

SİĞİRLARDA DÖL VERİMİNİN DENETİMİNDE YENİ BİYOKİMYASAL VE BİYOTEKNOLOJİK METODLAR

Yrd. Doç. Dr. Ömer AKBULUT ()*

Doç. Dr. Naci TÜZEMEN ()*

Prof. Dr. Hakkı EMSEN ()*

Giriş

Sığır yetiştiriciliğinde verimliliği etkileyen en önemli faktörlerden biri döl verimidir. Döl verimi, yavru verimi vasıtasıyla doğrudan bir gelir unsuru olduğu gibi, süt ve et verimleri döl verimine bağımlılık göstermektedir. Ayrıca döl verimi ithal yoluyla getirilen ırkların uyum ve adaptasyon yeteneklerinin önemli bir ölçüsüdür. Bunların yanında seleksiyonun etkili bir şekilde uygulanması ve genetik ilerleme sağlanması için de sürünün normal döl verimine sahip olması gereklidir. Bu nedenlerle verimli ve ekonomik sığır yetiştiriciliği ancak normal döl verimine sahip sürülerde gerçekleştirilebilir.

Uzun yılları kapsayan çalışmalar sonucunda:

Buzağılama aralığı.....: 365 - 385 gün.

Aşım indeksi.....: 1.4 - 1.6

Servis periyodu.....: 60 - 90 gün.

NRR (Non Return Rate)/60.....: % 60 - 65

Gebe kalma oranı.....: % 80 - 90

Buzağılama oranı.....: % 85 - 90

olan sığır sürülerinde döl veriminin normal olduğu kabul edilmiştir.

Bu parametrelerin yukarıda verilen sınırlar içinde gerçekleşmesi her şeyden önce kızgınlıkların yeterli takip edilmesine, aşımın veya sun'i tohumlamamanın zamanında yapılmasına, hayvanın gebe kalıp kalmadığının belirlenmesine ve eğer hayvan gebe kalmamış ise nedeninin zamanında tespit edilmesine bağlıdır.

Sığırlar klinik olarak buzağılamadan 21 gün sonra kızgınlık gösterebilir ve gebe kalabilirler. Ancak biyolojik dinlenme süresi 42 gündür. Sığır yetiştiriciliğinde maksimum fayda sağlayabilmek için dinlenme periyodunun 42 günden az olması istenmez. Yine 90 günden uzun servis periyodu verimliliği olumsuz yönde etkiler. Çok yıllık araştırma sonuçlarına göre son aşımında 8 - 10 hafta sonra yapılan kontrollerde gebe kaldığı zannedilen ineklerin % 10-15'inin gebe olmadığı tespit edilmiş ve bu oranın normal olduğu kabul edilmiştir. Döl verimi problemi olan sürülerde bu oran % 20 - 30'un üzerindedir.

Eğer bir hayvanın gebe olmadığı zamanında tespit edilebilirse, hayvanın gebe kalmamasının sebebi araştırılarak gerekiyorsa tedavisi yapılarak yeniden

(*) Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü.

boğaya verilebilir. Gebe kalmayan bir ineğin geç belirlenmesi veya hiç belirlenememesi durumunda ise veterinerlik hizmeti ve gecikmiş gebelik rantabil olmayacaktır. Bu da yetiştirme kayıplarına yol açacaktır.

Gebe kalan hayvanlarda embriyonal gelişmenin sağlıklı devam etmesi doğumun normal gerçekleşmesi döl verimi ve yavru verimine etkili diğer unsurlardır.

Yetiştiricilik açısından diğer önemli bir nokta doğan buzağının genotipik yapısı ve cinsiyetinin yetiştiricinin yetiştirme hedef ve amacına uygun olup olmadığıdır. Ayrıca doğan buzağının pazara sevkedilebilir büyüklüğe ulaşması da önemlidir.

Yukarıda kısaca değinilen noktalarda döl veriminin daha etkin ve verimli hale getirilmesi için geliştirilmiş ve geliştirilmekte olan bir seri biyokimyasal ve biyoteknolojik metodlar mevcuttur. Nieman (1991), daha çok embriyo transferi ile ilgili bu teknikleri aşağıdaki gibi sınıflandırmıştır.

a. Rutin olarak kullanılan teknikler

1. Sun'i tohumlama
2. Kızgınlıkların senkronizasyonu
3. Doğumların sevk ve idaresi
4. Embriyo transferi

b. Kısa süre önce kullanıma sunulan teknikler

1. Embriyoların derin dondurulması
2. Embriyoların ayırımı

c. Pratikte kullanım eşiğinde olan teknikler

1. Embriyolarda cinsiyet tayini
2. Embriyoların in-vitro üretimi
3. Kolon embriyo üretimi

d. Gelecekte kullanımı hedeflenen teknikler

1. Gen transferi
2. Kimare

Döl veriminin iyileştirilmesinde etkili olan ve pratikte kullanıma sunulan biyokimyasal bir metotta süt ve kanda Progesteron Test'i dir. Gebelik teşhisi için kullanılan bu metod döl veriminin denetimi için birçok noktaları da aydınlatmaktadır.

Bu çalışmada gebelik teşhisinde kullanılan metodlar ve süt progesteron testi, sütte progesteron hormonunun kızgınlık siklusuna bağlı olarak değişimi, testin yürütülmesi ve yorumlanması konuları irdelenecektir. Ayrıca embriyo transferinin yetiştiricilik hedeflerine uygun olarak gerçekleşmesini sağlayan embriyolarda cinsiyet tayini teknikleri anlatılacaktır.

SİĞİRLARDA GEBELİK KONTROLU VE PROGESTERON TESTİ

Sığırılarda gebeliğin teşhisi için çeşitli metod ve belirtilerden yararlanılmaktadır. Bunlar Hahn (1987) tarafından iki ana grupta toplanmıştır.

- a. Güvenilir olmayan metod ve belirtiler
 1. Karnın dıştan muayenesi veya elle yoklanması.
 2. Kızgınlığın tekrür etmemesi.
 3. Vulva dudaklarının büzülmesi.
 4. Spekulum ile vaginal teşhis.
 5. Kanamalı akıntının kesilmesi.
 6. Süt veriminin azalması ve davranış değişiklikleri.
- b. Kesin olmayan metodlar
 1. Kanda ve idrarda hormon analizi
 2. Ekografi.
 3. Ultrason (Ultra-sound) test.
 4. Süt-Progesteron testi.

Gebeliğin en güvenilir teşhisi şüphesiz rektal muayene ile yapılır. Ancak bu iş genital organların anatomisi fizyolojisi hakkında yeterli bilgiye sahip olmanın yanında tecrübeyide gerektirir. Bu nedenle rektal muayeneden ancak bu konuda uzman kişiler doğru sonuç alabilirler.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Süt-Progesteron Test metodunun güvenilir sonuçlar verdiği tespit edilmiştir ve bazı sun'i tohumlama istasyonlarında bu test rutin olarak yürütülmektedir. Alačam ve ark. (1987 a; 1987 b) birçok çalışmaya atfen testin doğruluk oranının gebe olmayan ineklerde % 95-100 gebe ineklerde ise % 74-94.2 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar bu oranları kendi araştırmalarında sırasıyla % 83-84 ve % 100 olarak tespit etmişlerdir.

Progesteron Hormonunun Gebelik ve Kızgınlık Siklusundaki Değişimi

Progesteron hormonu yumurtalıkta (ovaryum) yer alan sarı cisim (corpus luteum) tarafından üretilir ve kana verilir. Kandan da diğer vücut sıvılarına geçerek sütte bu sıvılardan biridir. Progesteron süt içinde 1 ng/ml (n2 = nanogram) dan az ve en fazla 40-50 ng/ml kadar iz konsantrasyonda bulunur.

Sarı cisim kızgınlıktan ve ovulasyondan sonra oluşur. Progesteron üretimi kızgınlıktan sonra artarak devam eder ve genellikle siklusun 3. gününde çoğu kez 5-6. günde 5 ng/ml sınırını aşar. Bu durum sarı cismin aktif olduğunu gösterir. Sarı cismin ürettiği progesteron hormonunun görevi, döllenmiş yumurtanın beslenmesi için uterus içi sıvısının (uterus sütü) optimizasyonunu sağlamaktır. Sarı cisim kızgınlıktan sonra süratle gelişir ve ovaryum üst yüzeyine doğru yükselir. Döllenme olmadığı zaman siklusun sonunda sarı cisim kaybolur ve hormon üretiminde kesilir. Progesteron seviyesi 20-40 ng/ml'lik yüksek değerden siklusun 16-19. günlerinde 5 ng/ml değerinin altına

iner. Eğer yumurta hücre döllenirse sarı cisim stabil kalır ve progesteron üretimi devam eder. Progesteronun bu durumdaki görevi gebeliği korumak ve yeni kızgınlıkların ortaya çıkmasını engellemektedir.

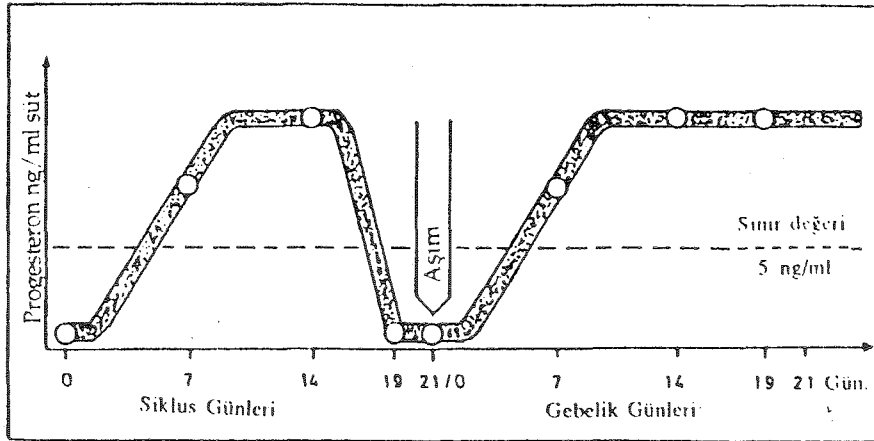
Sütte Doğrudan Progesteron Testi

Progesteron kan ve sütteki miktarı kızgınlık siklusu boyunca büyük değişiklik gösterir. Kızgınlık döneminde düşük değerde gebelik döneminde ise yüksek değerde bulunan progesteronun sütteki değişimi şekil 1'de verilmiştir.

Progesteron miktarı Enzim Immunoassay (EIA) veya Radio Immunoassay (RIA) gibi biyokimyasal metodlarla ölçülerek visual veya fotometrik olarak belirlenmektedir. Enzim Immunoassay metodunda örnekte çok az oranda progesteron belirlenmektedir. Enzim Immunoassay metodunda örnekte çok az oranda progesteron varsa renk visual olarak koyu, buna karşılık yüksek oranda progesteron mevcut ise renk açıktır. Bu basit değerlendirme ile sonuca varmak mümkün ise de testin güvenilirliği için renklenme objektif olarak fotometre ile ölçülmelidir. Bu iş için sütle filtrefotometre süt serumunda ise mikrotiter-fotometre metodunun kullanımı tavsiye edilmektedir.

a. Örnek Alımı: Test için 5-10 ml'lik süt tüpleri önceden hazırlanır ve identifikasyon için etiketlenir. Süt örneği sağım esnasında, sağımın ortasında veya sağımın son döneminde alınır. Örnek olarak kesinlikle ilk sağım sütü veya ön sağım sütü alınmamalıdır. Bilakis son sağım sütü tercih edilmelidir.

Süt örneğinin alımını takiben etiket üzerine tanıtıcı bilgiler (inek numarası, ırk, tarih, siklus günü, işletme vb.) yazılır. Daha sonra tüpler uygun taşıma kaplarına konarak en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılır. Örneklerin taşınması ve saklanması soğuk hava zincirine riayet edilir.



Şekil: 1. Siklusta veya gebelikte progesteron değişimi

b. Testin Yürütülmesi: Progesteron testinde kimyasal madde olarak bu amaç için hazırlanmış değişik kitler kullanılmaktadır. Test için deney ekipmanı olarak soğutucu veya derin dondurucu, mixser, su banyosu, otomatik veya yarı otomatik pipetler ve aksesuar laboratuvar aletleri yanında fotometre gerekli olmaktadır. Testin adım adım yürütülmesi büyük oranda kullanılan kit'e bağlılık gösterir. Dolayısıyla testin laboratuvarında yürütülmesinde seçilen kit'in uygulama yönergesinden faydalanılır.

c. Test Sonucunun Yorumlanması: Gerçek kızgınlık (siklusun 0. günü) progesteron seviyesi çok düşük olmalıdır (5 ng/ml'den az). Kızgınlık veya aşım günü alınan örnekte progesteron seviyesinin yüksek olması kızgınlık tespitinin doğru veya aşımın zamanında yapılmadığını gösterir.

Aşımı takip eden 7. günde ve 19. günde progesteron seviyesi yüksek ise (5 ng/ml'den fazla) % 80 ihtimalle gebelik sağlanmıştır. 7. günde progesteron seviyesi yüksek 19. günde düşük ise döllenme sağlanmamış kızgınlık siklusu yeniden başlamaktadır.

Siklusun 7. günde progesteron seviyesi düşük ise ovulasyon gerçekleşmemiş olabilir, dolayısıyla folikül kistleri teşekkül etmiş olabilir. Çünkü sarı cisim oluşmamıştır ve siklus da mevcut değildir. Kistlerin mevcut olması durumunda 14. ve 19. günlerde yapılan testlerde de düşük progesteron değeri tespit edilir. Eğer 14. günde progesteron değeri yükselmişse ya o-vulasyon gecikmiştir ya da aşım çok erken yapılmıştır. Bu durumda gebeliğin sağlanması şansı son derece zayıftır.

Siklusun normal devam etmesi durumunda (Progesteron seviyesi 0. günde düşük 7. ve/ya 14. günlerde yüksek) 19. günde progesteron seviyesi düşük ise hayvan 1-3 gün içinde yeniden kızgınlık gösterecektir. 19. günde progesteron değeri yüksek ise yukarıda belirtildiği gibi hayvanda % 80 ihtimalle gebelik sağlanmıştır. Kızgınlık siklusunun değişik günlerde yapılan testlerden elde edilen sonuçların yorumlanması Şekil 2'de şematize edilmiştir.

Sığırlarda gebelik tespiti için kullanılan süt progesteron testinin sağladığı diğer faydalar aşağıdaki gibi sıralanabilir.

1. Aşımın veya sun'i tohumlamanın zamanında yapılıp yapılmadığını belirler.
2. Kızgınlık siklusunu ve döllenme durumunu takip etme şansı sağlar.
3. Genital organlardaki kistler, enfeksiyonlar ve ovulasyonun gecikmesi durumlarının tespitine yardımcı olur.
4. Hayvanın kızgınlık göstereceği zamanın önceden belirlenmesini sağlar.
5. Gebeliğin erken dönemde tespitinin yanında kızgınlıkların yeterli takip edilip edilmediğine ışık tutar. Ayrıca gebeliğin sağlanamaması durumunda alınması gereken tedbirlerin ve yapılacak tedavinin belirlenmesine yardımcı olur.

Progesteron Değişimi	Sonuç
<p>5 ng/ml</p> <p>0 7 19 Gün</p>	<p>Gebe (% 80) ihtimalle</p> <p>Gebelik yok</p>
<p>5 ng/ml</p> <p>0 7 Gün</p>	<p>Kızgınlık gerçek değil</p>
<p>5 ng/ml</p> <p>0 7 14 Gün</p>	<p>Erken aşım veya Geç ovulasyon</p> <p>Siklus yok</p> <p>Kırt problemi?</p>

Şekil 2. Progesteron Testi Sonucunun Yorumlanması

EMBRYOLARDA CİNSİYETİN BELİRLENMESİ

A. Cinsiyeti Belirlemenin Önemi

Son yıllarda biyoteknolojideki gelişmelere paralel olarak embriyo transferi ve onunla ilişkili teknikler vasıtasıyla hayvansal üretim ve özellikle hayvan ıslahında önemli gelişmeler sağlanmıştır. Bu tekniklerden biride yakın zamanda uygulama alanına giren ve sığırlarda implantasyon öncesi embriyo cinsiyetinin belirlenmesidir.

Sığır embriyolarında implantasyon öncesi cinsiyetin belirlenmesi sağladığı birçok faydalarla yetiştiricilik açısından ekonomik öneme sahiptir. Cinsiyet tayini ırka, işletmeye, işletme büyüklüğüne, ayrıca üretim ve ıslah hedeflerine uygun cinsiyette, buzağı ihtiyacını düzenler. Et üretiminde erkek hayvanlar dişilere göre daha yüksek ağırlık artışları ve karkasta daha düşük yağ oranı sebebiyle tercih edilirken, süt sığırcılığında dişi buzağular tercih edilmektedir. Embriyolarda cinsiyetin implantasyondan önce belirlenmesiyle üretim hedefine uygun buzağı elde edilecektir. Yine implantasyondan önce cinsiyetin belirlenmesiyle damızlık olarak seçilecek buzağular için daha az sayıda inek kullanılacak ve diğer damızlık inekler et ırkları ile çiftleştirilebilecektir. Ayrıca damızlıkta kullanılan ineklerin hepsinden dişi buzağuların elde edilmesi, genotipik değeri yüksek hayvanların seçimi için seleksiyon intensitesini dolayısıyla seleksiyonun başarısını arttıracaktır.

Cinsiyetin belirlenmesinin diğer bir faydası çoklu doğumların gerçekleştirilmesine imkan vermesidir. Et sığırlarında anaç ineklerin bakım masrafı et üretimi toplam masrafının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Düzenli ikiz doğumlarla bu masraf % 60-70 oranında azaltılabilir. Masraf azaltımı süt sığırcılığı içinde geçerlidir. Taşıyıcı inek başına iki embriyonun transferiyle doğumların % 60'ının ikiz olarak gerçekleşmesi mümkündür. Ayrıca süt sığırcılığında her iki buzağının aynı cinsiyette olması önemlidir. Çünkü uterusta dişi fötüsün yanında erkek fötüsün mevcudiyeti Freemartin olayına

sebebi

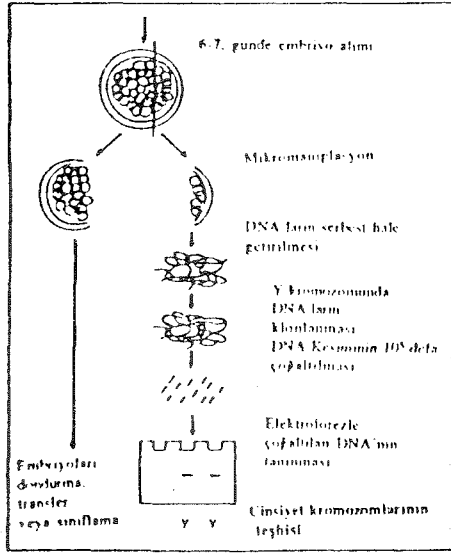
olur. Fakat cinsiyeti belirli embriyolarla aynı cinsiyetteki embriyoların implantasyonu bu problemi ortadan kaldıracaktır.

Cinsiyet tayini taze ve dondurulmuş embriyo ihtiyacının belirlenmesinde de faydalı olmaktadır. Yetiştirici erkek ve dişi buzağı ihtiyacını belirleyebiliyorsa buna bağlı olarak embriyo ihtiyacını belirleyecektir ve embriyo saklamada veya temin etmede israfa girmeyecektir.

Cinsiyet tayininin in-vitro çalışmalarda ve kolon üretiminde de özel bir yeri vardır. Özellikle koloni üretiminde bir ferden çok sayıda kopyası üretileceğinden ferden seleksiyonunda, seçiminde ilk kriter ferden cinsiyeti olacaktır.

b. Cinsiyetin Belirlenmesi

Birçok hayvan türünde cinsiyet kromozomunun kombinasyonuyla belirlenmektedir. Memeli hayvanlarda erkek hayvan iki ayrı tip cinsiyet kromozomu .XY, taşıırken dişiler iki aynı tip .XX, kromozomu taşırlar. Y koromozomu üzerinde bir gen bulunurki bu gen erken embriyonal dönemde erkek hücre dokularının gelişmesini determine ederek erkek cinsiyetin ortaya çıkmasına sebep olur. Embriyoda cinsiyetin belirlenmesinde direkt veya indirekt olarak bu Y kromozomunun tanınmasına çalışılır.



Şekil: 3. Sığır Embriolarında Cinsiyet Tayini

Cinsiyetin belirlenmesinde değişik metodlardan yararlanılmaktadır. Sığırlarda embriyo transferinden önce immunolojik reaksiyon metodu yardımıyla cinsiyet belirlenmektedir. Erkek embriyolarda bulunan bir HY intijeninden yararlanılarak uygun antikorla reaksiyon sonucu ortaya çıkan renklenme kullanılarak cinsiyet belirlenebilmektedir. Ancak bu methodda embriyodan alınan hücrelerin iyi kalitede olması gerekir. Aksi halde antijen antikor reaksiyonundan doğru sonuç alınamayabilir.

Bir diğer metod ise Fare embriyolarında geliştirilmiştir ve X kromozomuna bağlı Glikoz 6 fosfat dehidrogenaz enziminin kullanılmasıdır. Renklenme reaksiyonunda dişi embriyolar er-

keklerden daha fazla renklenirler. Bu metod yardımıyla sığır embriyolarında cinsiyetin belirlenip belirlenemeyeceği henüz araştırma safhasındadır.

Sığır embriyolarında cinsiyeti belirlemede kullanılan ve pratiğe aktarılan bir diğer metotta moleküler-genetik tekniklerden yararlanılmaktadır. Bu metotta erken embriyonal dönemde (7. günde) mikromanipulasyonla embriyodan bir miktar hücre alınır (5-10 hücre). Alınan bu hücreler sentetik olarak hazırlanmış bir çözelti içine yerleştirilirler. Bu hücreler DNA zincirinde Y kromozomunun tespiti sağlanır. Yani 95, 56 ve 72 °C'lik farklı sıcaklıklarda 40-50 devirde enzimatik bir muamele ile Y kromozomundan DNA kesiminin selektif bir çoğaltımı gerçekleştirilir. Daha sonra çoğaltılan DNA elektroforesizde yürütülür, flouurlu bir boya ile renklendirilerek sonuç gözlemlenir. Bu metod Şekil 3'de şematik olarak verilmiştir.

Bu biyomoleküler metotla çok sayıda embriyoda aynı anda cinsiyet tayini yapılabilir. Cinsiyet tayini yapılmış taze embriyolarda embriyo transferi embriyonun yıkanmasından 8 saat sonra yapılabilir. Embriyolardan mikromanipulasyonla hücre ayırımı ve cinsiyetin belirlenmesi kullanılan embriyoya zarar vermez, implantasyon şansını azaltmaz. Yine bu embriyoların derin dondurulması da mümkündür.

KAYNAKLAR

- Alaçam, E., Tekeli, T., Sezer, A.N., 1987 a. İneklerde erken gebelik tanısı amacıyla kan ve sütte progesteron hormonu düzeylerinin araştırılması. S.Ü. Vet. Fak. Derg. 3 (1) 13-14.
- Alaçam, E., Tekeli, T., Türkaslan, T., 1987 b. İneklerde erken gebeliğin enzim immunoassay kiti ile pratik tanısı. Lalahan Hay. Arşt. Enst. Derg. 27 (1-4) 12-18.
- Agrawala, P., Wagner, V., Fischer, A., Geldermann, H., 1991. Geschlechtsdiagnose bei Embryonen wird praxisreif. Schwabischer Bauer 16: 28-29.
- Arnstadt, K.I., 1987. Progesterontest, Der Brunst auf der Spur. Fruchtbarkeit im Kuhstall, Top Agrar (Extra): 80-82.
- Arnstadt, K.I., 1990. Şahsi görüşme, Schneeglockchenstr. 55 8000 München 50. Deutschland.
- Hahn, R., 1987. Trächtigkeituntersuchung. Gewissheit breits nach sechs Wochen. Fruchtbarkeit im Kuhstall, Top Agrar (Extra): 86-88.
- Hahn, J., 1987. Neue Biotechniken beim Rind, Die Zukunft hat schon begonnen. Top Agrar (Extra): 102-103.
- Galler, J. 1987. Fruchtbarkeit beim Rind. p: 23-27, ISBN: 3-7020. 0523-4 Stuttgart Deutschland.
- Neimann Von, H., 1991. Entwicklungsstand von Embryotransfer und assoziierten Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Züchtungskunde, 63 (3) 183-190.