportban.



33. ábra: A spermium-morfológiai rendellenességek megoszlása a kontroll, a GnRH1 (kezelés a 23. élethétén) és GnRH2 (kezelés a 25. élethétén) csoportokban

A **34. ábrán** látható a GnRH3 (kezelés a 42. élethéten) csoport ondóminősítési adatainak összehasonlítása a kezelés előtti 28-42. hetes, valamint a kezelést követő 42-52. hetes kor között. A *GnRH3* csoportban az ondó mennyisége, a spermiumok motilitása és az élő, ép morfológiájú sejtek aránya a GnRH kezelést követően emelkedő tendenciát mutat, azonban ez statisztikailag nem igazolható. A spermium-koncentráció csökkent a kezelés után, ami valószínűleg az életkor hatása, amit a GnRH már nem tudott kompenzálni.



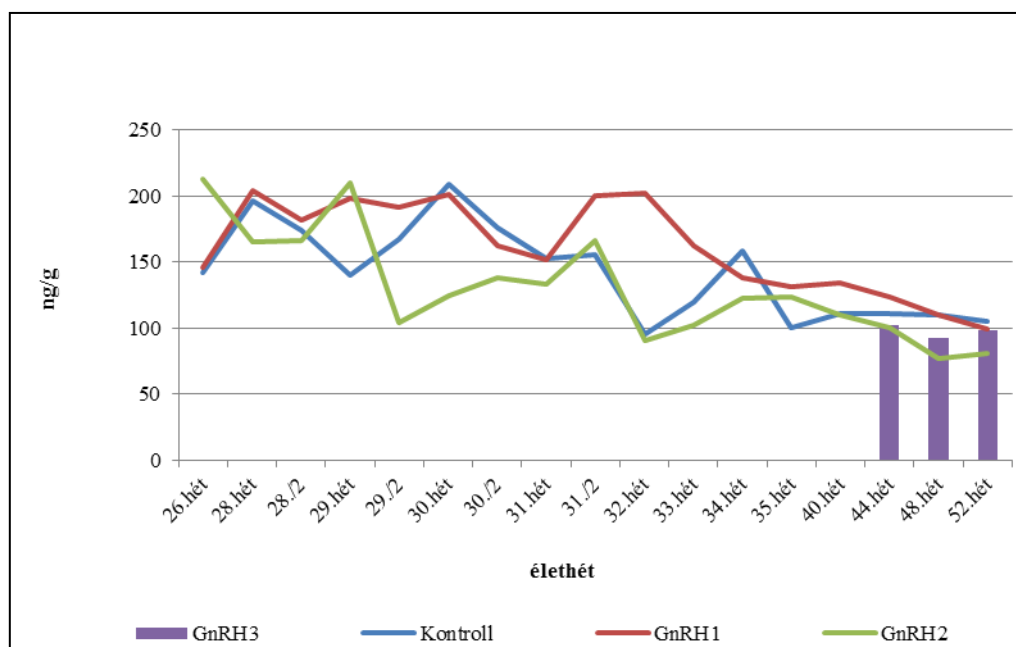
34. ábra: GnRH3 (kezelés a 42. élethéten) csoport ondóminősítési adatainak összehasonlítása a kezelés előtti 28-42. hetes, valamint a kezelést követő 42-52. hetes kor között ($\bar{x} \pm SD$)

A spermológiai vizsgálataink szerint a maturáció *kezdetén* végzett szintetikus GnRH analóg kezelés (*GnRH1*) szignifikánsan pozitívan hatott a spermium-koncentrációra ($p \leq 0,01$), valamint a spermiumok motilitására ($p \leq 0,05$), tehát összességében jobb spermaminőséget eredményezett, ellenben a későbbi kezelések ezt a hatást nem mutatták.

4.4.2. Szteroid hormon-analízisek eredményei

A hormonális beavatkozás miatt célszerűnek tartottuk, hogy a szaporasági mutatókon túl ellenőrizzük a GnRH egyéb hormonok szintjére való hatását is. Az androgének közül elsősorban a tesztoszteron az, amelyik a hímivarra jellemző tulajdonságok megjelenését befolyásolja. Célunk volt annak tisztázása is, hogy a spermavétel milyen szintű és mennyi ideig ható stresszt okoz az állatoknak, ezért teszteltük a kortikoszteron szintek alakulását is.

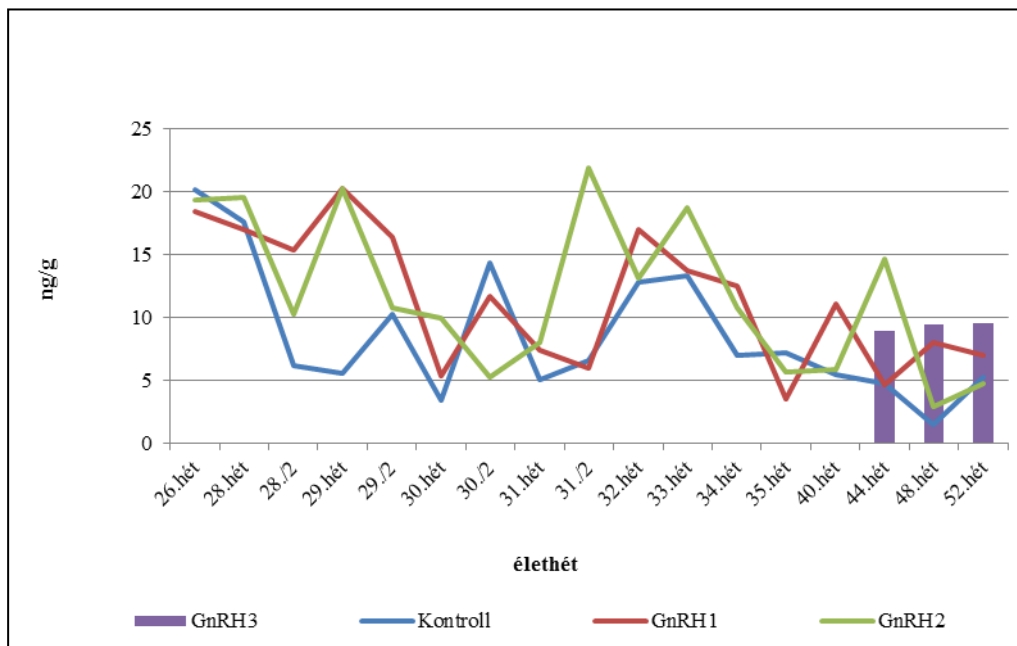
A kakasok tesztoszteron szintje (35. ábra) a ciklus első harmadában magas volt, aztán lassan csökkent, és a 40. élethétől alacsonyabb szintre állt, ami a *GnRH3* csoportban sem emelkedett. A legkorábban kezelt csoport kakasaiban (*GnRH1*) a tesztoszteron hormon szintje szignifikánsan magasabb volt a többi csoporténál.



35. ábra: A tesztoszteron szintjének alakulása az egyes csoportokban

A kortikoszteron szintekre (36. ábra) jellemző, hogy a GnRH-s csoportokban magasabb a vizsgált időszakban a kezeletlen kontroll mintákhoz képest, ami az irodalom szerint a GnRH által kiváltott magasabb szexuális agresszióra, másrészt egy fokozottabb stressz-érzékenységre utalhat. A kezdeti magasabb glükokortikoid szintek az ondóvétel okozta stresszt igazolják, amelyhez az állatok 3-4 hét alatt adaptálódtak. A 31-33. héten újabb átmeneti stresszhormonszint-emelkedés mutatható ki, amely jól tükrözi azt az állatok számára jelentős stresszel járó időszakot, amikor

megszokott gondozójuk szabadságra ment és idegen ember látta el őket. Ebben az időszakban a GnRH-s csoportok ondómintáiban megnövekedett a rendellenes és elhalt sejtek aránya is.



36. ábra: A kortikoszteron szintjeinek alakulása az egyes csoportokban

Összefoglalva, az egyedi kakasvizsgálatoknál beigazolódott, hogy a szintetikus GnRH analógok alkalmazása az adott koncentrációban és gyakorisággal, a maturáció kezdeti időszakában képes befolyásolni a sperma minőségét, ami magasabb spermium-koncentrációban és jobb spermium-motilitásban nyilvánult meg. Ha a maturáció későbbi időpontjában, vagy az ivarérett korban alkalmazzuk a beavatkozást, ez a pozitív hatás nem, vagy csak csekélyebb mértékben tud érvényesülni. Az emelkedett kortikoszteronszintnek a spermiogenezisre kifejtett esetleges negatív hatásával magyarázhatjuk, hogy a minden szempontból legjobb csoportban (*GnRH1*) a spermium-rendellenességek összességében és azon belül az elsődleges, herei eredetű spermium-rendellenességek magasabb arányban jelentkeztek.

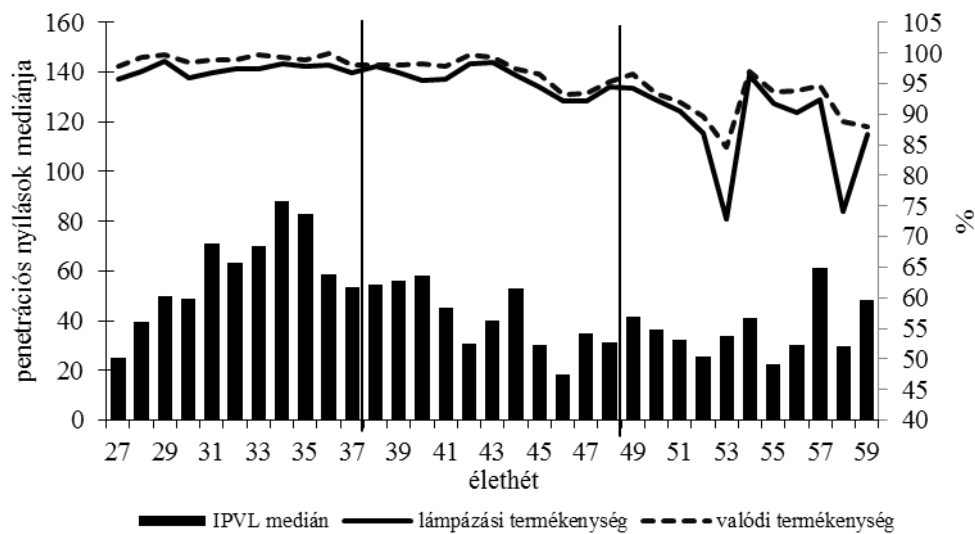
4.5. V. Kísérlet eredményei - Szintetikus GnRH előkészítés hatásának vizsgálata a termékenységre

4.5.1. A penetrációs nyílások, a termékenység és a „valódi” termékenység vizsgálatának eredményei

Az előző kísérlet alapján láthattuk, hogy a szintetikus GnRH hatására egyes spermatológiai mutatók javultak. A következő kísérlet célja annak tisztázása volt, hogy a GnRH alkalmazása képes

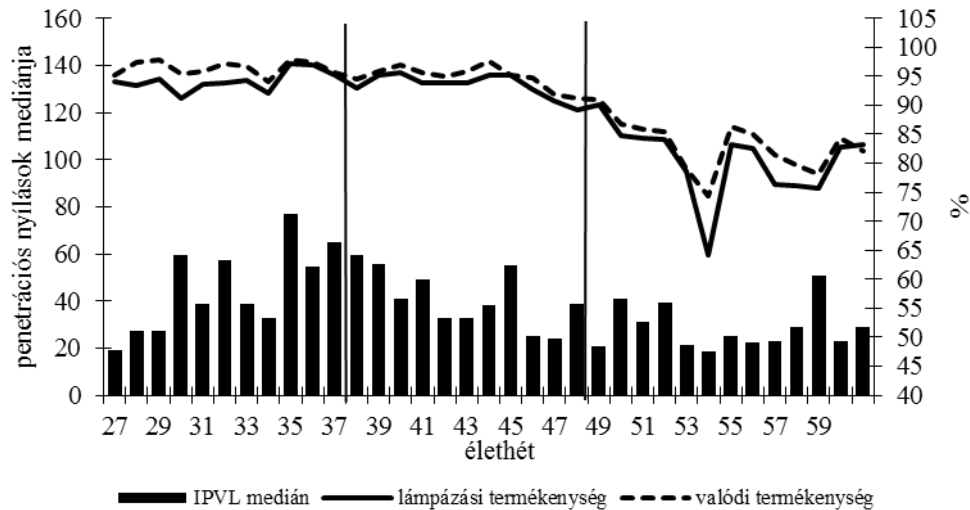
e befolyásolni az ondó minőségének javulásán keresztül, illetve esetleg a pázások számának növekedésével a termékenység hosszú távú növekedését.

A penetrációs nyílások és a termékenységek alakulását mutatják a **37-40. ábrák** a kontroll, illetve a kezelt csoportokban. A legintenzívebb spermiumtranszportot, illetve a legmagasabb lámpázási és valódi termékenységi értékeket az 1. harmadban figyeltük meg a kontroll csoportban. A penetrációs nyílások értéke a 34. élethéten mutatta a maximumot, 88-as mediánnal, a lámpázási termékenység már a 29. élethéten maximális értéket produkált (98,65 %), ennek ellenére a valódi termékenység a 36. élethéten érte el a 100%-ot. Ezt követően mind a spermiumok mennyisége, mind a termékenységi értékek szignifikánsan ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$) csökkentek a termelés végére.



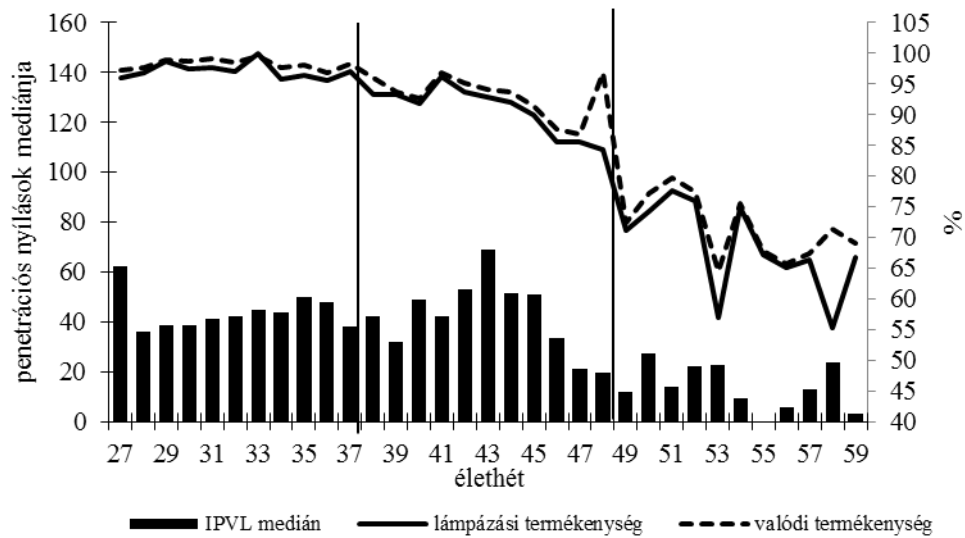
37. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a kontroll csoportban

A kezelt csoportokban (GnRH1, GnRH2, GnRH3) a spermiumtranszport és a termékenységek alakulása egybeesik a kontroll csoportnál észleltekkel. GnRH1 csoportban a penetrációs nyílások és a lámpázás során meghatározott termékenység maximuma a 34. élethéten volt (medián 77; termékenység 97,08%), míg a valódi termékenység már a 28. élethéten maximumot adott (97,81%).



38. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a GnRH1 (kezelés a 21. élethéten) csoportban

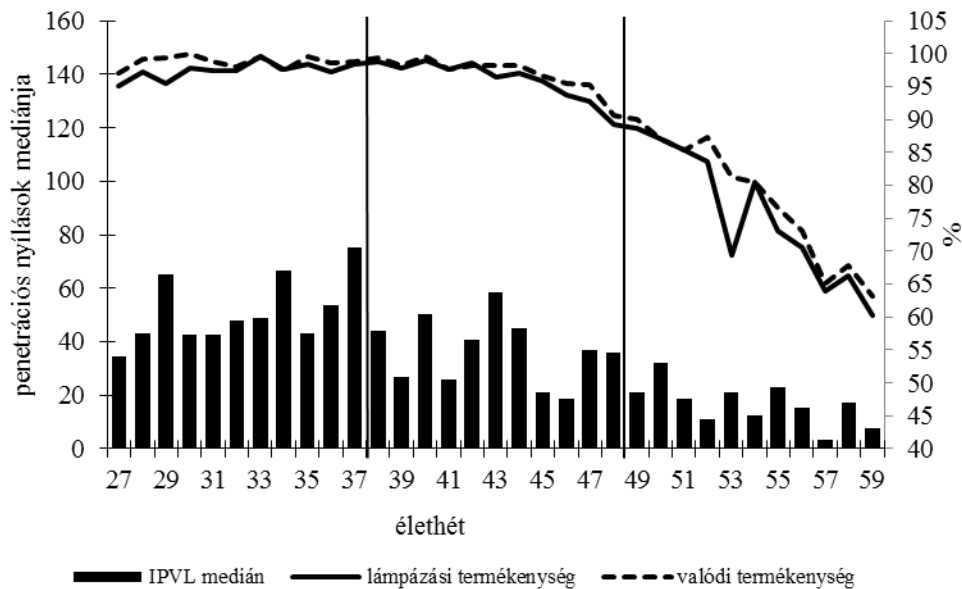
A GnRH2 csoportban a medián már a 27. élethéten adott egy csúcstérteket (medián 62,5), majd a 43. élethéten még egy csúcs figyelhető meg (medián 69). A két termékenységi érték azonban csak a 33. élethéten éri el maximumát, ahol a lámpázási termékenység 100% volt, míg a valódi termékenység 99,57%. Érdekes azonban az, hogy a 43. élethéten a spermiumtranszportban jelentkező csúcstérteket nem követi a termékenységek újabb csúcstérteke.



39. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a GnRH2 (kezelés a 23. élethéten) csoportban

A GnRH 3 csoportban viszonylag későn, a 37. élethéten figyelhető meg a legintenzívebb spermiumtranszport (medián 75). A lámpázási termékenység a 33. élethéten 99,66%-kal, míg a valódi termékenység a 30. élethéten 100%-kal tetőzött.

Érdekesnek tűnik, hogy a GnRH2 és GnRH3 csoportokban a két termékenység a 46. élethét után rohamosan csökkent.



40. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a GnRH3 (kezelés a 25. élethéten) csoportban

A csoportok eredményeinek összehasonlítása (**11. táblázat**) során megállapítható, hogy a termelés indulásakor a kontroll csoport mutatta a legmagasabb értékeket. Ezt az eredményt a penetrációs nyílások mediánjainak görbe alatti terület értékei is alátámasztják. A második harmadban nem volt szignifikáns különbség a spermiumtranszportban a kontroll csoporthoz képest. Sőt a GnRH2 csoportban csökkent a görbe alatti terület értéke a legkevésbé (0,12%). A termelés utolsó szakaszában azonban csak a GnRH1 csoport penetrációs nyílásai nem maradnak el szignifikánsan a kontroll csoporthoz képest. Mindkét termékenységgel kapcsolatban elmondható, hogy míg a termelés első harmadában nem volt lényeges különbség a csoportok között, addig a 3. harmadban szignifikánsan jobbnak bizonyultak a kontroll csoportban ($p \leq 0,01$).

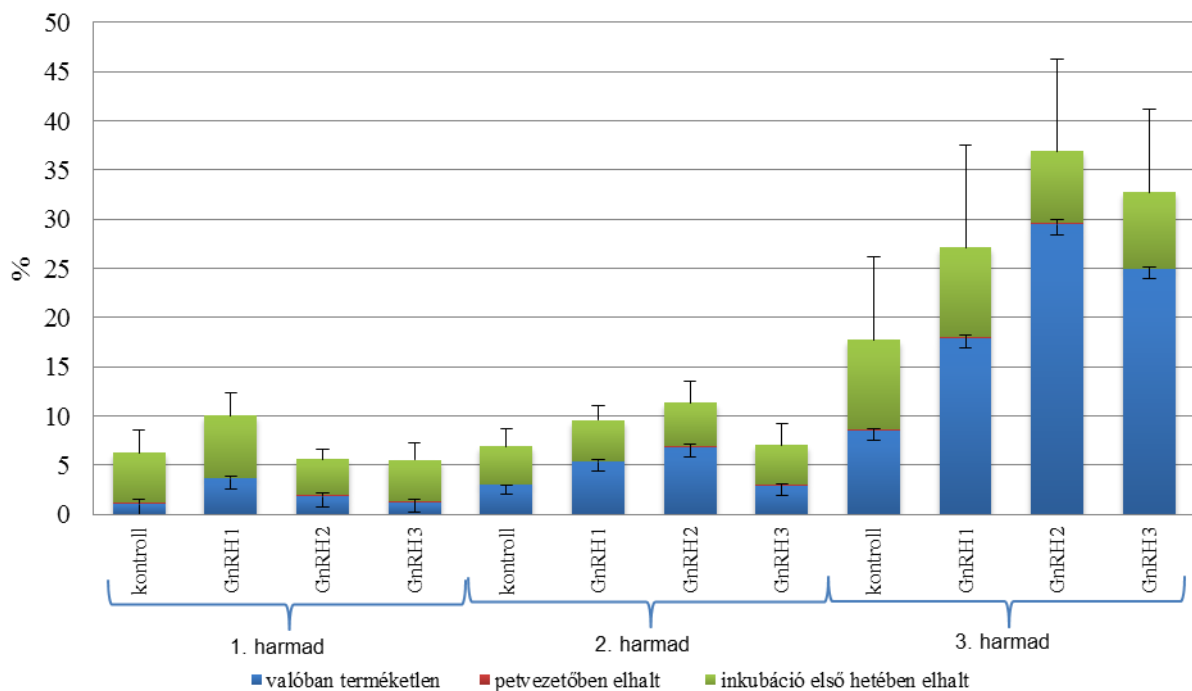
11. táblázat: A penetrációs nyílások medián értékei a termelési ciklus egyes harmadaiban

	1. harmad	2. harmad	3. harmad
kontroll	52a,d	47,5a	36b,f
GnRH1 (21. élethét)	48a	34b	28,5c
GnRH2 (23. élethét)	43a,e	41a	11,5b,g
GnRH3 (25. élethét)	46a	38,5b	15,5c,g

A szignifikáns eltéréseket mutató első betűk a csoporton belüli változásokat, míg a második betűk a kontroll csoporthoz viszonyított különbségeket szemléltetik. ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$)

4.5.2. A korai embrionális elhalások vizsgálatának eredményei

Ebben a kísérletben is vizsgáltuk a korai embrióelhalások alakulását a termelési periódus során az egyes csoportokban, ennek eredményeit mutatja be a **41. ábra**. Amint a valódi termékenység alakulásánál láthattuk minden csoportban nő a termelés előrehaladtával azoknak a tojásoknak a mennyisége, melyek valóban terméketlenek voltak.



41. ábra: A „valóban” terméketlen tojások, a petvezetőben elhalt embriók és a keltetés első hetében elhalt embriók megoszlása csoportonként az egyes harmadokban ($\bar{x} \pm SD$)

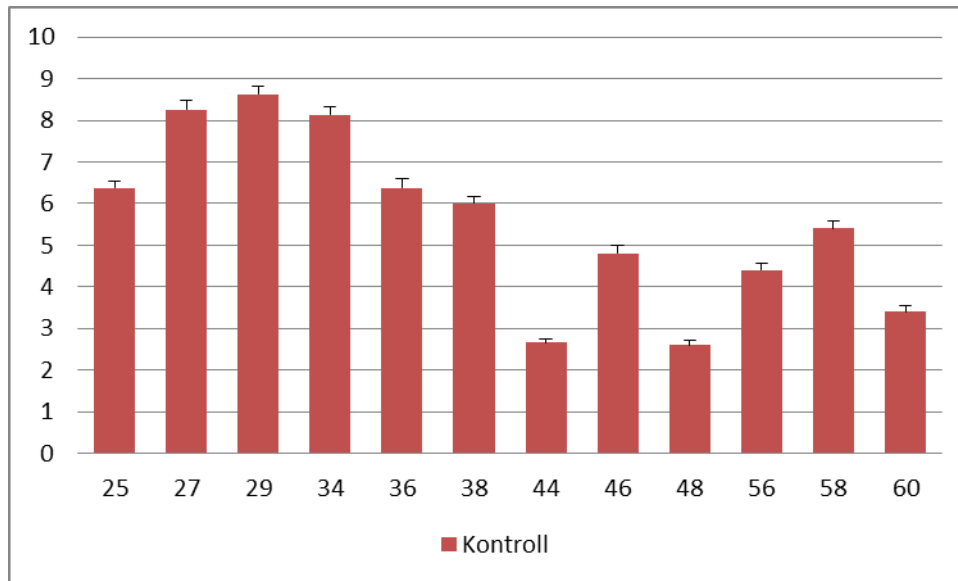
A petevezetőben elhalt embriók nagyon kis mennyiségben (0,05-0,19%) fordultak elő és mennyiségük sem változott lényegesen a termelés során. Az inkubáció első hetében elhalt embriók aránya a 3. harmadban szignifikánsan ($p \leq 0,05$) növekedett a kontroll csoportban, míg a többi csoportban is növekvő tendenciát mutat, de ez nem volt szignifikáns. Az is látható, hogy a termelés kezdetén az embrióelhalások fordultak elő legnagyobb mennyiségben a csoportokban, a termelés végére viszont az abszolút terméketlen tojások aránya növekedett meg nagy mértékben. A kezelt csoportok eredményeit összevetve a kontroll csoport eredményeivel megállapítható, hogy az embriókat nem tartalmazó tojások mennyisége a kritikus 3. harmadban a kontroll csoportban szignifikánsan ($p \leq 0,01$) alacsonyabb volt, úgy ahogy azt a termékenységi eredményeknél már láthattuk. A legmagasabb embrióelhalást is a kontroll csoportban, illetve a GnRH1 csoportban találtuk (9,15%; 9,1%), azonban ez nem bizonyult szignifikánsan rosszabbnak a másik két csoporthoz képest.

Az ismertetett eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a GnRH kezelések ebben a kísérletben – különösen a maturáció későbbi időpontjaiban (23. és 25. élethéten) alkalmazott kezelések esetében – nem volt pozitív hatásuk a termékenység perzisztenciájának növelésében. Amire éppen irányult a kísérlet, hogy a ciklus utolsó harmadában emeljük a spermiumtranszportot és ezen keresztül a termékenységet, annak a GnRH2 és GnRH3 csoportokban éppen az ellenkezője történt. Az 50. élethéttől minden csoportban drasztikusan csökkent a spermium mennyiség a tojásokban és a termékenységi értékek is. A legjobb eredmény a GnRH csoportok közül a 21 hetes korban kezelt kakasok csoportja (GnRH1) adta, de ezzel sem értünk el szignifikáns javulást a kontroll csoporthoz képest.

4.5.3. Etológiai megfigyelés eredménye

A megfigyelések célja annak tisztázása volt, hogy a GnRH stimuláció a párzások, illetve az agresszió gyakoriságában játszik-e valamilyen szerepet. A megfigyelés célja továbbá az is, hogy az életkor előrehaladtával milyen mértékben csökken a párzások gyakorisága.

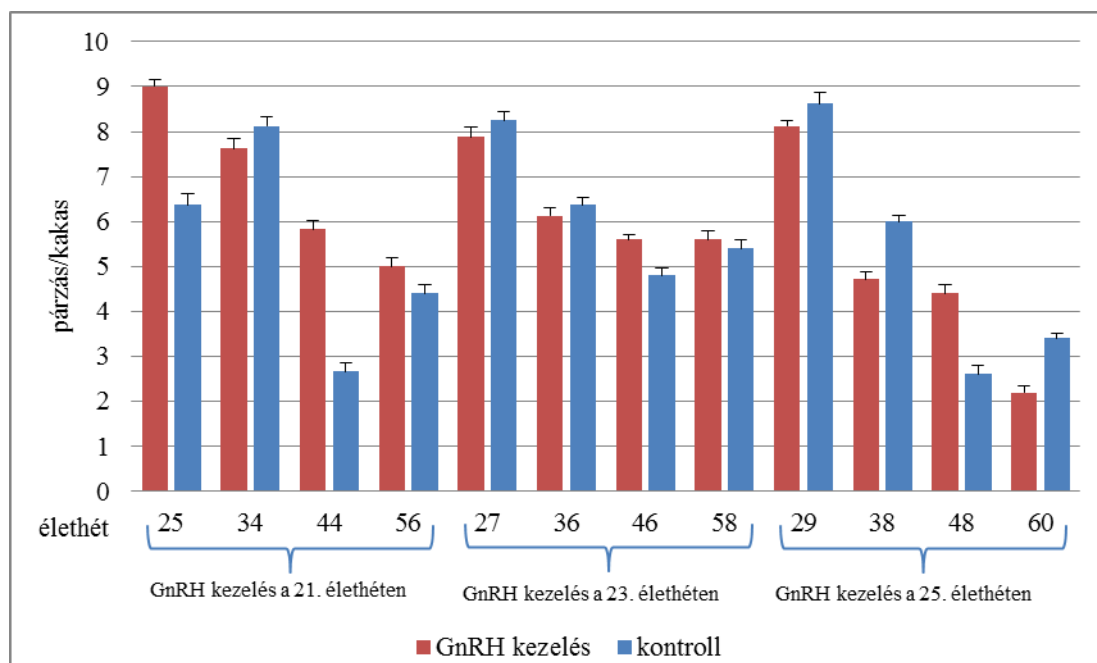
A megfigyelt periódusokban észlelt 1 kakasra jutó párzások gyakoriságát szemlélteti a **42.** és **43. ábrák**. A legtöbb észlelési időpontunk a kontroll csoportban volt, így a korosodás hatását itt lehetett a legjobban vizsgálni (**42. ábra**).



42. ábra: Az egy kakasra jutó párzások száma az egyes megfigyelési életheteken a kontroll csoportban

Az ábrán jól látható, hogy a legtöbb párzást a 27.; 29. és 34. heteken figyeltük meg, azaz a termelés 1. harmadában. Ez az eredmény egybeesik a penetrációs nyílások gyakoriságának eredményeivel, mert minden esetben az 1. harmadban figyeltük meg a legintenzívebb spermiumtranszportot. A 44. és 48. heteken szignifikánsan csökkent a ($p \leq 0,01$) az egy kakasra jutó párzások mennyisége, majd érdekes módon az 56. és 58. heteken újra növekszik, ami a spermiumtranszportban és a termékenységben is realizálódott az 57. és 59. hetekben.

A GnRH stimuláció hatását a párzások gyakoriságára a **43. ábra** mutatja be. Az ábrán látható, hogy a 21. élethéten alkalmazott GnRH kezelés a 25. (9 vs. 6,38) és 44. (5,83 vs. 2,67) élethetekben eredményezett lényegesen több párzást, melyek a termékenységi eredményekben nem realizálódtak. A 23. élethéten alkalmazott kezelés lényegében nem eredményezett több párzást a kísérleti csoportban. A 25. élethéten kezelt csoportban a 48. élethéten (4,4 vs. 2,6) figyeltünk meg intenzívebb párzást, míg 38. élethéten (4,71 vs. 6), és a 60. élethéten (2,2 vs. 3,4) a kontroll csoport kakasai tűntek aktívabbnak.



43. ábra: Az egy kakasra jutó párzások száma csoportonként és megfigyelési hetenként

Az agresszió oly csekély mértékben jelentkezett a csoportokban, hogy nem láttuk értelmét bevonni az értékelésbe.

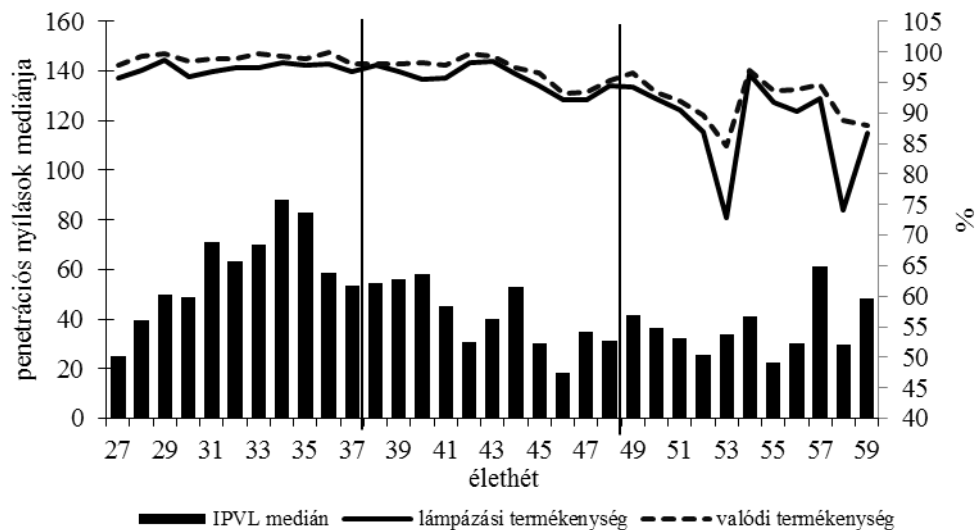
Összefoglalva elmondható, hogy az etológiai megfigyelések alapján az általunk észlelt időszakokban a legintenzívebb párzást a még fiatal állatok esetében rögzítettük. Azonban a termelés utolsó részében újra növekszik a párzási kedv, ez azonban a termelésben nem, vagy már csak nagyon későn jelentkezik. A GnRH kezelések közül 21. élethéten alkalmazott korai GnRH kezelés bizonyult a leghatékonyabbnak, ami azonban az előző eredmények alapján is látható, hogy nem realizálódott a termelési paraméterek emelkedésében.

4.6. VI. Kísérlet eredményei - Mesterséges termékenyítés kiegészítő alkalmazásának vizsgálata

Eredeti feltételezésünk további igazolására, miszerint a brojler szülőpárok terméketlenségi problémájának hátterében elsősorban a párzások csökkent száma, valamint a tojók fokozott spermiumürítése, tehát valójában spermium-hiányos állapot jelentkezik, így a mesterséges termékenyítés kiegészítő hatásának vizsgálatát is nélkülözhetetlennek tartottuk. Ezzel az volt a célunk, hogy a rátermékenyített csoportban a felgyorsult spermiumürülést extra spermiumadással próbáljuk meg kompenzálni. Vizsgáltuk a kiegészítő termékenyítés hatását a tojókban a spermiumpopuláció növekedésére, a termékenység alakulására, valamint a termékenyítéssel járó feltételezett stressz megjelenésére.

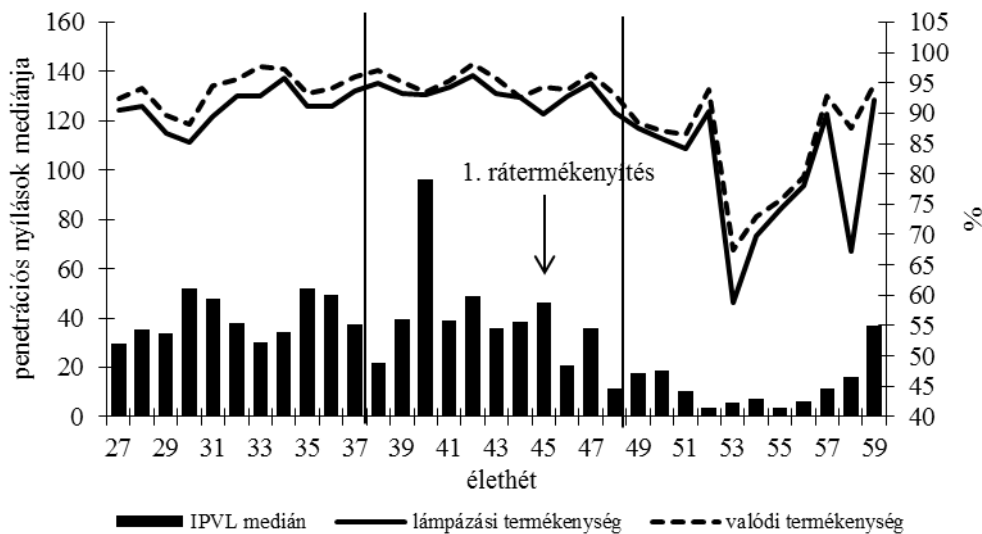
4.6.1. A penetrációs nyílások, a termékenység és a „valódi” termékenység vizsgálatának eredményei

A kontroll csoport (44. ábra) eredményeit az előző kísérletben már ismertettem, mivel ugyanaz volt a kontroll állomány, mint az előző kísérletben, így ebben a részben a kísérleti (mesterséges rátermékenyítés) csoport eredményeit részletezem, valamint azok összevetését a kontroll csoporttal.



44. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a kontroll csoportban

A **45. ábrán** látható, hogy már a termelés 1. harmadában is alacsony volt a spermiumtranszport és ebből adódóan a termékenységi eredmények is. A legintenzívebb spermiumtranszport viszonylag későn, a 40. élethéten jelentkezett, 96-os maximum medián értékkel, majd újra alacsony szinten folytatódott. Így a kontroll csoporttal ellentétben a spermiumtranszport és a termékenység az 1. harmadhoz képest nem csökkent tovább a 2. harmadban, azonban a 3. harmadban a rátermékenyítések ellenére is szignifikánsan ($p \leq 0,01$) romlott. A spermiumtranszport alakulásával párhuzamosan a lámpázási (96,17%) és valódi termékenység (98,09%) is csak későn, a 42. élethéten érte el maximumát. A 45. élethéten kezdett rátermékenyítések hatása csak a ciklus vége felé jelentkezik, az 56. élethéten kezd emelkedni a spermiumkoncentráció a tojások perivitellin membránjában.



45. ábra: A penetrációs nyílások, a termékenység és a valódi termékenység alakulása a kísérleti (mesterséges rátermékenyítés) csoportban

A kezdeti alacsony spermiumtranszportból következően (**12. táblázat**) a kontroll csoport a termelés kezdetén szignifikánsan ($p \leq 0,01$) felülmúlta a rátermékenyítéses csoport termelési eredményeit. A termelés középső harmadában azonban a mediánok görbe alatti terület értékei szerint is a kísérleti csoportban nem hogy csökkent a spermiumtranszport, hanem még növekedett is (1,52%), így itt nem találtunk lényeges különbséget a két csoport között. Ez azonban a termékenységi eredményekben nem mutatkozott meg, mert azok tekintetében a kontroll csoport jobbnak ($p \leq 0,05$) bizonyult. A grafikonon az is látszik, hogy a termelés utolsó harmadában milyen nagymértékben csökkent a tojásokban a spermium mennyisége a kontroll csoporthoz képest. A görbe alatti terület értékek azt mutatják, hogy míg a kontroll csoportban 12,54%-kal csökken a

spermiumtranszport, addig a kísérleti csoportban ez a csökkenés 74,15 %. Így nem meglepő, hogy a termékenységi eredmények is jóval alul maradnak a kontroll csoporthoz képest.

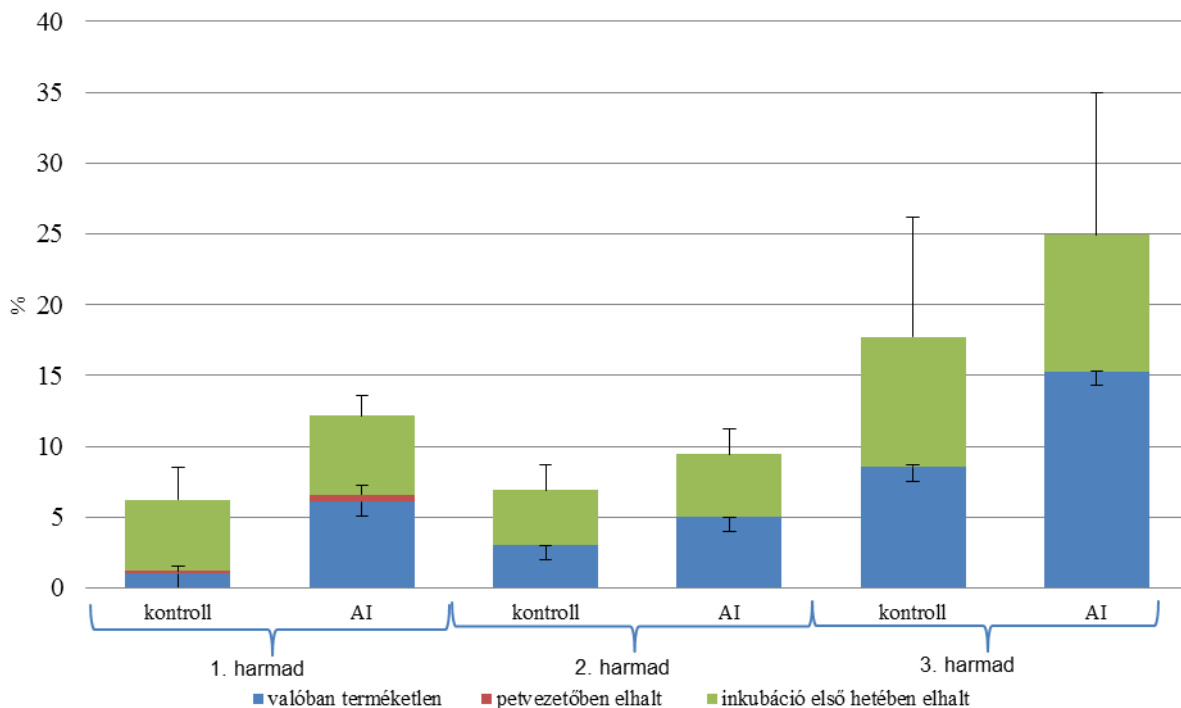
12. táblázat: A penetrációs nyílások medián értékei a termelési ciklus egyes harmadaiban

	1. harmad	2. harmad	3. harmad
kontroll	52a,c	47,5a	36b,e
rátermékenyítés	38a,d	37a	9b,f

A szignifikáns eltéréseket mutató első betűk a csoporton belüli változásokat, míg a második betűk a kontroll csoporthoz viszonyított különbségeket szemléltetik. ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$)

4.6.2. A korai embrionális elhalások vizsgálatának eredményei

A korai embrióelhalások és a „valóban” terméketlen tojások mennyiségének alakulását a **46. ábra** szemlélteti. Az embriót egyáltalán nem tartalmazó tojások mennyiségének alakulása egybeesik a membrán vizsgálatok és a termékenységi eredményekkel.



46. ábra: A „valóban” terméketlen tojások, a petvezetőben elhalt embriók és a keltetés első hetében elhalt embriók megoszlása csoportonként az egyes harmadokban ($\bar{x} \pm SD$)

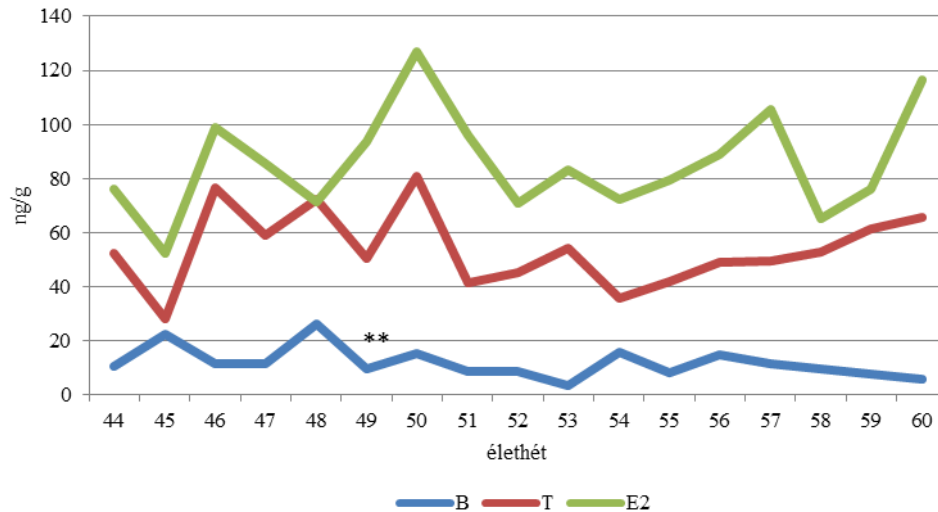
Míg a kontroll csoportban a termelés kezdetén az embrióelhalások fordultak elő nagyobb arányban, a kísérleti csoportban a terméketlen tojások voltak jelen a legnagyobb mennyiségben, valamint az is látszik, hogy a petevezetőben elhalt embriók aránya is viszonylag magas volt (0,5%). A termelés második harmadában, mint azt az előzőekben láthattuk, valamelyest csökkent a terméketlen tojások mennyisége, illetve a petevezetőben elhalt embriók aránya is. A termelési periódus utolsó harmadában mindkét csoportban szignifikánsan nőtt mind a terméketlen tojások mennyisége, mind a keltetés első hetében elhalt embriók mennyisége ($p \leq 0,05$). A két csoportot összehasonlítva azonban az is látszik, hogy az embrióelhalások között nem volt szignifikáns különbség (9,15% vs. 9,63%), míg a mesterséges termékenyítéses csoportban a valóban üres tojások mennyisége közel kétszerese ($p \leq 0,01$) volt (8,54% vs. 15,29%).

Számunkra is meglepő módon a mesterséges termékenyítések nem eredményeztek javulást sem a termékenységet, sem a spermiumok transzportját illetően, annak ellenére, hogy hetente 300-500 millió extra spermiumot juttattunk a tojók petevezetőjébe.

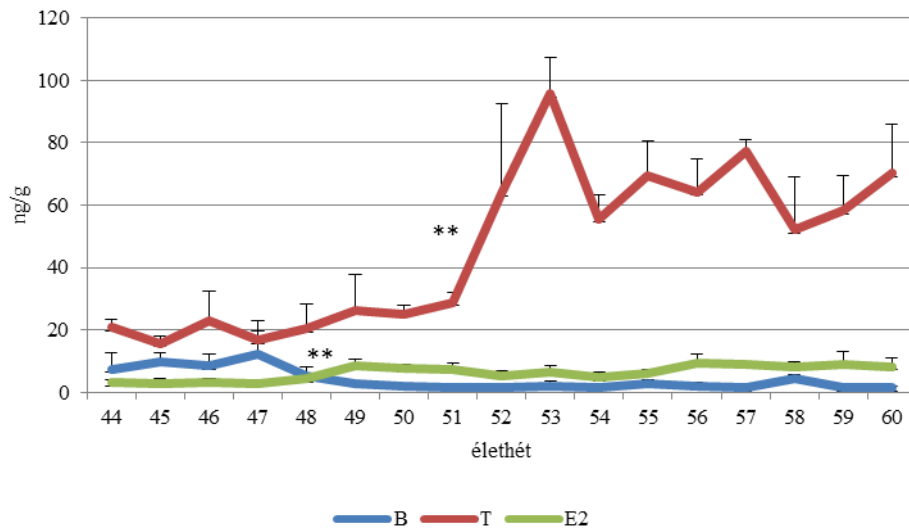
4.6.3. Stresszhormon-vizsgálatok

A mesterséges termékenyítéssel járó procedúrák a tojók esetében feltételezhetően fokozott stresszhatást jelentenek. Ennek ellenőrzésére minden termékenyítést követő-reggel gyűjtöttük a bélsármintákat az állományban, majd meghatároztuk a kortikoszteroid hormon-tartalmakat. Emellett a termékenyítést követő 2. napon friss tojásszék-mintákból meghatároztuk a szteroid koncentráció-változásokat annak tesztelésére, hogy a mesterséges termékenyítés milyen stresszorként fogható fel, mennyi idő kell az állatok adaptálódásához, valamint milyen káros hatásai lehetnek az embriófejlődésre és a tojástermelésre.

A 44. élethéten az alapadatok felvétele céljából gyűjtöttünk bélsár és tojásszék mintákat, majd ahhoz viszonyítottuk a változásokat (**47. és 48. ábra**). Az első rátermékenyítést követő 2. napon láthatunk kortikoszteroid-emelkedést ($p \leq 0,05$), majd a 46.-47. héten nem látszik emelkedés, melynek oka lehet, hogy a termékenyítés után 19 órával történt mintavétel nem volt megfelelő. Az így is kissé emelkedet stresszhormon szint a 49. élethéttől csökkenő tendenciát mutatott, majd egy alacsonyabb szintre állt, de időnként voltak kiugrások, jelezvén, hogy a stressz folyamatos és az idősebb állatok nehezebben alkalmazkodnak hozzá. A tesztoszteroid esetében szintén viszonylag magas értékeket mértünk. Az 50. élethéttől csökkenő, eredetileg magas ösztrogén szint összhangban volt a csökkenő tojástermeléssel.



47. ábra: A bélárban mért kortikoszteron (B), tesztoszteron (T) és ösztrogén (E2) szintek a mesterséges termékenyítés időszakában



48. ábra: A tojásszikben mért kortikoszteron (B), tesztoszteron (T) és ösztrogén (E2) szintek a mesterséges termékenyítés időszakában ($\bar{x} \pm SD$)

Érdekes módon a tojásszikben mért hormon értékek nem ugyanazt a rajzolatot mutatják, mint a bélármintákban. Az eltérés magyarázata lehet, hogy a bélárminták származhattak olyan tojóktól melyek már nem voltak tojástermelésben, hiszen a termelés utolsó harmadában egyre több tojó hagyja abba a tojástermelést. A szikben mért hormonok ezért ebben az esetben pontosabban tükrözhetik a tojót ért stresszhatást. Itt is látható a kortikoszteron szintjének kezdeti emelkedése, míg az ösztrogénszint nagyon alacsony a vizsgált periódusban. A tesztoszteron szintje az 53. élethéttől jelentősen emelkedett, hasonlóan a Se és E-vitamin kísérletben tapasztaltakhoz. A

kiindulási értékhez képest, a növekvő tesztoszteron szint antagonizmusban van a csökkenő kortikoszteron szinttel.

4.7. Új tudományos eredmények

1. Az ivararánnyal történő manipulációk, a kakasfrissítések és a mesterséges termékenyítés kiegészítő alkalmazása nem, vagy csak átmenetileg eredményeztek a termékenységben szignifikáns javulást a termelés kritikus periódusában. Következésképpen nem tudtam igazolni, hogy a drága és munkaigényes kakascseréknek pozitív hatása lenne a termékenységi eredményekre.
2. Elsőként végeztem el a ROSS 308 kakasok ondóminősítését egy teljes termelési ciklus alatt, folyamatos heti vizsgálatokkal. Megállapítottam, hogy az ondó minőségének romlása a termelés utolsó szakaszában nem indokolja a termékenység oly mértékű visszaesését, ami szükségessé tenné akár a kakasok, akár a teljes állomány cseréjét.
3. Igazoltam, hogy a hímivarban a szelено-metionin és az E-vitamin nem csak a spermiumok motilitását, illetve koncentrációját javította szignifikánsan, hanem csökkentette a másodlagos rendellenességek arányát is. Ennek ellenére a szerves szelén és E-vitamin kiegészítés nem eredményezett lényeges javulást a termékenységben, azonban annak embrióvédő hatását kimutattam a szelén tojásszikbe való beépülése révén, ami összefüggésbe hozható a szteroid hormon koncentrációkkal is.
4. Megállapítottam, hogy az életkor előrehaladtával a petevezető spermiumtároló tubulusaiban kifejezett szöveti változások következnek be, amelyek alátámasztják a spermiumtárolás kapacitásának korral járó csökkenését.
5. Az ivarérés kezdetén végzett szintetikus GnRH analóg kezelés (5 mg/kakas/nap) a hímivarban pozitívan hatott spermaminőségre, de ennek nem volt hatása a termékenység perzisztenciájára.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Különböző ivararányok és kakascserék hatásainak elemzése

A Ross 308 szülőpár állományoknál a gyakorlatban általánosan használt módszer a kakasfrissítés, az ún. „spiking” a termékenység növelésének céljából, annak ellenére, hogy a technológiai ajánlásban csak a kakasok létszámának csökkentése szerepel. Korábbi vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a termelők által alkalmazott 17-25 %-os, a termelés 42-44. hetében végzett kakasfrissítések nem eredményezték az állomány termékenységének javulását (*Végi és mtsai., 2007*). Jelen vizsgálatunkban modellszinten kívántuk tesztelni, hogy ha a kakaslétszámot nem csökkentjük a technológiai ajánlások szerint, hanem vagy szinten tartjuk (8 kakas/80 tojó), vagy növeljük (12 kakas/ 80 tojó) ugyanolyan korú kakassal, akkor elkerülhető-e a termékenység gazdaságossági szint alá csökkenése. Emellett vizsgáltuk az „extrém mértékű” kakasfrissítések (50 és 100% kakascseré) hatását is, melyek a gyakorlatban ugyan nem megvalósíthatók a magas költségek miatt, azonban annak igazolására jó, hogy eldönthető legyen a hímivar, illetve a nőivar döntő szerepe a termékenység perzisztenciájának csökkenésében a termelés utolsó harmadában.

Munkánk során sikeresen alkalmaztuk a termékenység monitorozásában a *Staines és mtsai., (1998)* által kidolgozott módszert, mely a spermiumok petesejtbe történő penetrációjára, a belső membránon keletkezett nyílások (*IPVL holes*) mennyiségének vizsgálatán alapul.

Az eredmények alapján, mint arról több szerző is beszámolt korábban (*Bramwell és mtsai., 1996; Hazary és mtsai., 2000; Wishart és mtsai., 2004*), a spermiumtranszport a 30-40. élethét között éri el maximumát, majd ezt követően csökken. A csökkenés hátterében állhat, hogy a spermiumok az életkor előre haladásával gyorsabban ürülnek a spermiumtároló tubulusokból (*Brillard, 2009*), vagy csökken a spermiumok tárolásának képessége, amint azt szövettani vizsgálatainkkal is alátámasztottuk (*Yoshimura és mtsai., 2008; Barna és mtsai., 2009*).

A termelés utolsó, kritikus harmadában csupán két esetben, az 50%-os kakascseré és a kakasok számának növelése esetén értük el a tojókon található spermiumok számának növekedését. Az 50%-os kakascseré esetében ez magyarázható azzal, hogy az etológiai megfigyelések alapján ebben a csoportban volt legmagasabb a párzások száma, a fiatal kakasok jelenléte az öreg kakasokat is több párzásra serkentette. A termékenység azonban nem növekedett a növekvő spermiumtranszport ellenére. A *kakaslétszám növelése* szintén pozitív hatással volt a spermiumtranszportra, ami logikusnak tűnik, de a tenyésztők a tojók kímélése, a kakasok agressziójának csökkentése miatt ezt a gyakorlatot elvetik. Saját vizsgálatunkban nem tapasztaltuk

az agresszió emelkedését, és a tojók „lestrapálását” sem. Viszont a termékenység sem növekedett szignifikánsan a kontrollhoz képest, így ezt a módszert sem javasolhatjuk a gyakorlatnak, jóllehet, olcsóbb megoldás lenne, mint a fiatal kakasok felnevelése.

A kakasok számának szinten tartása esetén nem változott a tojásban a penetrációs nyílások száma és a termékenység sem változott a technológiai kontroll csoporthoz képest. Abban a csoportban, ahol 100%-ban kicseréltük a kakasokat fiatalokra, a termelés indulásakor a legintenzívebb spermiumtranszportot figyeltük meg, ami a létszámcsökkentés ellenére is intenzívnek mutatkozott. A termelés középtáján 100%-ban kicserélt fiatal kakasok ellenére sem tudtuk a 2. és 3. harmadban magas szinten tartani a spermiumszámot a tojásban, így a termékenység is csökkent. A termelés 3. harmadában a 100%-os és az 50%-os kakascseréje esetén nagyobb arányban fordultak elő embrióelhalások, mint terméketlen tojások. Ebből az eredményből arra következtettünk, hogy hiába van több spermium a női nemi utakban a termelés második felében, ez nem tud kellőképpen realizálódni a kelési eredményekben. Következésképp a termékenységi problémákért sokkal inkább a nőivar tehető felelőssé, mint a hímivar, amire korábbi vizsgálatokban már mások is gyanakodtak. Az első ilyen vizsgálatokhoz tartozott *Pierson és mtsai (1988)* munkája, akik Hubbardban kimutatták, hogy 85 hetes korban több spermiumtároló tubulusban mutatható ki spermium, illetve kevesebb az olyan tároló tubulus, amely nem alkalmas a spermiumok tárolására, mint 125 hetes életkorban. Ezt követően az is megállapítást nyert, hogy az életkor előrehaladtával termékeny periódus hosszának rövidülését nem a spermiumtároló tubulusok tároló kapacitásának csökkenése, hanem sokkal inkább a spermiumok felgyorsult ürülése okozza (*Brillard, 1993*). Ezzel ellentétben *Gumulka és Kapkowska (2005)* vizsgálataik alapján azt a következtetést vonták le, hogy a tyúkok korosodásával kevesebb spermium képes raktározódni a petevezetőben és ez a lehetséges oka a termékenység csökkenésének. *Bramwell és mtsai (1996)* Arbor Acres húshibriddel folytatott kísérleteik során a fiatal tyúkokat öreg kakasokkal termékenyítve több IPVL hole-t találtak a tojásokban, mint amikor öreg tyúkokat, fiatal kakasokkal, azonos mennyiségű spermiummal termékenyítettek. Ebből következően már ekkor kérdésessé vált a kakascserék szükségessége. (*Pierson és mtsai., 1988; Brillard, 1993; Bramwell és mtsai., 1996; Gumulka és Kapkowska, 2005*).

Javaslatok a kakasfrissítéssel kapcsolatban

Amennyiben egy telep mindenképpen ragaszkodik a kakasfrissítés gyakorlatához, akkor a frissítés időpontjáról, illetve arányáról istállónként érdemes dönteni. Az eredmények alapján azonban láthattuk, hogy a magasabb spermiumtranszport nem biztos, hogy a kelési mutatókban is realizálódik. Az általunk is használt tojás szikmembrán vizsgálatokkal, a spermiumok által képzett

penetrációs nyílások számolásával kb. 6-8 héttel előre jelezhető a lámpázási termékenység csökkenése. Friss tojások ismételt vizsgálatával meghatározható, hogy mikorra várható a lámpázási termékenység csökkenése. Vizsgálatainkból tudjuk, hogy a fiatal kakasok állományba helyezését követően kb. 3 héttel jelentkezik a spermiumtranszport növekedése, ennyi idő kell a fiatal kakasok beilleszkedésére, megerősödésére és az új háremek kialakulására. Ezek alapján tehát pontosan meghatározható a kakasfrissítések időpontja. Tapasztalataink szerint egy átlagos termelésű állományban a spermium mennyisége a tojásban a 40. élethétől kezd csökkenni, tehát kb. a 48. héten lehet számítani a lámpázási termékenység csökkenésére. Így ha a 46. héten frissítünk – minimum (!) 30% - fiatal kakassal, akkor az 51. héttől számíthatunk növekvő spermium mennyiségre és ezzel a lámpázási termékenység csökkenését valamennyire lassíthatjuk. Viszont, ha ki akarunk tartani a 60. hétig 80-85% fölötti keléssel, akkor jobb, ha csak az 50. héten frissítünk fiatal kakasokkal. Ennek igazolására érdemes lenne további teszteléseket végezni, mivel munkánk során minden variációt nem volt lehetőségünk megvizsgálni.

A gyakorlatban alkalmazott 15-25%-os frissítéseknek, melyeket mindig a 44. hét előtt végeznek, semmi haszna nincsen. Egyértelmű, hogy nem érdemes a 48. hét előtt frissíteni egy átlagos állományban.

5.2 A hímivarra irányuló vizsgálatok eredményeinek elemzése

Az ondóminőség javítására két módszert vizsgáltunk, egyrészt szelено-metionin (0,3 mg/takarmány kg) és E-vitamin (200 mg/kg) tartalmú takarmány-adalékok etetését, másrészt a szintetikus GnRH analóg intramuscularis applikálását a maturáció kezdetén 1 hét leforgása alatt 3 alkalommal.

A teljes termelési ciklus során heti gyakorisággal végzett kontroll ondóvizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a ROSS 308 hibrid esetében a spermiumok koncentrációja a 40-45. élethetek között, míg az élő, ép morfológiájú sejtek aránya a 42-47. élethetek között nagymértékben csökkent. Ez a csökkenés azonban csak átmeneti volt és az 50. élethetet követően újra magasabb értékeket detektáltunk. Ettől eltérnek *Fragoso és mtsai-nak (2012)* eredményei, akik Cobb 500-as hibriddel végzett kísérleteik során azt találták, hogy a spermium produkció a 36. élethétig növekszik, majd ezt követően folyamatosan csökken. *Gumulka és mtsai (2005)* által végzett kísérletben az ejakulátum mennyisége és a spermium koncentráció mintegy 15,7 %-kal csökkent az életkor előrehaladtával Arbor Acres húshibridnél. Korábbi saját vizsgálataink is igazolták, hogy a genetikailag eltérő fajták, illetve hibridek ondótermelő képessége és ondójuk minősége eltérhet egymástól, valamint annak befolyásolhatósága is különbözhet (*Végi és mtsai., 2007*). Eredményeink

azonban a ROSS 308 hibridnél azt mutatják, hogy a termelés utolsó harmadában nem csökkent az ondó mennyisége, sőt csekély mértékben még növekedett is, valamint a spermiumkoncentráció is csak 8,4%-kal csökkent átlagosan. Ennek alapján nem állítható az ondó minőségének oly mértékű romlása, mely indokolná a termékenység nagymértékű csökkenését a termelési ciklus előrehaladtával.

Számos vizsgálat igazolta, hogy a szelén hiánya esetén csökken a spermiumok motilitása és növekszik az abnormális sejtek aránya különböző (Wu és mtsai. 1979; Surai és mtsai., 2006; Sanches-Gutierrez és mtsai., 2008). Hosszantartó hiánya károsan hat a spermium koncentrációra és a termékenyítőképességre (Edens és Sefton, 2009). Edens (2002) a Hubbard hibridnél kimutatta, hogy a szelén hatására növekedett az élő, ép sejtek mennyisége és egyes morfológiai rendellenességek aránya csökkent. Saját kísérletünkben a szeleno-metionin E-vitaminnal együtt alkalmazva képes volt a ROSS 308 kakasok spermaminőségét a termelési ciklus teljes hosszában a kezdeti magas szinten tartani, ellentétben a Hubbard kakasokkal, ahol az eredetileg is jó minőségű sperma paramétereit már nem tudta a szerves Se és E vitamin kiegészítés tovább javítani (Végi és mtsai., 2007). A szeleno-metionin és E-vitamin hatására a kontroll mintákhoz képest szignifikánsan javult a motilitás, a koncentráció és az élő, ép sejtek aránya. A másodlagos rendellenességek mennyisége csökkent, azaz ellenállóbbá váltak a spermiumok a külső behatásokkal szemben. A szövettani vizsgálatok eredményei alátámasztották a spermiogenezis intenzitásának növekedését is.

A szintetikus GnRH analógok közös tulajdonsága a nagy receptorkötődési affinitás, amely a nem szintetikusnál hosszabb hatást eredményez és így a gonadotrop hormonok erőteljesebb felszabadításával és magatartás-élettani hatásukkal alkalmasak szaporodási hipofunkciók kezelésére (Myamoto és mtsai, 1983; Skarin és mtsai., 1984). Korábbi irodalmi adatok szerint GnRH implantátum beültetésével törpepapagáj fajban is növelni tudták a szexuális aktivitást és a termékenységet (Costantini és mtsai., 2009). Alavi és mtsai. (2012) kecskében a spermiumok motilitását tudák növelni GnRH kezeléssel. Emlős fajokban eltérő eredményeket produkált a GnRH kezelés, Kawakami és mtsai. (2012) kutyában terápiás céllal alkalmazták a GnRH-t, melynek hatására növekedett a spermiumkoncentráció és a motilitás. Boyle és mtsai. (1991) azonban pónilóban a GnRH kezelés hatására nem találtak szignifikáns különbséget sem a spermaminőségben, sem a libidóban. Eddig a hústípusú hibridekben nem vizsgálták, hogy a GnRH kezelés milyen hatással van a sperma minőségére és ezen keresztül a termékenységi mutatókra, valamint a szexuális viselkedésre. Megállapítottuk, hogy a GnRH kezeléssel akkor tudunk pozitív hatást elérni a spermamutatókra, ha azt az ivarérés egy adott, kezdeti fázisában, egy szűk periódusban végezzük el, melynek meghatározása alapos körültekintést igényel, de a külső ivari

morfológiai jegyek alapján megítélhető. Ez hústípusú szülőpárok esetén többnyire a 21-23. élethét között van. Természetesen a maturáció beindulásának időpontját a felnevelési és az azt követő tartási, takarmányozási körülmények erősen befolyásolhatják. Az egyedi kakasvizsgálatoknál beigazolódott, hogy a szintetikus GnRH analóg alkalmazása az adott koncentrációban és gyakorisággal, a maturáció kezdeti időszakában képes befolyásolni a sperma minőségét, ami magasabb spermium-koncentrációban és jobb spermium-motilitásban nyilvánult meg. Ha a maturáció későbbi időpontjában, vagy az ivarérett korban alkalmazzuk a beavatkozást, ez a pozitív hatás nem, vagy csak csekélyebb mértékben tud érvényesülni. A hormonális beavatkozás következtében emelkedett kortikoszteronszintnek a spermiogenezisre kifejtett negatív hatásával magyarázhatjuk, hogy a minden szempontból legjobban produkáló csoportban (*GnRH1*) a spermium-rendellenességek összességében és azon belül az elsődleges, herei eredetű spermium-rendellenességek magasabb arányban jelentkeztek.

Javaslatok a hímivar teljesítményének javítására

A szerves szelén (szeleno-metionin) és E-vitamin tartalmú takarmány-adalékok használatát az adott koncentrációban indokoltnak tartjuk mind a felnevelési, mind a termelési időszakban, mert vitathatatlan jótékony hatása a spermiogenezisre. Amennyiben van érdeklődés a gyakorlat részéről, érdemes lenne nagy létszámú állományon tesztelni a GnRH alkalmazását a kakasokon és kedvező tapasztalatok esetén megfontolni alkalmazását a kakasfrissítések kiváltására.

5.3. A nőivarra irányuló vizsgálatok eredményeinek elemzése

Az eddigi kutatások szerint a szerves szelén és E-vitamin nem csak a termékenységet növeli, hanem annak hosszát is (*Agate és mtsai., 2000; Breque és mtsai., 2003; Surai és mtsai., 2006*). Az is megállapítást nyert, hogy a tojásban a szelén nagy része szeleno-metionin formájában van jelen és az embrió nem tudja előállítani (*Surai és mtsai., 2006*). Ebből is következik a szelén jelentősége a takarmányban, kiemelve, hogy hatékonyan csak a szerves szelén tud beépülni a tojásba. *Renema (2004)* munkája során Ross 508 hibridnél azt az eredményt kapta, hogy a 22. élethéttől alkalmazott szerves szelén kiegészítést követően a tojástermelés a 49 és 58. élethetek között mintegy 8%-kal magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. Azt is megállapította, hogy növekedett az IPVL-hole mennyisége, azaz a spermiumszám a tojásban, míg a késői embrióelhalások a csúcstermelést követően csökkentek a szelén csoportban.

Eredményeink alapján a 20. élethétől alkalmazott szerves szelén és E-vitamin hatására nem javult a tojástermelés, sem a termékenység és nem volt több spermium a tojásban. Pozitív hatása abban nyilvánult meg, hogy a termelés utolsó harmadából származó tojásoknál az inkubáció első hetében elhalt embriók aránya szignifikánsan alacsonyabb és a termékeny tojásokra vetített kelési % szignifikánsan magasabb volt a kezelt csoportban. Ismert, hogy az elhalt embriókat tartalmazó tojásszikben megemelkedett kortikoszteron koncentrációt lehet mérni, ami gátolja az embriófejlődést (*Biczó, és mtsai., 2004; Janczak és mtsai., 2006; Ferencziné Szőke, 2008*). Ez munkánk során is beigazolódott, azonban ezt az embriókárosító hatást bizonyos mértékig kompenzálni tudta a tojás szeleno-metionin és E-vitamin tartalma.

Már korábban kimutatták, hogy a tojókkal etetett szerves szelén nem csak a tojásban jelenik meg, hanem a kikelt napos állatok szöveteiben is és az ilyen állományokban alacsonyabbak voltak az elhullási eredmények a szelént nem fogyasztó kontroll állatokhoz képest (*Surai és Fisini, 2012*). Várhatóan ezen állományok a későbbiekben is magasabb teljesítményre képesek.

A spermiumtároló tubulusok differenciálódását és felépítését az ivaréérés alatt, már részletesen tanulmányozták (*Bakst, 1992; Holm és mtsai., 2002*). Az is bizonyított, hogy a tojók spermiumtároló képessége függ azok életkortól (*Bakst és mtsai., 1994*). Tudomásunk szerint eddig nem áll rendelkezésünkre olyan eredmény, mely a spermiumtároló tubulusok szerkezeti változását vizsgálja az életkor előrehaladtával.

Kutatásaink igazolták, hogy a petevezető morfológiája a termelési ciklus során jelentős változásokon megy keresztül, melynek a vizsgálataink szempontjából lényeges része, hogy a spermiumraktározó tubulusok a ciklus 54-60. hetében kitágulnak, lazább szerkezetűek lesznek és sokukban nagyobb mennyiségű szekrétum halmozódik fel. Ez arra utalhat, hogy a tojók korosodásával nem csak a spermium-ürülés gyorsul fel a tubulusokból, mely irodalmi adatokból ismert (*Brillard, 1993*), hanem azok befogadó- és tárolóképessége is csökken. Ez lehet az egyik magyarázat arra, hogy hiába növeljük a ciklus végén a spermiumszámot, azoknak csak kis hányada képes berakódni a petevezető raktározó csövecskéibe.

A GnRH kezelés hímivarra gyakorolt pozitív hatását csoportos, termelési kísérletben is vizsgáltuk. A 21. élethétén végzett kezelés hatására a csoport gyengébb spermiumtranszportja fokozódott ugyan, de ez a termékenységi eredményekben nem mutatkozott meg. Feltételezésem szerint ennek oka, hogy a kakasok „ivari minőségének” javítása önmagában nem elegendő a termékenység növeléséhez, a tojó szerepe fontosabbnak tűnik. A GnRH kezelés hatása a pázások számának növekedésére sem állítható egyértelműen, mert nem minden megfigyelt időpontban

jelentkezett magasabb párzási kedv. A kontroll csoportban a 44. élethéten volt a legalacsonyabb a párzások száma, míg a kezelt csoportban ez a mélypont nem jelentkezett, tehát a GnRH ezen a szinten mégis éreztette pozitív hatását. Ez a különbség a következő heti spermiumtranszportban meg is mutatkozott, ami a termékenységekben 2%-os javulást eredményezett, de csak átmenetileg és a termelési ciklus utolsó harmadában nem realizálódott magasabb termékenységi eredményekben.

A termelési ciklus előrehaladtával a spermiumtároló tubulusok ürülése felgyorsul (*Brillard, 1993*), amiből arra következtetünk, hogy a termékenység fenntartásához több spermiumra van szükség. Ezért feltételeztük, hogy a mesterséges termékenyítés kiegészítő alkalmazásával fokozható a raktározó tubulusokban tárolódó spermiumok mennyisége, így biztosítva a tojások termékenységét. Jóllehet, *McCartney és Brown (1976)* a legmagasabb termékenységi eredményeket akkor kapta, amikor a természetes párzást mesterséges termékenyítéssel kombinálta, a mi kísérletünkben a mesterséges termékenyítés kiegészítő alkalmazása nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket. A spermiumszámot nem hogy növelni nem tudtuk, hanem radikálisan csökkent és ezzel párhuzamosan a termékenységi eredmények is. A hormonvizsgálatok során megállapítottuk, hogy ez a munkafolyamat igazolható stresszt okozott az állatokban. Az már korábban bizonyított, hogy az anyát ért stresszhatás következtében megemelkedik a tojásszikkortikoszteron tartalma, ami magasabb embriómortalitást okoz (*Biczó, és mtsai., 2004; Janczak és mtsai, 2006; Ferencziné Szőke, 2008*). A mi vizsgálatunkban összességében nem csak az embrió mortalitás növekedett meg, hanem azoknak a tojásoknak az aránya is, amelyek egyáltalán nem tartalmaztak embriót. *Koohpar és mtsai (2010)* összehasonlítva a természetes párzást a mesterséges termékenyítéssel, nem kaptak magasabb termékenységi és kelési eredményeket, amit ők is a termékenyítés során fellépő stresszhatásnak tulajdonítottak. Feltételezhető az is, hogy a magas kortikoszteron szint befolyással van a spermiumok tároló tubulusokba való berakódására, illetve kiáramlására. Természetesen e feltételezés bizonyításához újabb vizsgálatok szükségesek. Azt is érdemes lenne tovább vizsgálni, hogy a szerves szelén és E-vitamin stresszvédő funkciója által képes-e kompenzálni a káros hatásokat.

Javaslatok a nőivar teljesítményének javítására

Minden eredményünk arra utal, hogy a csökkent szexuális funkciókat sokkal könnyebb befolyásolni a hímivarban különböző módszerekkel (szelén-metionin, E vitamin, GnRH kezelések), és sokkal könnyebb azokat vizsgálni. Azonban – jelen vizsgálataink szerint - ezek önmagukban nem elegendőek a termékenység szignifikáns javításához.

A szerves szelén és E-vitamin tartalmú takarmány-adalékok használatát a hímivarhoz hasonlóan javasoljuk nem csak a szülőpár állományok termelési időszakában, hanem már a felnevelés alatt is.

Egyértelműen bebizonyosodott, hogy hústípusú szülőpároknál a mesterséges termékenyítés kiegészítő alkalmazásának – elsősorban a stressz hatások miatt – számos negatív vonzata van. A heti egy alkalommal végzett tortúrához – tojók elrekesztése, összeszedése, kloaka kifordítása, inszeminálás – nem tudtak hozzászokni a madarak, így alkalmazása nem javasolt.

A csoportvizsgálatokban a GnRH korábbi spermatológiai vizsgálatoknál tapasztalt pozitív hatása nem tudott érvényesülni. Anyagi források hiányában nem tudtuk megismételni a kísérletet nagyobb állományon, de ezzel nem zárjuk ki a lehetőségét annak, hogy ez a fajta beavatkozás segíthet a termékenység perzisztenciájának növelésében.

Az összes elvégzett vizsgálatunk arra utal, hogy a termelési ciklus utolsó harmadában bekövetkező termékenységcsökkenésért döntően a nőivar szaporodás-élettani funkcióinak gyengülése a felelős. Ennek befolyásolása külső hatásokra, mint a takarmányozási, a hormonális, vagy a spermatológiai beavatkozások, nem megvalósítható. Véleményünk szerint a szaporaság perzisztenciájának növelésére az egyetlen lehetőség a genetikai szelekciós munka, amely spermium tárolásért felelős tubulusok számának, tárolókapacitásának, befogadóképességének növelésére irányul.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A világ népességének növekedése és így a fokozott húsigeny maga után vonja a brojler szülőpár állományok számának növelését és termelésük fokozását. A testsúlyra történő intenzív szelekció, az egyes fajtáknál eltérő mértékben, de negatívan hatott a szaporodásbiológiai mutatókra (Reddy és Sadjadi, 1990; Brillard, 2009). A húshibridek tartástechnológiái 61-64 hetes életkorig ajánlják az állományok termelésben tartását, azonban az utóbbi években a termékenységi problémák miatt sok esetben gazdaságtalan az állományok fenntartása az ajánlott életkorig. A termelő cégek által – kényszermegoldásként – alkalmazott kakascseré a termelés közepe táján rendkívüli módon megnöveli az előállítási költségeket, feltételezhetően distresszt okoz, ami a termelés csökkenését eredményezi, ráadásul eredményessége is megkérdőjelezhető. Célunk volt olyan kutatások végzése, melyek arra irányulnak, hogy milyen módszerekkel lehet fenntartani az állományok termékenységét hosszú távon, illetve melyek tisztázzák, hogy melyik ivar felelős a termékenység hanyatlásáért.

Első lépésként a különböző ivararányok és kakascserék hatását vizsgáltuk a termékenységre. Ezekben a kísérletekben különböző ivararányokban állítottunk be csoportokat, így a kakasok létszámának hatását vizsgáltuk. A kakasok életkorának befolyását különböző korban és arányban fiatal kakasok betelepítésével (kakasfrissítés, spiking), a „ráúnás” tényét két csoport között a kakasok kicserélésével teszteltük.

Második lépésként a szerves szelén és E-vitamin hatását vizsgáltuk a hímivarban. A kísérleti csoportba tartozó kakasok a takarmányban 0,3 mg/kg szeleno-metionint (*Sel-Plex[®]*, Alltech Ltd.) és 200 mg/kg E-vitamint (*Lutavit E 50 S*, BASF), a kontroll csoportba tartozó állatok a premixekben szokásos szerves szelént (nátrium-szelenát 0,2 mg/kg) és 100 mg/kg E-vitamint kaptak. A spermatermelés és a spermaminőség alakulását heti egy alkalommal vizsgáltuk, a termelési ciklus teljes tartama alatt. A szaporodási ciklus lezárásakor here mintákat gyűjtöttünk szövettani vizsgálatra. A szerves Se és E-vitamin hatását csoportos kísérletekben is vizsgáltuk. A termelési paraméterek nyomon követése mellett a petevezetők uterovaginális és infundibuláris szakaszából szövettani mintákat gyűjtöttünk. A szerves szelén stressz-védő szerepének ellenőrzésére szteroid analízist is végeztünk bélsár és tojásszék mintákból.

Következő lépésként a hímivarban a termelési ciklus második felében jelentkező spermaminőség-romlás mérséklésére, valamint a csökkent libidó emelésére szintetikus GnRH (*Ovurelin inj.*, Reanal) készítménnyel történő kezelést végeztünk a maturáció szenzitív szakaszában, 3 különböző időpontban. Az ondó minősítése során meghatároztuk a mennyiségét, a spermiumok koncentrációját, motilitását, az élő-ép, a morfológiailag rendellenes és az elhalt sejtek

arányát. A szintetikus GnRH előkészítés hatását csoportos kísérletben is ellenőriztük, melynek során a termelési paraméterek rögzítése és a tojásvizsgálat (PSPA) mellett etológiai megfigyeléseket is végeztünk.

Szükségesnek tartottuk a mesterséges termékenyítés kiegészítő hatásának vizsgálatát, mint lehetséges módszert a spermiumszám és ezzel a termékenység növelésére. A kiegészítő termékenyítéseket a tojók 45. élethétben kezdtük, fiatal kakasok spermájával hetente 1 alkalommal. Vizsgáltuk a termelési paramétereket, a termékenyítéssel járó stressz hatását, valamint a tojók petevezetőjében a spermiumpopuláció változását (PSPA).

A kakas manipulációk során a termelés utolsó, kritikus harmadában csupán két esetben, az 50%-os kakascseré és a kakasok számának növelése esetén értük el a tojáson található spermiumok számának növekedését. Azonban a termékenység - a növekvő spermiumtranszport ellenére - nem emelkedett. Az ondóvizsgálatok eredményei a ROSS 308 hibridnél azt mutatják, hogy az ondó minősége nem romlik olyan mértékben, mely indokolná a termékenység nagymértékű csökkenését a termelési ciklus előrehaladtával. A szerves Se és E-vitamin hatására szignifikánsan javult a spermiumok motilitása, koncentrációja és az élő, ép sejtek aránya. A nővarban a 20. élethétől alkalmazott szerves szelén és E-vitamin hatására nem javult a tojástermelés, sem a termékenység és nem volt több spermium a tojásban. Kutatásaink igazolták, hogy a petevezető morfológiája a termelési ciklus során jelentős változásokon megy keresztül, melynek során a spermiumraktározó tubulusok a ciklus 54-60. hetében kitágulnak, lazább szerkezetűek lesznek és sokukban nagyobb mennyiségű szekréta halmozódik fel. Ezekre a változásokra a szelén és E vitamin kiegészítésnek nem volt hatása. Az egyedi kakasvizsgálatoknál beigazolódott, hogy a szintetikus GnRH analóg alkalmazása az adott koncentrációban és gyakorisággal, a maturáció kezdeti időszakában képes javítani a sperma minőségét, ami magasabb spermium-koncentrációban és jobb spermiummotilitásban nyilvánult meg. A GnRH kezelés hímivarra gyakorolt pozitív hatása a csoportos kísérletek termékenységi eredményeiben azonban nem mutatkozott meg. A mesterséges termékenyítés kiegészítő alkalmazása nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket. A beavatkozás jelentős stresszt okozott az állományban, csökkent a tojástermelés és a spermiumszám a tojásokban, valamint ezzel párhuzamosan a termékenységi eredmények is.

Eredményeinkből azt a következtetést vontuk le, hogy a termelési ciklus utolsó harmadában bekövetkező termékenység-csökkenésért döntően a nőivar szaporodás-élettani funkcionak gyengülése a felelős, mivel a hímivar pozitív befolyásolása ellenére a termékenység csökkenését nem tudtuk befolyásolni. Véleményünk szerint a szaporaság perzisztenciájának növelésére genetikai szelekciós munkával lenne esély, amely a spermium tárolásért felelős tubulusok számának, tárolókapacitásának, befogadóképességének növelésére irányul.

7. SUMMARY

The huge demand for poultry meat - caused by the growing world population - requires an increase in the number of broiler breeder parent stock, as well as enhancement of their production. The main goal is to maximise the enormous growth potential of the bird, however the selection for body weight correlates negatively with reproductive parameters, usually in different rates in various breeds (*Reddy and Sadjadi, 1990; Brillard, 2009*). The various breeding manuals suggest the maintaining of the broiler breeder flocks until 63-67 weeks of age, although the decline in fertility begins much earlier, therefore the production is uneconomical. In the practice different “spiking” techniques are used in the middle of the production period, which increases costs and presumably causes distress as well, hence the success of this method is questionable. Our aim was to investigate various possibilities for maintaining the fertility of broiler breeders for longer period, moreover to clarify the responsibility of sexes in fertility decrease.

The first step of the study was to exam the effect of different sex ratios and spikings on sperm transport and fertility. Experimental groups with various sex ratios were created in order to analyse the effect of the number of cockerels. The influence of the roosters’ age was checked by replacing “old” cockerels by young ones at different ratios and ages (spiking). Additionally, decreasing cockerels’ interest in females was tested with complete changing of males between two flocks. As a second step the effect of selenomethionine and vitamin E was examined first in males, then in both sexes. In the experimental group the food was supplied with 0,3 mg/kg selenomethionine (*Sel-Plex[®], Alltech Ltd.*) and 200 mg/kg vitamin E (*Lutavit E 50 S, BASF*), while in control group inorganic selenium (0,2 mg/kg) and 100 mg/kg vitamin E. The sperm production and sperm quality were analysed once a week during the whole production cycle. For histological examination, testes samples were collected at the end of reproduction period. Thereafter the effect of additional organic selenium and vitamin E was examined in breeding flocks too. Above the monitoring of reproduction parameters samples were collected from the uterovaginal and infundibular segment of the hens’ oviducts for histological examination. The protecting role of selenomethionine against stress was examined with hormone analyses of faeces and egg yolks. As a next step, synthetic GnRH (*Ovurelin inj; Reanal*) treatments were carried out in the early maturation period of the roosters to decrease the presumed decline of sperm quantity and quality, as well as to increase the males’ libido in the second half of reproduction cycle. We determined the quantity, concentration and motility of sperm and the ratio of live-intact, abnormal and dead spermatozoa as well. The effect of synthetic GnRH treatment was also tested in flock experiment, where besides the monitoring of production parameters and sperm penetration, behavioural

observation was also carried out. To test the effect of extra artificial inseminations (AIs) in the naturally mating flock, as a possible method to increase the number of spermatozoa and the fertility seemed to be important. The additional AI started at 45 weeks of age with sperm of young cockerels once a week. The production parameters, the effect of stress provoking by AI and the change of the sperm population in the oviduct were examined as well.

In the experiment of the manipulation of number of cockerels the increasing number of spermatozoa in the eggs was found only in two cases: in group where 50 % of cockerels were replaced with young ones, and where the number of cockerels was increased. However, in spite of the increased sperm transfer higher fertility was not found in either of the two groups. In the case of ROSS 308 hybrid, the decay in sperm quality during the reproduction period was not so significant that it could explain the huge fertility reduction in the advanced period of the production cycle. As an effect of selenomethionine and vitamin E the motility, the concentration and the ratio of live and intact cells were significantly higher. In females the selenomethionine and vitamin E given from the 20th weeks of age did not have positive effect either on the egg production, or on the fertility, or on the sperm number in the egg. The histological examination of the infundibular and UVJ region of the oviduct proved, that there are remarkable changes in the structure of the sperm storage tubules during the production period. Between 54th-60th weeks of the cycle the sperm storage tubules (SSTs) play, have loose structure, and many of them accumulate large quantity of amyloid-like secretion. The added selenomethionine and vitamin E had no effect on these changes. It was proved, that applying of synthetic GnRH analogous at the beginning of the maturation of cockerels in the given concentration and frequency, is able to improve significantly the sperm quality in the later production period (higher sperm concentration, better motility). However, the positive effect of the GnRH pre-treatment of males in group experiment was not found. The additional artificial insemination had no positive effect either; conversely, it caused observable stress in the flock. The number of spermatozoa in the eggs dropped significantly together with the fertility.

The findings led us to the conclusion that the shortened persistency of fertility in broiler breeders is a function of the females rather than the males, because despite the improvement of males' function by several ways, we were not able to increase the fertility in the late production period. The possibility to prolong the persistency of fertility seems to be such kind of genetic selection which tends to the number of sperm storage tubules, and/or to the storage capacity and receptivity of the SSTs in the oviduct.

8. IRODALOMJEGYZÉK (1. SZÁMÚ MELLÉKLET)

1. **Agate, D.D., O’Dea, E.E., Rustad, M.E. (2000):** Effects of dietary selenium on laying hen fertility as assessed by the perivitelline sperm hole assay. Proceedings of the Poultry Research and Production Symposium, Alberta Poultry Research Centre, pp.1-4.
2. **Aire, T.A. (2003):** Ultrastructural study of spermiogenesis in the turkey, *Meleagris gallopavo*. Br. Poult. Sci. 44: 674-682.
3. **Aire, T.A. (2007a):** Spermatogenesis and testicular cycles. p. 281. In: Jamieson, B.G.M. (Ed.): Reproductive biology and phylogeny of birds: Phylogeny, morphology, hormones, fertilization. Enfield, NH: Science Publishers 2007. pp. 609.
4. **Aire, T.A. (2007b):** Anatomy of the testis and male reproductive tract. p:46-53. In: Jamieson, B.G.M. (Ed.): Reproductive biology and phylogeny of birds: Phylogeny, morphology, hormones, fertilization. Enfield, NH: Science Publishers 2007. pp. 609.
5. **Alavi, S.M., Hatéf, A., Mylonas, C.C., Gela, D., Papadaki, M., Rodina, M., Kašpar, V., Pšenička, M., Podhorec, P., Linhart, O.(2012):** Sperm characteristics and androgens in *Acipenser ruthenus* after induction of spermiation by carp pituitary extract or GnRH α implants. Fish Physiol Biochem. 2012 Dec;38(6):1655-66. doi: 10.1007/s10695-012-9662-9. Epub 2012 Jun 5.
6. **Allen, T.E. and Grigg, G.W. (1958):** Sperm transport in the fowl. Australian J.l of Agricult. Research 8: 788–799.
7. **Ashizawa, K., Masazumi, S. and Okauchie, K. (1989):** Stimulation of the motility and oxygen consumption of fowl spermatozoa by bicarbonate at 40 °C. Anim. Reprod. Sci. 21: 301-308.
8. **Ashizawa, K., Hashiguchi, A. and Tsuzuki, Y. (1992):** Intracellular free Ca²⁺ concentration in fowl spermatozoa and its relationship to motility and respiration in spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 96: 395-405.
9. **Astheimer, L.B., Buttemer, W.A., Wingfield, J.C. (1994):** Gender and seasonal differences in the adrenocortical response to ACTH challenge in an arctic passerine, *Zonotrichia leucophrys gambelii*. Gen. Comp. Endocrinol. 94(1): 33-43.
10. **Bakst, M.R. and Howart, B. (1977a):** The fine structure of the hen’s ovum at ovulation. Biol. of Reprod. 117: 361-369.
11. **Bakst, M.R. and Howarth, B. (1977b):** Hydrolysis of the Hen’s perivitelline layer by cock sperm in vitro. Biol. of Reprod. 17: 370-379.
12. **Bakst, M.R. (1985):** Zinc reduces turkey sperm oxygen uptake in vitro. Poult. Sci. 64: 564-566.

13. **Bakst, M.R. and Richards, M.P. (1985):** Concentrations of selected cations in turkey serum and oviductal mucosae. *Poult. Sci.* 64: 555-563.
14. **Bakst, M. R. (1992):** Observations on the turkey oviductal sperm-storage tubule using differential interference contrast microscopy. *J. Reprod. Fertil.* 95:877–883.
15. **Bakst MR, Wishart GJ, Brillard JP. (1994):** Oviducal sperm selection, transport, and storage in poultry. *Poult. Sci. Rev.* 1994;5:117-143.
16. **Bakst, M. R. (1994):** Fate of fluorescent stained sperm following insemination: New light on oviducal sperm transport and storage in the turkey. *Biol. Reprod.* 50:987–992.
17. **Bakst, M.R. (2003):** Oviductal sperm storage in turkeys: The infundibulum as a secondary sperm storage site, or is it? Pp. 447-450. In A. egakis, S. Sfenthourakis, R. Polymeni and, Thessalou-Legaki (eds), *The New Panorama of Animalvolution. Proceedings XVIII International Congress of Zoology*, Athens, Greece, Pensoft Publishers, Sophia-Moscow.
18. **Bakst, M.R., Donoghue, A.M., Yoho, D.E., Moyle, J.R., Whipple, S.M., Camp, M.J., Liu, G.Q. and Bramwell, R.K. (2010):** Comparisons of sperm storage tubule distribution and number in 4 strains of mature broiler breeders and in turkey hens before and after the onset of photostimulation¹. *Poult. Sci.* 89: 986-992.
19. **Barna, J. (1999):** Examination of some physical and chemical factors affecting the motility and storage of fowl spermatozoa. Doctoral thesis. 1999. Pannon University of Agricultural Science, Faculty of Animal Breeding, Kaposvár, Hungary
20. **Barna, J., Vegi, B., Varadi, E., Szöke, Zs. and Peczely, P. (2009):** Studies related to fertility in broiler breeders. XXI. International Poultry Symposium PB WPSA, Wroclaw-Szklarska Poreba, Poland September pp, 18-23.
21. **Bausek, N., Waclawek, M., Schneider, W.J., and Wohrlab, F. (2000):** The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver. *J. of Biol- Chem.* 275: 28866-28872.
22. **Bausek, N., Ruckebauer, H.H., Pfeifer, S., Schneider, W.J. and Wohrlab, F. (2004):** Interaction of sperm with purified native chicken ZP1 and ZPC proteins. *Biol. of Reprod.* 71: 684-690.
23. **Beck, J.R. (1991):** Understanding and minimizing stress in broilers and broiler breeders. *Zootecnica International XIV(3):* 30-38.
24. **Bellamy, S.J. and Kendall, M.D. (1985):** The ultrastructure of the epithelium of the ductuli efferentes testis in the common starling (*Sturnus vulgaris*). *J. of Anat.* 140: 189-203.
25. **Beuving, G., Vonder, G.M. (1978):** Effect of stressing factors on corticosterone levels in the plasma of laying hens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 35(2): 153-9

26. **Biczó A., Szőke Zs., Péczely P (2004):** Handling stressz és éter-inhaláció hatásai Gyöngyös tojók endokrin és szaporodási paramétereire. In: Összefoglalók, X. Ifjúsági Tudományos Fórum, Keszthely, 2004. április 29. [CD:/Allatelettan_Takarmanyozastan/204.pdf]
27. **Bijlsma, R., and V. Loeschke. (2005):** Environmental stress, adaptation and evolution: An overview. *J. Evol. Biol.* 18:744–749.
28. **Birkhead, T. R., and Moller, A. P. (1992):** Numbers and size of sperm storage tubules and the duration of sperm storage in birds: A comparative study. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 45:363–372.
29. **Birkhead, T.R., Sheldon, B.C., and Fletcher, F. (1994):** A comparative study of sperm-egg interactions in birds. *J. of Reprod. and Fertil.* 101: 353-361.
30. **Birkhead, T.R., Wishart, G.J. and Biggins, J.D. (1995):** Sperm precedence in the domestic fowl *Proceedings Royal Society of London Series B* 266: 1759–1764.
31. **Birkhead. T.R., Martinez, J.G., Burke, T. and Froman, D.P. (1999):** Sperm mobility determines the outcome of sperm competition int he domestic fowl. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 266: 1759-1764.
32. **Birkhead, T. R., and Brillard, J.P. (2007):** Reproductive isolation in birds: Postcopulatory prezygoti barriers. *Trends Ecol. Evol.* 22:266–272.
33. **Bishop, G.H. (1920):** Fertilization in the honeybee, II. Disposal of the sexual fluids in the organs of the female. *J. Exp. Zool.* 31: 267-286.
34. **Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L.L., Simonetti, R.G., Gluud, C. (2007):** Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention. *The J. of the Am. Med. Assoc. (JAMA)*, 297: 842-857. pp.
35. **Blaskó, B., Cehla, B., Kiss, I., Kovács, K., Lapis, M., Madai, H., Nagy, A.Sz., Nábrádi, A., Pupos, T., Szöllősi, L., Szűcs, I. (2011):** Broiler csirke hizlalás szervezése és ökonómiája. In: *Állattenyésztési ágazatok ökonómiája.* Debreceni Egyetem, Nyugat-Magyarországi Egyetem, Pannon Egyetem.
www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_19_Allattenyesztesi_agazati_ekonomia/ch11s02.html
36. **Bleil, J.D., Greve, J.M. and Wassarman, P.M. (1988):** Identification of a secondary sperm receptor int he mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm eggs. *Develop. Biol.* 128: 376-385.
37. **Bobr, L.W., Ogasawara, F.X. and Lorenz, F.W. (1964):** Distribution of spermatozoa int he oviduct and fertility in domestic birds. II. Transport of spermatozoa int he fowl oviduct. *J. of Reprod. and Fertil.* 8: 49-58.
38. **Bogenfürst, F. (2004):** A keltetés kézikönyve. Gazda Kiadó Pp. 149-150.

39. **Boyle, M.S, Skidmore, J., Zhang, J., Cox, J.E. (1991):** The effects of continuous treatment of stallions with high levels of a potent GnRH analogue. *J Reprod Fertil Suppl.* 1991;44:169-82.
40. **Brake, J.T. (1987):** Stress and modern poultry management. *Animal Production Highlights.* F. Hoffman-La Roche & Co., Ltd., 4002 Basel, Switzerland.
41. **Brake, J.T. (2003):** Broiler breeder nutrition and Management. *ASA Tech. Bull.* Vol. PO51-2003. 1-10. pp.
42. **Bramwell, R.K. and Howart, B. (1992a):** Quantitative determination of spermatozoa penetration of the hen's ovum as assessed in oviposited eggs. *Poult. Sci.* 71: 140.
43. **Bramwell, R.K. and Howart, B. (1992b):** Preferential attachment of cock spermatozoa to the perivitelline layer directly over the germinal disc of the hen's ovum. *Biol. of Reprod.* 47: 1113-1117.
44. **Bramwell, R.K., Marks, H.L. and Howarth, B. (1995):** Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum assessed on oviposited eggs. *Poult. Sci.* 74: 1875-1883.
45. **Bramwell, R.K., McDaniel, C.D., Wilson, J.L., Howarth, B., (1996):** Age effect of male and female broiler breeders on sperm penetration of the perivitelline layer overlying the germinal disc. *Poult. Sci.* 75: 755-762.
46. **Breque, C., Surai, P., Brillard, J.P. (2003):** Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Reprod. and Develop.* 66: 314-323.
47. **Brillard, J.P. and Bakst, M.R. (1990):** Quantification of spermatozoa in the sperm-storage tubules of turkey hens and the relation to sperm numbers in the perivitelline layer of eggs. *Biol. Reprod.* 43:169-173.
48. **Brillard, J.P., Antoine, H. (1990):** Storage of sperm in the uterovaginal junction and its incidence on the numbers of spermatozoa present on perivitelline layer of eggs. *Br. Poult. Sci.* 31: 635-642.
49. **Brillard J.P. (1993):** Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. *Poult. Sci.* 72: 923-928.
50. **Brillard. J.P. (2009):** Growth and reproduction in poultry: towards biological limits? XXI. International Poultry Symposium PB WPSA , Wroclaw-.Szklarska Poreba, Poland September pp.: 14-17.
51. **Brown, N.L., Baylé, J.D., Scanes, C.G., Folett, B.K. (1975):** *Cell Tiss. Res.*, 156:499. In: Péczely, P.: *A madarak szaporodásbiológiája Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1987* pp. 154
52. **Burke, W.H., Dennison, P.T. (1980):** Prolactin and luteinizing hormone levels in females turkeys (*Meleagris gallopavo*) during a photoinduced reproductive cycle and broodiness. In: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 41. 92-100.

53. **Burrows, W.H., Quinn, J.P. (1935):** A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. *Poult. Sci.* 14:251
54. **Busch, W., Löhle, K., Peter, W. (1991):** Künstliche Besamung bei Nutztieren. Gustav Fisher Verlag, Jena, p:612.
55. **Calvo, F.O., Bahr, J.M. (1983):** Adenylyl cyclase system of the small preovulatory follicles of the domestic hen: Responsiveness of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. In: *Biol. Reprod.* 4. 542-547.
56. **Celebi, F., Güven, B. (2001):** Plasma concentrations of 13,14-dihydro-15-keto PGF_{2α} and progesterone during the oviposition cycle of the domestic goose. In: *Poult. Sci.* 80: 225-227.
57. **Chvapil, M. (1973):** New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sci.* 13: 1014.
58. **Clark, R.S. (1922):** Rays and skates (Raiae) No.1. Egg-capsules and young. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 12: 577.
59. **Clermont, Y. (1958):** Structure de l'épithélium séminal et mode de renouvellement des spermatogonies chez le canard. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale* 47:47-66.
60. **Clulow J. and Jones, R.C. (1982):** Production, transport, maturation, storage and survival of spermatozoa in the male Japanese Quail *Coturnix coturnix*. *J. of Reprod. and Fertil.* 64: 259-266.
61. **Compton, M.M., Van Krey, H.P. and Siegel, P.B. (1978):** The filling and emptying of the uterovaginal sperm-host glands in the domestic hen. *Poult. Sci.* 57: 1696-1700.
62. **Costantini, V., Carraro, C., Bucci, F.A., Simontacchi, C., Lacalandra, G.M., Minoia, P. (2009):** Influence of a new slow-release GnRH analogue implant on reproduction in the Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*, Shaw 1805). *Anim Reprod Sci.* 2009 Apr;111(2-4):289-301. Epub 2008 Mar 22.
63. **Courot, M., Hochereau-de Reviere, M.T. and Ortavant, R. (1970):** Spermatogenesis. Pp. 339-432. In A.D. Johnson, W.R., Gomes and N.L. Vandemark (eds). *The testis. Vol. I*, Acad. Press, New York.
64. **Courrier, R. (1921):** Sur l'existence d'une glande interstitielle dans le testicule des Poissons. *C. R. Soc. Biol.* 85: 939-941.
65. **Cowan, P.J., Michie, W. (1980):** *British Poultry Science* 21: 339. In: Péczely, P.: *A madarak szaporodásbiológiája Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1987 pp. 215*
66. **Creel L.H. Maurice D. Bridges W.C. Grimes L.W.(1990):** A model to describe and predict post-peak changes in broiler hatchability. *J. Appl. Poult. Sci.*, 1990; **7**: 85-89.

67. **Davies, D.T. (1976):** Steroid feedback the male and female Japanese quail. In: *J. Endocrinol.*, 70. 513-514.
68. **Dent, J.N. (1970):** The ultrastructure of the spermatheca in the red spotted newt. *J. Morph.* 132: 397.
69. **Donoghue, A.M. and Wishart, G.J. (2000):** Storage of poultry semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 213-232.
70. **Wolfné Táskai, E. (1994):** A madarak szaporodási folyamatai. In: Dr. Husvéth, F. Szerk. *A háziállatok élettana és anatómiája.* pp. 591-593.
71. **Duncan, I.J.H. (1970):** Frustration in the fowl. Pages 15–31 *in: Aspects of Poultry Behaviour.* B. M. Freeman and R. F. Gordon, ed. *Br. Poult. Sci.*, Edinburgh, UK.
72. **Duncan, I.J.H., Hocking, P.M. and Seawright, E. (1990):** Sexual behavior and fertility in broiler breeder domestic fowl. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 26:201–213.
73. **Edens, F. (2002):** Practical applications for selenomethionine: broiler breeder production. *Proc. Of 18th Alltech's Annual Symposium*, Edited by Lyons, T.P. and Jacques, K.A., Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 29-42.
74. **Edens, F.W., Sefton, A.E. (2009):** Sel-Plex® improves spermatozoa morphology in broiler breeder males. *Int. J. Poult. Sci.* 8(9):853–861.
75. **Eising, C., Eikenaar, C., Schwabl, H., Groothuis, T.G.G. (2001):** Maternal androgens in blackheaded gull (*Larus ridibundus*) eggs: consequences for chick development. *Proc. R. Soc. Lond.* 268. 839-846.
76. **Eitan, Y. and Soller, M. (2001):** Effect of photoperiod and Quantitative feed restriction in a broiler strain on onset of lay in females and onset of semen production in males: A genetic hypothesis. *Poult. Sci.* 80:1397–1405.
77. **Ekstedt, E., Söderquist, L. and Pölen, L. (1986):** Fine structure of spermatogenesis and Sertoli cells (*Epitheliocytyus sustentans*) in the bull. *Anat. Histol. Embr.* 15:23-48.
78. **Etches, R.J. (1996):** *Reproduction in poultry.* CAB International. 125-166. pp.
79. **Etches, R.J., Cunningham, F.J. (1976):** The interrelationship between progesterone and luteinizing hormone during the ovulation cycle of the hen (*Gallus domesticus*). In: *J. Endocrinol.*, 71. 51-58.
80. **Eyal-Galdi, H. and Kochav, S. (1976):** From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. *Develop. Biol.* 19: 321-337.

81. **Fasenko, G. M., Hardin, R.T., Robinson, F. E. (1992):** Relationship of hen age and sequence position with fertility, hatchability, viability, and preincubation embryonic development in broiler breeders. *Poult. Sci.* 71: 1374-1383.
82. **Fattori, T.R., Wilson, H.R., Harms, R.H. and Miles, R.D. (1991):** Response of broiler breeder females to feed restriction below recommended levels. 1. Growth and reproductive performance. *Poult. Sci.* 70:26–36.
83. **Ferencziné Szőke, Zs. (2008):** Maternális stresszvizsgálatok tőkés récén. Doktori tézis. 2008. Szent István Egyetem, Gödöllő, Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola.
84. **Forgó, V. (2002):** Hormonális és morfológiai változások a házilúd petefészékében és petevezetőjében a tüszőérés és az atrézia során, Doktori értekezés, Szent István Egyetem, Gödöllő, Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola.
85. **Fragoso, J.S., Díaz, M.P., Moreno, J.C.A., Infesta, P.C., Rodriguez-Bertos, A., Barger, K. (2012):** Relationship between fertility and some parameters in male broiler breeders (Body and testicular weight, Histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels). *Reprod. Dom. Anim.* doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02161.x.
86. **Fraps, R.M. (1946):** Differential ovulatory reaction of first and subsequent follicles of the hen's clutch. *Anat. Rec.* 96(4): 573.
87. **Freedman, S.L., Akuffo, V.G. and Bakst, M.R. (2001):** Evidence for the innervation of the sperm storage tubules in the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Reprod.* 121: 809-814.
88. **Froman, D.P. (1990):** Chicken acrosin: extraction and purification. *Poultry Science* 69: 812-817.
89. **Froman, D.P., Feltman, A.J., Rhoads, M.L. and Kirby, J.D. (1999):** Sperm mobility: A primary determinant of fertility in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biol. of Reprod.* 61: 400-405.
90. **Froman, D.P. (2003):** Deduction of a model for sperm storage in the oviduct of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biol. of Reprod.* 69: 248-253.
91. **Grigg, G.W. and Hodge, A.J. (1949):** Electron microscopic studies of spermatozoa. In: The morphology of the spermatozoon of the common domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Australian J. of Sci. Res., Series B2*: 271-297.
92. **Gross, W.B., Siegel, P.B. (1981):** Long-term exposure of chickens to three levels of social stress. *Avian Dis.* 25: 312-325.
93. **Gumulka, M., Kapkowska, E., (2005):** Age effect of broiler breeders on fertility and sperm penetration of the perivitelline layer of the ovum. *Anim. Reprod. Sci.*, 90: 135-148.
94. **Hadley, M.A. and Dym, M. (1983):** Spermatogenesis in the vasectomized monkey: quantitative analysis. *Anat. Record.* 205: 381-386
95. **Haines, T.P. (1940):** Delayed fertilization in *Leptodeira annulata polysticta*. *Copeia.* 2: 116.

96. **Hansen, J.C., Deguchi, Y. (1996):** Selenium and fertility in animals and man – a review. *Acta Vet. Scand.* 37(1): 19-30. Review.
97. **Harnos, A., Reiczigel, J. (2006):** Biostatistika és kísérlettervezés. p: 14. www.univet.hu/users/zslang/phd/kis-terv--elemszam--transzform.pdf
98. **Hayward, L.S., Wingfield, .C. (2004):** Maternal corticosterone is transferred to avian yolk and may affect offspring growth adult phenotype. *Gen. Comp. Endocr.*, 135. 3. 365-371.
99. **Hazary, R. C., Staines, H. J. and Wishart, G. J. (2000):** Assessing the efficiency of mating in broiler breeder flocks by enumerating the spermatozoa which penetrate the inner perivitelline layer over germinal disc. *Br. Poult. Sci.* 41: 395-400.
100. **Heck, A., Onagbesan, O., Tona, K., Metayer, S., Putterflam, J., Jegu, Y., Trevidy, J. J., Decuypere, E., Williams, J., Picard, M. and Bruggeman, V. (2004):** Effects of ad libitum feeding on performance of different strains of broiler breeders. *Br. Poult. Sci.* 45:695–703.
101. **Hertelendy, F., Asem, E.K. (1984):** Steroidogenesis in granulosa cells during follicular maturation: evidence for desensitization-resensitization during the ovulation cycle. *J. Exp. Zool.*, 232: 513-520.
102. **Ho, J.J. and Meizel, S. (1970):** Electrophoretic detection of multiple form of trypsinlike activity in spermatozoa of the domestic fowl. *J. of Reprod. and Fertil.* 23: 177-179.
103. **Ho, J.J. and Meizel, S. (1975):** Hydrolysis of the hen vitelline membrane by cock sperm acrosin and other enzymes. *J. of Exp. Zool.* 194: 429-437.
104. **Hocking, P.M., Wadington, D., Walker, M.A. and Gilbert, A.B. (1989):** Control of the development of the ovarian follicular hierarchy in broiler breeder pullets by food restriction during rearing. *Br. Poult. Sci.* 30:161–173.
105. **Hocking, P.M. and Bernard, R. (1997):** Effects of dietary crude protein content and food intake on the production of semen in 2 lines of broiler breeder males. *Br. Poult. Sci.* 28: 199-202.
106. **Hocking, P. M., and Bernard, R. (2000):** Effects of the age of male and female broiler breeders on sexual behavior, fertility, and hatchability of eggs. *Br. Poult. Sci.* 41:370–376.
107. **Holm, L., Y. Ridderstrale, and P.G. Knutsson. (1996):** Localisation of carbonic anhydrase in the sperm storing regions of the domestic chicken oviduct. *Acta Anat. (Basel)* 156:253–260.
108. **Holmes, W.N., Phillips J.G. (1976):** The adrenal cortex of birds. In: Chester-Jones, Henderson (ed.) *General and Comparative Endocrinology of the adrenal cortex.* Acad. Press NY, 293-420
109. **Horn P. (2008):** A baromfitenyésztés fejlődésének kilátásai, új kihívások, veszélyforrások és lehetőségek. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 2008; 57(5): 389-401.

110. **Howart, B. (1984):** Maturation of spermatozoa and mechanism of fertilization. Pp. 160-174. In F.J. Cunningham, P.E. Lake and D. Hewitt (eds), *Reproductive Biology of Poultry*, Br. Poult. Sci. Ltd, The Alden Press Ltd., Oxford.
111. **Howart, B. (1990):** Avian sperm-egg interaction: perivitelline layer possesses receptor activity for spermatozoa. *Poult. Sci.* 69: 1012-1015.
112. **Hrabia, A., Takagi, S., Ono, T. and Shimada, K. (2003):** Fertilization and development of quail oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Biol. of Reprod.* 69: 1651-1657.
113. **Hughes, B.O. and Black, A.J. (1976):** The influence of handling on egg production, egg shell quality and avoidance behaviour of hens. *Br. Poult. Sci.* 17:135–144.
114. **Hughes, B.O. (1979):** Aggressive behaviour and its relation to oviposition in the domestic fowl. *Appl. Anim. Ethol.* 5: 85–93.
115. **Hughes, B.O., Gilbert, A.B. and Brown, M.F. (1986):** Categorisation and causes of abnormal egg shells: relationship with stress. *Br. Poult. Sci.* 27:325–337.
116. **Husv eth, F (1994):** A h aziállatok  lettana  s anatómiája. Mezőgazda Kiadó. Bp. 109-116.
117. **Iwanow, E. (1912) :** Artificial insemination in birds. *J. Roy. Microsc. Soc. Zit. Nach Bonadonna, T. 1* (1957), 34
118. **Janczak A.M, Braastad B.O. and Bakken M (2006):** Behavioural effects of embryonic exposure to corticosterone in chickens *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 96: 69-82
119. **John, T.M., George, J.C., Scanes, C.G. (1983):** Seasonal changes in circulating levels of luteinising hormone and growth hormone in the migratory Canada goose. In: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 51. 44-49.
120. **Johnson, A.L., Van Tienhoven, V. (1984):** Effects of aminoglutethimide on luteinizing hormone and secretion and ovulation in the hen, *Gallus domesticus*. In: *Endocrinol.*, 114: 2276-2283.
121. **Johnson, A.L., Woods, D.C. (2007):** Ovarian dynamics and follicle development. p. 244. In: Jamieson, B.G.M. (Ed.): *Reproductive biology and phylogeny of birds: Phylogeny, morphology, hormones, fertilization*. Enfield, NH: Science Publishers 2007. pp. 609.
122. **Katanbaf, M.N., Dunnington, E.A. and Siegel, P.B. (1989):** Restricted feeding in early- and late-feathering chickens. Growth and physiological responses. *Poult. Sci.*68:344–351.
123. **Kawakami, E., Yagi, T., Kobayashi, M., Hori, T. (2012):** Therapeutic effect of frequent injections of GnRH analogue in a beagle with knobbed acrosome abnormality of sperm. *J Vet Med Sci.* 2012 Feb;74(2):201-4. Epub 2011 Sep 14.
124. **Kelemen, K., P eczely, P., Sz oke, Zs., Ladj anszky, V. (2003):** A comparative methodical study of the faecal steroid analysis on birds: looking for a valid method of testosterone determination. *Acta Biol. Hung.* 54(2): 285-98.

125. **Khan, R.U. (2011):** Antioxidant and poultry semen quality. *World's Poult. Sci. J*, Vol. 67, June 2011: 297-308.
126. **King, J.A. and Millar, R.P. (1982):** Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. II. Isolation and characterisation. *J. of Biol. Chem.* 257: 10729-10732.
127. **King, L.M., Brillard, J.P., Garrett, W.M., Bakst, M.R. and Donoghue, A.M. (2002):** Segregation of spermatozoa within sperm storage tubules of fowl and turkey hens. *Reprod.* 123: 79–86.
128. **Kirby, J.D., Vizcarra, J.A., Berghman, L.R., Proudman, J.A., Yang, J. and Scanes, C. (2005):** Regulation of FSH secretion: GnRH independent? Pp. 83-96. In A. Dawson and P.J. Sharp (eds), *Functional avian endocrinology*. Narosa Publishing House, New Delhi
129. **Knapp, T.R., Fehrer, S.C., Silsby, J.L., Porter, T.E., Bhenke, E.J., El Halawani Me (1987):** Gonadal steroid-mediated alteration of luteinizing hormone secretion by anterior pituitary cells of young turkeys. In: *Gen. Comp. Endocrinol.* 68. 449-455.
130. **Koohpar., H.K., Sayyahzadeh,H., Pirsaraei, Z.A. (2010):** Comparing the Natural Mating with Artificial Insemination (A.I) at Mazandran Native Hen. *International J. of Poult. Sci.* 9 (7): 711-715, 2010
131. **Kosin I.I. (1945):** The accuracy of the macroscopic method in identifying unincubated germ discs. *Poult. Sci.*, 24: 281-295.
132. **Kovács, K., Péczely, P. (1983):** Phase shift in circadian rhythmicity of total, free corticosterone and transcortine plasma levels in hypothyroid male Japanese quails. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50(3): 483-9.
133. **Kowalski, K.I., Tilly, J.L., Johnson, A.L. (1991):** Cytochrome P450 side-chain cleavage (P450_{scc}) in the hen ovary. I. Regulation of P450_{scc} messenger RNA levels and steroidogenesis in theca cells of developing follicles. In: *Biol. Reprod.*, 45. 955-966.
134. **Kumaran, J.D.S., and Turner, C.W. (1949):** The normal development of the testis in the White Plymouth Rock. *Poult. Sci.* 28: 511-520.
135. **Kuroki, M. and Mori, M. (1997):** Binding of spermatozoa to the perivitelline layer in the presence of a protease inhibitor. *Poult. Sci.* 76: 748-752.
136. **Lake, P.E. (1956):** The structure of the germinal epithelium of the fowl testis with special reference to the presence of multinuclear cells. *Quarterly J. of Microscop. Sci.* 97: 487-497.
137. **Lake, P.E., Furr, B.J.A. (1971):** *Physiology and Biochemistry of Domestic Fowl* (eds. D. J. Bell, B.M. Freeman) 3. köt. 1469 p. Acad. Press., New York – London
138. **Lake, P.E. (1986):** The history and future of the cryopreservation of avian germ plasm. *Poult. Sci.* 65: 1-15.

139. **Langford, F., Howarth, B. (1974):** The oviducts and its functions (ed. A.D. Johnson) Acad. Press., New York – London, p. 237.
140. **Lessells, C.M. and Birkhead, T.R. (1990):** Mechanisms of sperm competition in birds: mathematical models. *Behavi. Ecol. and Sociobiol.* 27: 325–337.
141. **Lin, M. and Jones, R.C. (1990):** Spatial arrangement of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *J. of Reprod. and Fertil.* 90: 361-367.
142. **Lin, M. and Jones, R.C. (1992):** Renewal and proliferation of spermatogonia during spermatogenesis in the Japanese quail. *Cell and Tissue Research* 267: 591-601.
143. **Lin, M. and Jones, R.C. (1993):** Spermiogenesis and spermiation in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J. of Anat.* 183: 525-535.
144. **Liptói, K., Varga, Á., Hidas, A. and Barna, J. (2004):** Determination of the rate of true fertility in duck breeds by the combination of two *in vitro* methods. *Acta Vet. Hung.* 52 (2) pp. 227-233.
145. **Litscher, E.S., Juntunen, K., Seppo, A., Penttila, L., Niemela, R., Renkonen, O. and Wassarman, P.M. (1995):** Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs *in vitro*. *Biochem.* 34: 4662-4669.
146. **Lok, D., Weenk, D. and de Rooij, D.G. (1982):** Morphology, proliferation, and differentiation of undifferentiated spermatogonia in the Chinese hamster and the ram. *Anat. Rec.* 203: 83-99.
147. **Long, J.A. and Kramer, M. (2003):** Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored semen. *Poult. Sci.* 82: 1802-1807.
148. **M. de Beer and Coon, C.N. (2007):** The effect of different feed restriction programs on reproductive performance, efficiency, frame size, and uniformity in broiler breeder hens. *Poult. Sci.* 86:1927–1939.
149. **Majsa, Z., Mihaly, K., Peczely, P. (1976):** Circadian rhythm of hypothalamo-hypophyseal-adrenal activity in the chicken. *Acta Physiol. Acad Sci. Hung.* 47(2-3): 101-9.
150. **Malecki, I.A. and Martin, G.B. (2002):** Fertility of the male and female emus (*Dromaius novaehollandiae*) as determined by spermatozoa trapped in eggs. *Reprod., Fertil. and Develop.* 14: 495-502.
151. **McCartney, M.G., Brown, H.B. (1976):** Effects of method of mating on fertility in broiler breeder hens. *Poult. Sci.* 1976 May;55(3):1152-3.
152. **McDaniel G. R. (1986):** Sex separate feeding of broiler parent stock. *Zootech. Int.* 1986; 11: 43-58.
153. **Metten, H. (1941):** Studies on the reproduction of the dogfish. *Phil. Trans. Roy. Soc. B.* 230: 217.
154. **Millam, J.R., Craig-Vet, C.B., Adams, T. E., Adams, B.M. (1989):** Avian gonadotropin-releasing hormones I and II in brain and other tissues in turkey hens. In: *Comp. Biochem. Physiol.*, 1989., 94.771-776.

155. **Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Igarashi, M., Chino, N., Sakakibara, S., Kangawa, K. Matsuo, H. (1983):** Evidence that chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone is (Gln⁸)-LH-RH. *Life Sci.* 32(12): 1341-7.
156. **Montgomerie, R., Briskie, J. (2007):** Anatomy and evolution of copulatory structures. p: 115-148. In: Jamieson, B.G.M. (Ed.): *Reproductive biology and phylogeny of birds: Phylogeny, morphology, hormones, fertilization.* Enfield, NH: Science Publishers 2007. pp. 609.
157. **Muray, T., Pethes, G., Peczely, P. (1980a):** Changes of plasma progesterone and testosterone level in chicken (*Gallus Domesticus*) from the first day of live to the beginning of oviposition. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 28:97-102.
158. **Muray, T., Pethes, G., Rudas, P., Péczy, P. (1980b):** Abstr. 28th Intern. Congr. Physiol. Sci., Budapest, 2746. In: Péczy, P.: *A madarak szaporodásbiológiája.* Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1987 pp. 85.
159. **Murton, R.J., Westwood, M.K. (1977):** Avian breeding cycles. Oxford: Clarendon Press. In: Péczy, P.: *A madarak szaporodásbiológiája.* Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1987 pp. 135
160. **Nakanishi, A., Utsumi, K. and Iritani, A. (1990):** Early nuclear events of *in vitro* fertilization in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Mol. Reprod. and Develop.* 26: 217-221.
161. **Nicander, L. and Hillstrom, (1967):** Increased thickness of the inner mitochondrial membrane during sperm maturation in the domestic rooster. *Exp. Cell Research* 48: 622-624.
162. **Okamura, F. and Nishiyama, H. (1978):** The passage of spermatozoa through the vitelline membrane in the domestic fowl, *Gallus gallus*. *Cell and Tissue Research* 188: 497-508.
163. **Olsen, M.W. and Neher, B.H. (1948):** The site of fertilization in the domestic fowl. *J. of Exp. Zool.* 109: 355-366.
164. **Olszanska, B., Stepinska, U. and Perry, M.M. (2000):** Development of embryos from *in vitro* ovulated and fertilized oocytes of the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J. of Exp. Zool.* 292: 580-586.
165. **Onagbesan, O. M., Metayer, S., Tona, K., Williams, J., Decuypere, E. and Bruggeman, V. (2006):** Effects of genotype and feed allowance on plasma luteinizing hormones, follicle-stimulating hormones, progesterone, estradiol levels, follicle differentiation, and egg production rates of broiler breeder hens. *Poult. Sci.* 85:1245–1258.
166. **Ortavant, R. (1959):** Spermatogenesis and Morphology of the spermatozoon. Pp. 1-50, In H.H. Coles and P.T. Cupps (eds.), *Reprod. in Dom. Anim.*, Acad. Press, New York.
167. **Pan, J., Sasanami, T., Nakajima, S., Kido, S., Doi, Y. and Mori, M. (2000):** Characterization, of progressive changes in ZPC of the vitelline membrane of quail oocyte following oviductal transport. *Mol. Reprod. and Develop.* 55: 175-181.

168. **Pan, J., Sasanami, T., Kono, Y., Matsuda, T. and Mori, M. (2001):** Effects of testosterone on production of perivitelline membrane glycoprotein ZPC by granulosa cells of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Biol. of Reprod.* 63: 310-316.
169. **Péczely, P. (1987):** A madarak szaporodásbiológiája. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1-237.
170. **Péczely, P. (1989):** The role of gonadotropin releasing hormone (Gn-RH) in the regulation of gonadal functions of birds. Review article. *Acta Biol. Hung.* 40, 161-193.
171. **Péczely, P., Do thi Dong Xuan, Forgó, V. (1988):** A gunarak szaporodási tevékenységét befolyásoló eljárások. Az állattenyésztés legújabb eredményei (1986-1987) Poszter összefoglaló 130. p.
172. **Perry, M.M., Golbert, A.B. and Evans, A.J. (1978):** The structure of the germinal disc region of the hen's ovarian follicle during rapid growth phase. *J. of Anat.* 127: 379-392.
173. **Perry, M.M. (1987):** Nuclear events from fertilization to the early cleavage stages in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J. of Anat.* 127: 379-392.
174. **Pierson, E.E., Krista, L.M., McDaniel, G.R. (1988):** Effect of age and physiological status on sperm storage 24 hours after artificial insemination in broiler breeder hens. *Br. Poult. Sci.* 29: 193-197.
175. **Pizzari, T., Froman, D.P. and Birkhead, T.R. (2002):** Pre- and post-insemination episodes of sexual selection in the fowl, *Gallus g. domesticus*. *Heredity* 88: 112-116.
176. **Reddy R.P. Sadjadi M. (1990):** Selection for growth and semen traits in the poultry industry: what can we expect in the future? *In: Control of fertility in domestic birds. Edited by J.P. Brillard. Institut National de la Recherche Agronomique Editions, Versailles, 1990; pp. 47-60.*
177. **Regaud, C. (1901):** Études sur la structure des tubes séminifères et sur la spermatogénèse chez les mammifères. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale.* 14: 101-156.
178. **Renden, J.A., Oates, S.S., West, M.S. (1991):** Performance of two male broiler breeder strains raised and maintained on various constant photoschedules. *Poult. Sci.* 70:1602-1609.
179. **Renema, R.A. (2004):** Reproductive responses to Sel-Plex organic selenium in male and female broiler breeders: impact on production traits and hatchability. *In: Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Proceedings of 20th Alltech's Annual Symposium, Edited by Lyons, T.P. and Jacques K.A., Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 81-91.*
180. **Richardson, M.E., Bodine, A.B., Froman, D.P. and Thurston, A. (1988):** Turkey acrosin. I. Isolation, purification and partial characterization. *Biol. of Reprod.* 38: 645-651.
181. **Robertson, L., Brown, H.L., Staines, H.J. and Wishart, G.J. (1997):** Characterization and application of an avian *in vitro* spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs. *J. of Reprod. and Fertil.* 110: 205-211.

182. **Robinson, F.E., Znidhof, M.J., Renema, R.A. (2007):** Reproductive efficiency and metabolism of female broiler breeders as affected by genotyp, feed allocation and age at photostimulation. 1. pullet growth and development. *Poult. Sci.* 86: 2256-2266
183. **Rosales, A.G. (1994):** Managing stress in broiler breeders: A review. *J. Appl. Poultry Res.* 3:199-207.
184. **Sanchez-Gutierrez, M., Garcia-Montalvo, E.A., Izquierdo-Vega, J.A. (2008):** Effect of dietary selenium deficiency on the in vitro fertilizing ability of mice spermatozoa. *Cell. Biol. Toxicol.* 24(4):321–329.
185. **Sasanami, T., Pan, J. and Mori, M. (2003):** Expression of perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in the liver of Japanese quail (*Coturnix japonica*) after in vivo treatment with diethylstilbestrol. *J. of Steroid Biochem. and Mol. Biol.* 84: 109-116.
186. **Sasanami, T., Pan, J., Doi, Y., Hisada, M., Kohsaka, T., Toriyama, M. and Mori, M. (2002):** Secretion of egg envelope protein ZPC after C-terminal proteolytic processing in quail granulosa cells. *Europ. J. of Biochem.* 269: 2223-2231.
187. **Schramm, G.P. (2005):** Künstliche Besamung beim Geflügel Züchtungskunde, 77, (2/3) S. 206 – 217, 2005, ISSN 0044-5401
188. **Schwabl, H. (1993):** Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90. 11446-114450.
189. **Schwabl, H. (1996):** Maternal testosterone in the avian egg enhances postnatal growth. *Comp. Biochem. Phys. A.*, 114. 271-276.
190. **Sefton, A.E., Edens, F.W. (2004):** Sel-Plex improves semen quality in broiler breeder males in a cage environment. XII. World Poultry Conf. Proc. in CD.
191. **Senior, B.E. (1974):** Radioimmunoassay of oestrone and oestradiol in the peripheral plasma of the domestic fowl in various physiological states and of hypophysectomized and ovariectomized fowls. *Acta Endocrinol.* 75: 130-140.
192. **Sexton, T.J. (1979):** Preservation of poultry semen- a review. In: Hawk, H.W. (ed.) *Animal reproduction. Beltsville Symposia in Agricultural Research.* No. 3. pp. 159-170. Allenheld, Osmun & Co., Montclair, NJ.
193. **Sexton, T. J., Renden, J. A., Marple, D. N., and Kemppainen R. J. (1989):** Effects of *ad libitum* and restricted feeding on semen quantity and quality, body composition, and blood chemistry of caged broiler breeder males. *Poult. Sci.* 68:569–576.
194. **Sharma, G.P., Gupta, B.L. and Nayar, K.K. (1956):** Spermatogenesis of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Research Bull. of the Panjab Univ.* 93: 139-151.

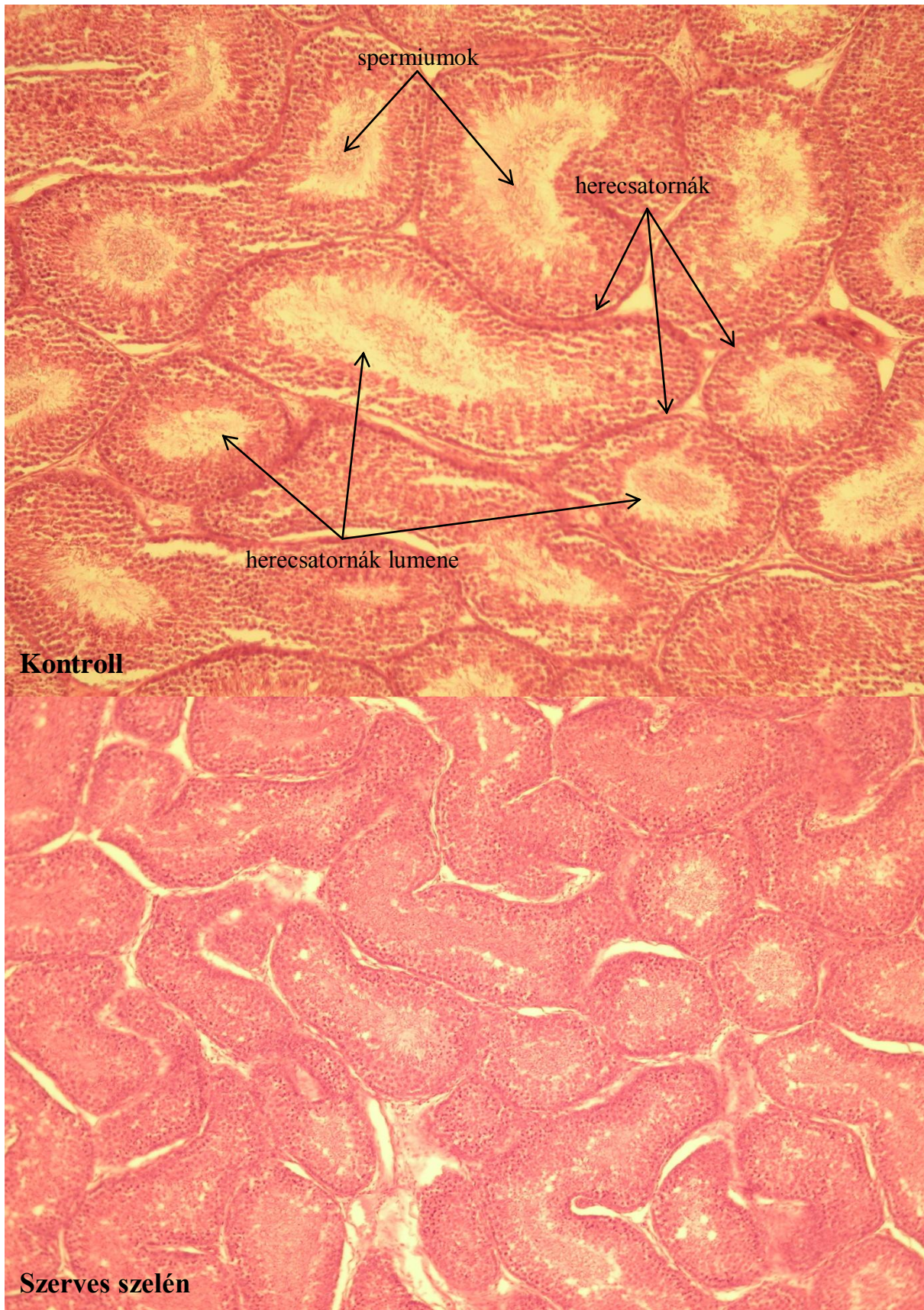
195. **Shimizu, M., Bedecarrats, G.Y. (2006):** Identification of a novel pituitary-specific chicken gonadotropin-releasing hormone receptor and its splice variants. *Biol. of Reprod.* 75: 800-808.
196. **Silverin, B. (1986):** Corticosterone-binding proteins and behavioral effects of high plasma levels of corticosterone during the breeding period in the pied flycatcher. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64(1): 67-74.
197. **Skarin, G., Nillius, S.J., Ahlsten, G., Tuvemo, T., Wide, L. (1984):** Induction of male puberty by long-term pulsatile subcutaneous LH-RH therapy. *Ups J. Med. Sci.* 89(1): 73-80.
198. **Staines, H.J., Middleton, R.C., Laughlin, K.F., Wishart, G.J. (1998):** Quantification of a sperm – egg interaction for estimating the mating efficiency of broiler breeder flocks. *Br. Poult. Sci.* 39: 273-277.
199. **Steel, M.G., Meldrum, W., Brillard, J.P. and Wishart, G.J. (1994):** The interaction of avian spermatozoa with the perivitelline layer *in vitro* and *in vivo*. *J. of Reprod. and Fertil.* 101: 599-603.
200. **Stepinska, U., Bakst, M.R. (2007):** Fertilization. p. 553-579. In: Jamieson, B.G.M. (Ed.): *Reproductive biology and phylogeny of birds: Phylogeny, morphology, hormones, fertilization.* Enfield, NH: Science Publishers 2007. pp. 609.
201. **Stetson, M.H. (1972):** *Gen. Comp. Endocr.*, 55, 463. In: Péczely, P.: *A madarak szaporodásbiológiája.* Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1987 pp. 77.
202. **Surai, P., Fisini, V.I. (2012):** Feeding breeders to avoid oxidative stress in embryos. *Proceedings XXIV. World's Poultry Congress Salvador, Bahia, Brazil. August 5-9.* www.agrobiology.ru/Surai.pdf
203. **Surai, P.F., Blesbois, E., Grasseau, I., Chalah, T., Brillard, J.P., Wishart, G.J., Cerolini, S., Sparks, N.H.C. (1998):** Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comp. Biochem. and Physiol. Part B* 120: 527-533.
204. **Surai, P.F., Woble, R.C., Speake, B.K. (1999):** Relationship between vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation in tissues of the newly hatched chick. *Br. Poult. Sci.* 40: 406-410.
205. **Surai, P.F., Sparks, N.H.C., Speakem B.K. (2006):** The role of antioxidants in reproduction and fertility of poultry. *EPC XII. European Poultry Conf. Proc. In CD.*
206. **Surai, P.F. Fisinin, V.I. (2012):** Feeding breeders to avoid oxidative stress in embryos. *XXIV. World's Poultry Congress, 5-9 August, 2012 Salvador, Bahia, Brazil.* <http://www.agrobiology.ru/Surai.pdf>
207. **Sykes, A.H. (1955):** The effect of adrenaline on oviduct motility and egg production in the fowl. *Poult. Sci.* 34:622–628.

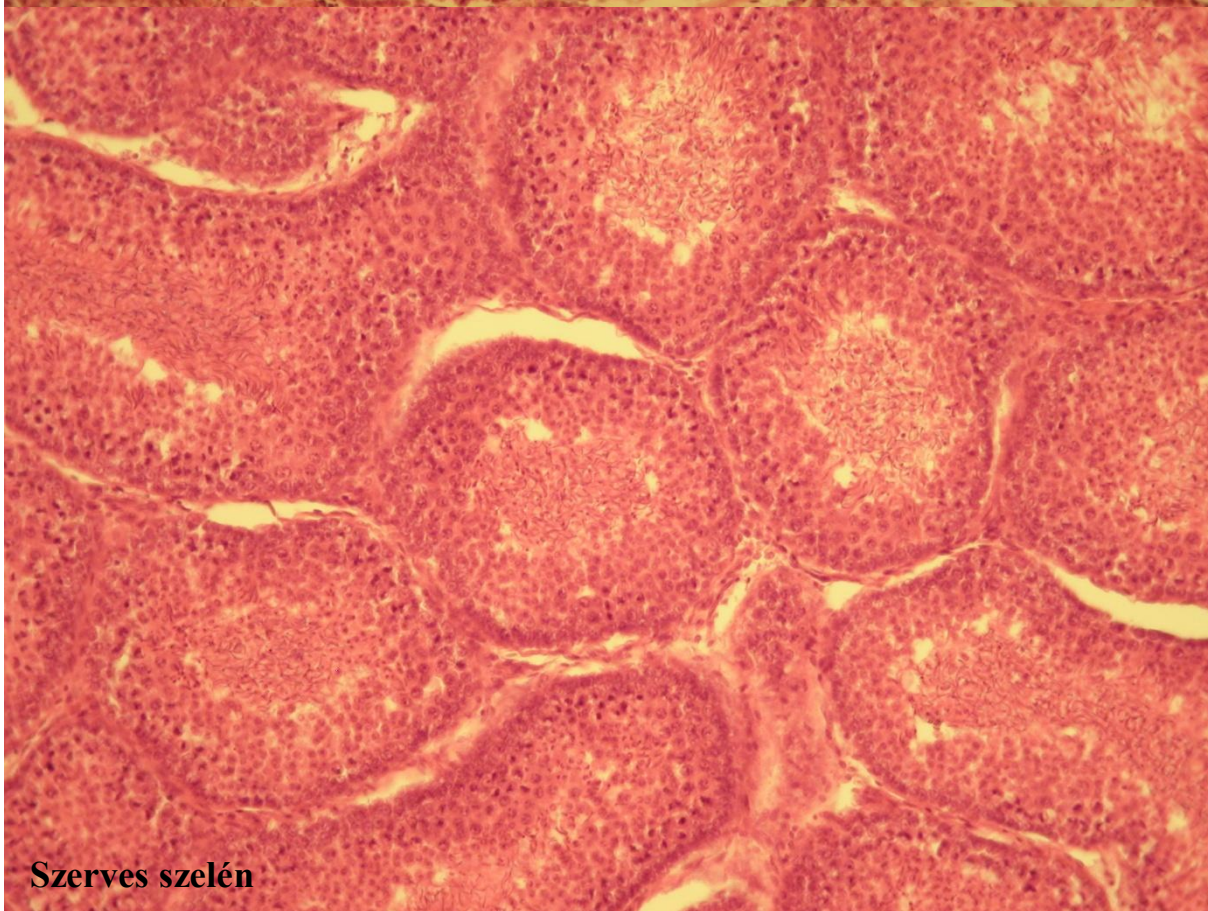
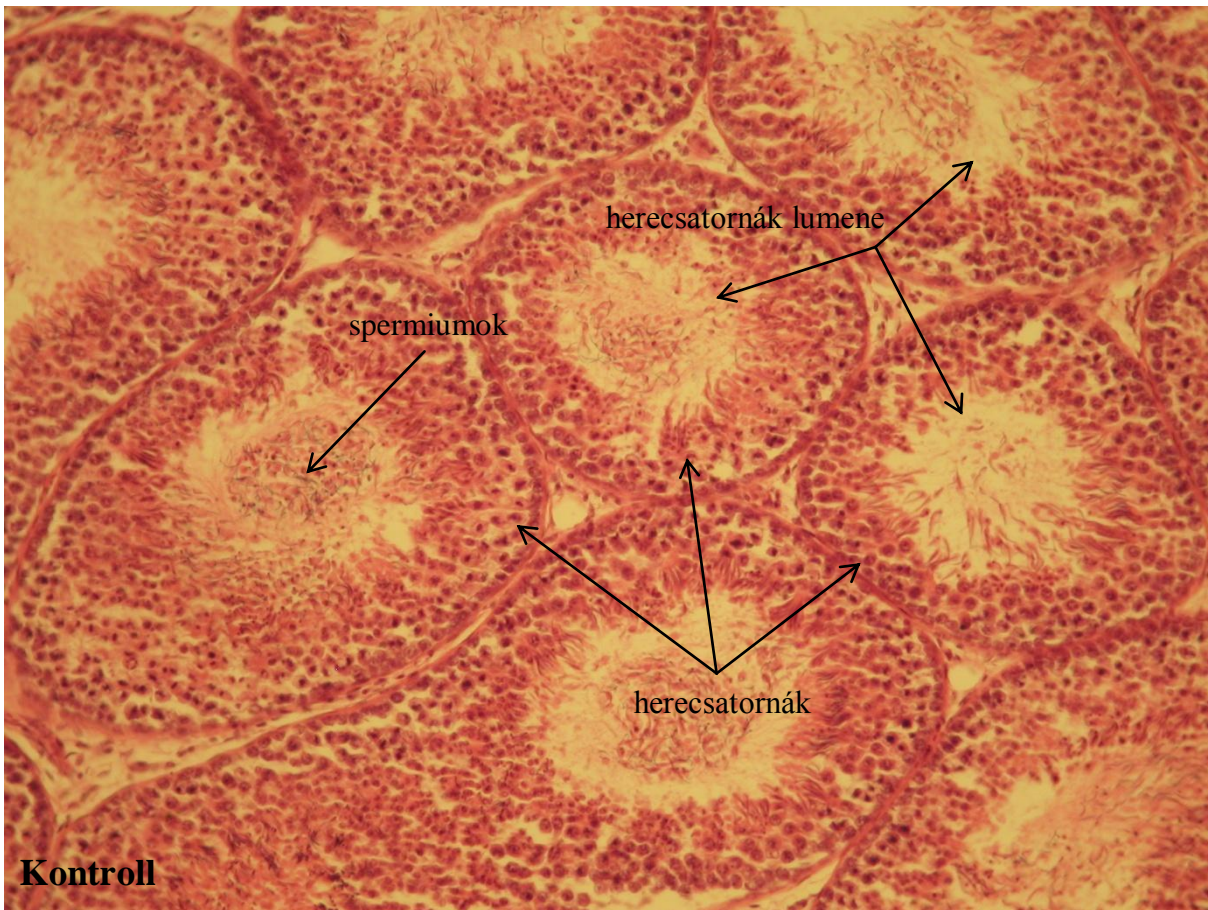
208. **Takeuchi, Y., Nishimura, K., Aoki, N., Adachi, T., Sato, C., Kitajima, K. and Matsuda, T. (1999):** A 42-kDa glycoprotein from chick egg-envelope, an avian homolog of the ZPC family glycoprotein in mammalian zona pellucida. Its first identification, cDNA cloning and granulosa cell-specific expression. *Europ. J. of Biochem.* 260: 736-742.
209. **Takeuchi, Y., Cho, R., Iwata, Y., Nishimura, K., Kato, T., Aoki, N., Kitajima, K. and Matsuda, T. (2001):** Morphological and biochemical changes of isolated chicken egg-envelope during sperm penetration: Degradation of the 97-kilodalton glycoprotein is involved in sperm-driven hole formation on the egg-envelope. *Biol. of Reprod.* 64: 822-830.
210. **Technological description of ROSS BREEDERS LIMITED (2013):**
http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_PS/RossPSHandbook2013.pdf
211. **Thruston, R.J. and Hess, R.A. (1987):** Ultrastructure of Spermatozoa from Domesticated Birds. Comparative Study of Turkey hicken and Guinea Fowl. *Scanning Microscopy* 1(4): 1829-1838.
212. **Turner, C.L. (1937):** Reproductive cycles and superfetation in poeciliid fishes. *Biol. Bull.* 72: 145.
213. **Végi, B., Váradi, É., Szóke, Zs., Liptói, K. and Barna, J. (2007) :** Analysis of fertility in broiler breeder flocks – male side approaches. 29th poultry Science Symposium, WPSA UK Branch, Edinburgh 23-25 July, 2007.
214. **Waclawek, M., Foisner, R., Nimpf, J., Schneider, W.J. (1998):** The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. *Biol. of Reprod.* 59: 1230-1239.
215. **Waddington, D., Gribbin, C., Sterling, R.J., Sanf, H.M. and Perry, M.M. (1998):** Chronology of events in the first cell cycle of the polyspermic egg of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Int. J. Dev. Biol.* 42: 625-628.
216. **Walsh T.J. Brake J. (1997):** The effect of nutrient intake during rearing of broiler breeder females on subsequent fertility. *Poult. Sci.*, 1997; **76**: 297-305.
217. **Wassarman, P.M. (1988):** Zona pellucida glycoproteins. *An. Rev. of Biochem.* 57: 415-442.
218. **Wassarman, P.M., Jovine, L., Litscher, E.S., Qi, H. and Williams, Z. (2004):** Egg-sperm interactions at fertilization in mammals. *Europ. J. of Ob. & Gyn. and Reprod. Biol.* 115 S: S57-S60.
219. **Watt, J.M. and. Solomon, S.E (1988):** Effect of stress on eggshell formation. *Br. Poult. Sci.* 29:886. (Abstr.)
220. **Weiss, H.S. and Sturkie, P.D. (1952):** Time of oviposition as affected by neuromimetic drugs. *Poult. Sci.* 31:227–231.
221. **Wilson S.C., Sharp, P.J. (1976):** Effects of androgens, oestrogens, and deoxycorticosteron acetate on plasma concentrations of luteinising hormone in laying hens. In: *J. Endocrinol.*, 69. 93-102.

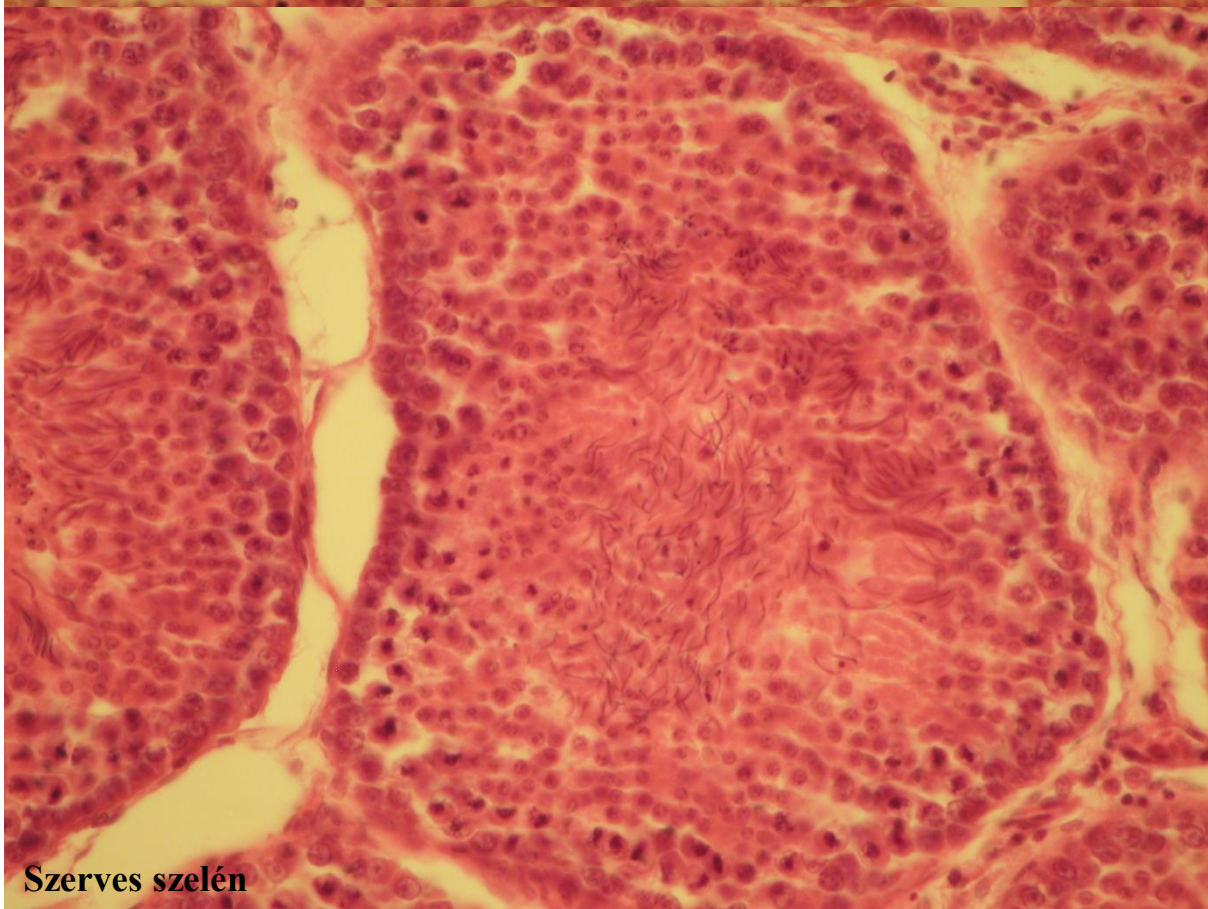
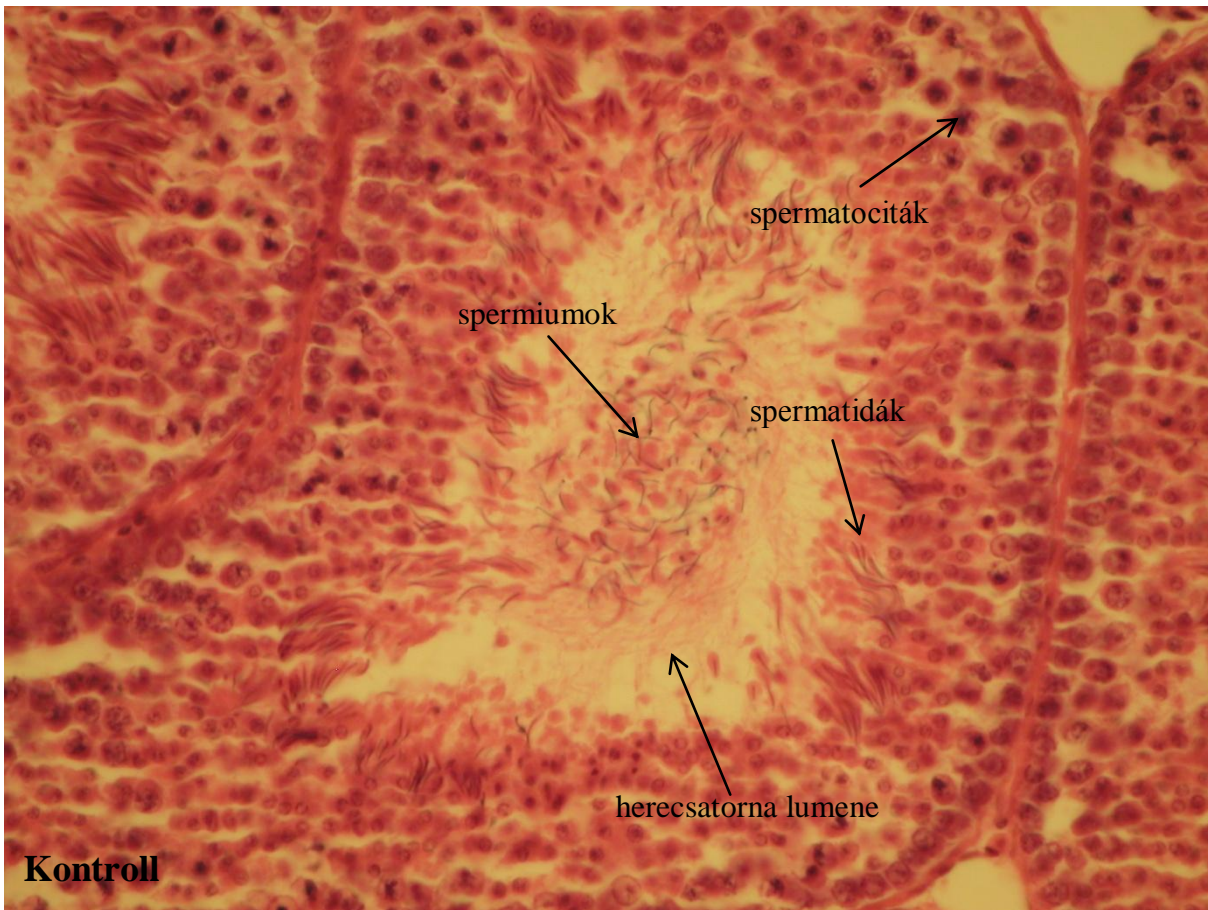
222. **Wimsatt, W.A. (1944):** Further studies on the survival of spermatozoa in the female reproductive tract of the bat. *Anat. Rec.* 88: 193.
223. **Wingfield, J.C. (1994):** Modulation of the adrenocortical response to stress in birds. In: Davey, Peter, Tobe (eds.) *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Nat. Research Council of Canada, Ottawa, 500-528.
224. **Wishart, G.J. and Ashizawa, K. (1987):** Regulation of motility of fowl spermatozoa by calcium and cAMP. *J. Reprod. Fertil.* 80: 607-611.
225. **Wishart, G.J., Staines, H.J. and Steele, M.G. (1992):** A method for predicting impending fertility in naturally-mated chickens and demonstration of gross variation in sperm transfer efficiency. *Proc. World Poultry Science Congress* 19(1): 631-634.
226. **Wishart, G.J. and Wood L.K. (1994):** Quantitation of holes hydrolysed by spermatozoa in the perivitelline layer of laid eggs as a means of evaluating fertility. *Proceedings of the 9th European Poultry Conference*, Amsterdam, Vol. 1, pp. 312-313. Amsterdam, World's Poultry Science Association.
227. **Wishart G.J. (1997):** Quantitative aspects of sperm : egg interaction in chickens and turkeys. *Anim. Reprod. Sci.* 1997; 48:81-92.
228. **Wishart, G.J. and Staines, H.J. (1999):** Measuring sperm-egg interaction to assess breeding efficiency in chickens and turkeys. *Poult. Sci.* 78: 428-436.
229. **Wishart, G.J. and Horrocks, A.J. (2000):** Fertilization in birds. Pp. 193-222. In J.J. Tarin and A. Cano (eds), *Fertilization in Protozoa and Metazoan Animals: Cellular and Molecular Aspects*. Springer Verlag, Berlin.
230. **Wishart, G. J., Young, M. and Staines, H. J. (2004):** Weekly monitoring of broiler breeder flock mating efficiency by sperm transfer into eggs. *Br. Poult. Sci.* 45 (3): 400-403.
231. **Wu, A.S., Oldfield, J.E., Shull, L.R. (1979):** Specific effect of selenium deficiency on rat sperm. *Biol. Reprod.* 20(4):793-798
232. **Yanagimachi, R. (1994):** Mammalian fertilization. Pp. 189-317. In E. Knobil and J.D. Neill (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press: New York.
233. **Yoshimura, Y., Das, S. C. and Isobe, N. (2008):** Significance of TGF β isoforms and their receptors in utero-vaginal junction of hen oviduct for sperm storage. *Proc. XII. World's Poultry Congress*, 2008; PL. 12. CD, 601. p. Brisbane, Australia, 30 June – 4 July, 2008.
234. **Yu, M. W., Robinson, F. E., Charles, R. G. and Weingardt, R. (1992):** Effect of feed allowance during rearing and breeding on female broiler breeders. 2. Ovarian morphology and production. *Poult. Sci.* 71:1750-1761.

235. **Zaniboni, L. and Bakst, M.R. (2004):** Localization of aquaporins in the sperm storage tubules in the turkey oviduct. *Poult. Sci.* 83: 1209-1212.
236. **Zlotnik, I. (1947):** The cytoplasmic components of germ-cells during spermatogenesis in the domestic fowl. *Quart. J of Morph. Sci.* 88: 353-365.
237. **Zoltán, P. (2011):** A nemzetközi baromfiipar termelési előrejelzései hosszabb távra. In: *Baromfi Hírmondó. Az Agrofeed KFT. Baromfi Hírlevele.* 2011. 2. negyedéves szám. p. 2-5. www.agrofeed.hu/NTPDF/05-10-2011_baromfi3.pdf
238. **Zulkifli, I., Siegel, H.S., Mashaly, M.M., Dunnington, E.A., Siegel, P.B. (1995):** Inhibition of adrenal steroidogenesis, neonatal to subsequent fasting in chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97(1): 49-56.
239. **Zulkifli, I., Siegel, P.B. (1995):** Is there positive side to stress? *World's Poult. Sci. J.* 51: 63-76.

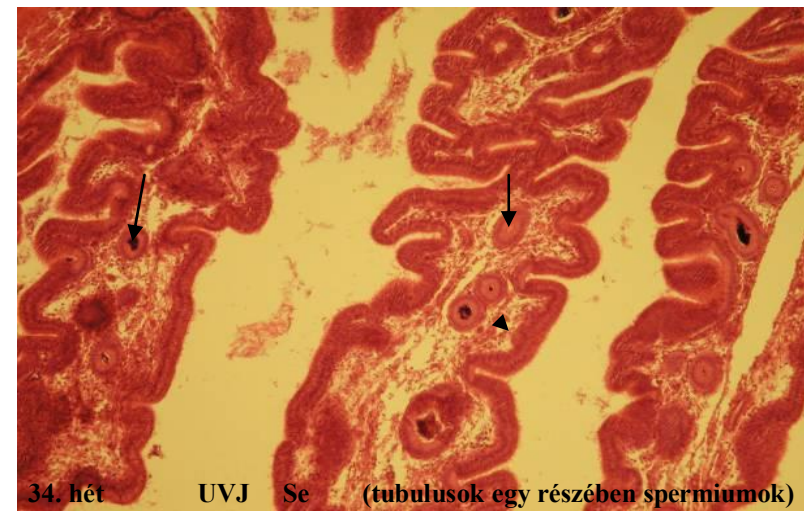
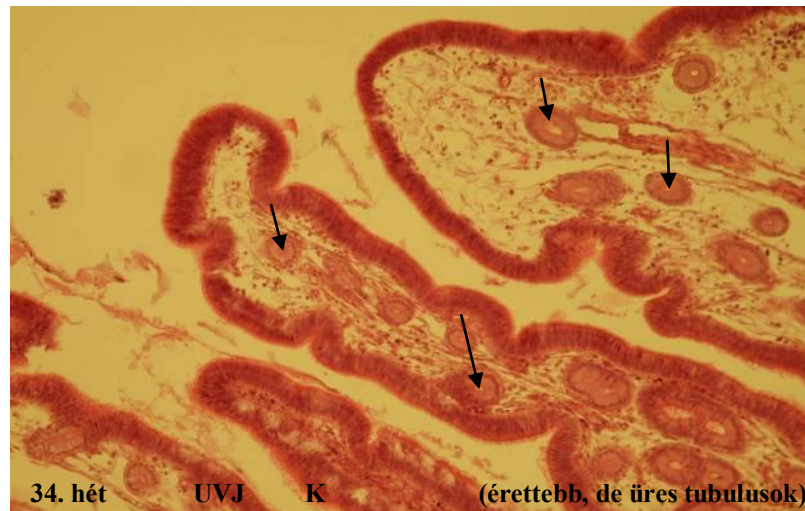
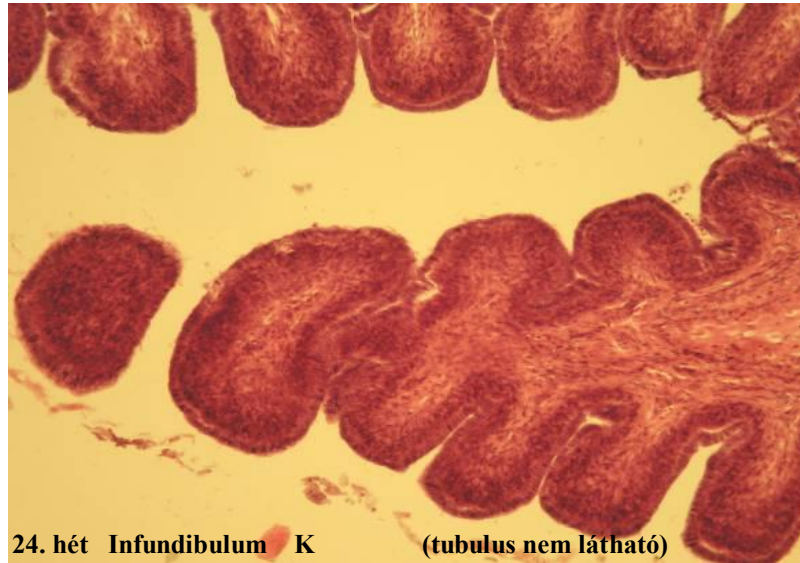
9. HERE SZÖVETTANI METSZETEK A KONTROLL ÉS KEZELT CSOPORTBAN (2. SZÁMÚ MELLÉKLET)



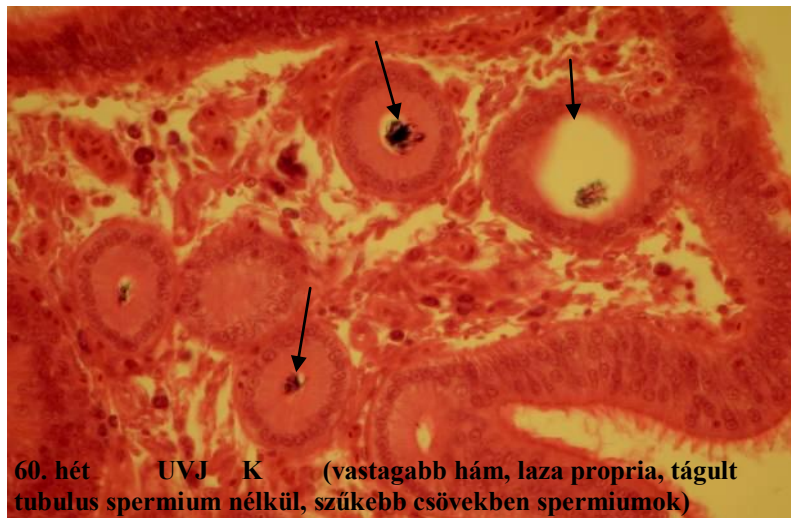
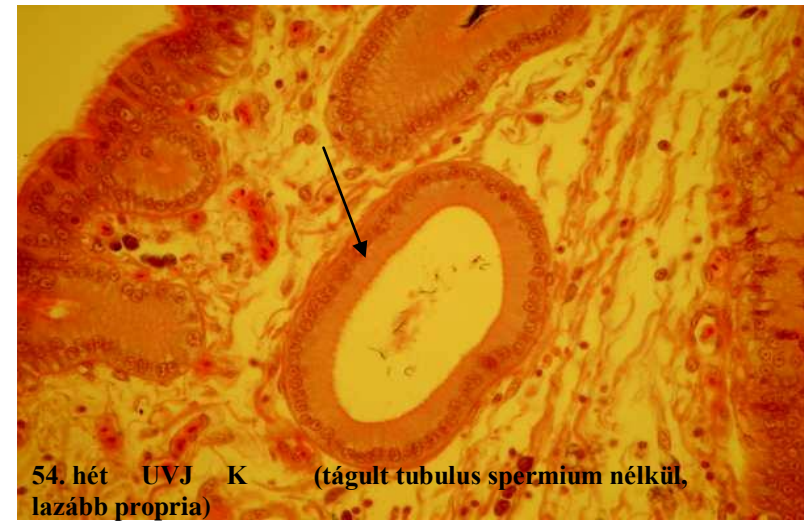
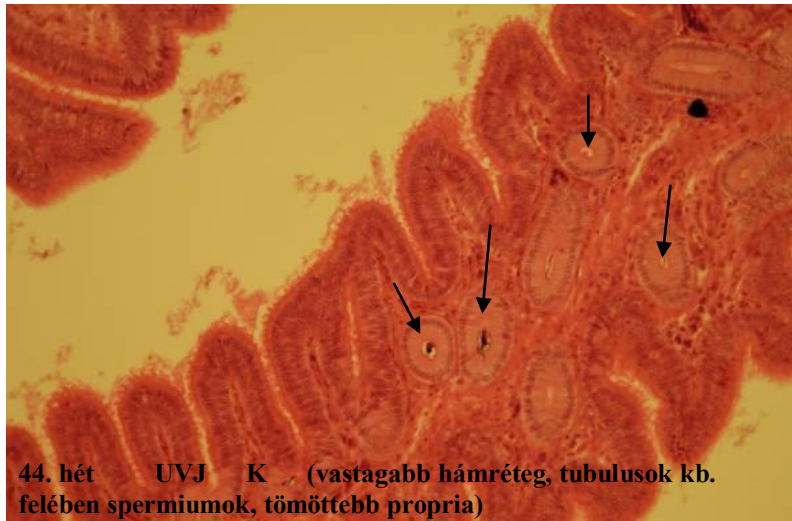




10. A SPERMIUMTÁROLÓ TUBULUSOK SZÖVETTANI METSZETEI A KÜLÖNBÖZŐ ÉLETHETEKEN (3. SZÁMÚ MELLÉKLET)



3. számú melléklet



11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Munkám során, mely dolgozatom alapját jelentették, nagyon sok segítséget kaptam, melyekért hálával és köszönettel tartozom.

Először témavezetőmnek, **Dr. Barna Juditnak** szeretnék köszönetet mondani, hogy a kezdetekkor ismeretlenül is bizalommal volt irántam. Köszönöm a támogatását, a segítségét, azt hogy - az olykor rögzös úton mely e dolgozat megírásáig vezetett - biztosította a feltételeket és a családi légkört.

Nagyon köszönöm **Váradi Évának** a mérhetetlen sok segítséget a kísérletek kivitelezésében és a lelki támogatást.

Köszönöm **Dr. Ferencziné Dr Szőke Zsuzsannának**, hogy munkájával és ötleteivel segített és támogatott.

Köszönöm **Dr. Péczely Péternek**, hogy megszeretette velem a szaporodásbiológiát és hogy kérdéseimmel bármikor bizalommal fordulhattam hozzá.

Köszönöm **Dr. Liptói Krisztinának** a propidium-jodidos festések során nyújtott munkáját, és támogatását.

Köszönöm **Szabó Zsuzsának**, hogy a kísérletek során bármikor számíthattam a segítségére. Továbbá köszönet a KÁTKI összes dolgozójának az együtt eltöltött évekért.

Végezetül hálás köszönettel tartozom **édesanyámnak**, aki nélkül el sem kezdhettem volna tanulmányaimat. Szeretettel köszönöm **férjemnek** és **gyerekeimnek** a hozzám való türelmet, megértést és támogatást.