

Redaksioneel

Kunsmatige teelmetodes by diere. Navorsing en praktiese toepassing loop hand aan hand

J.F.W. Grosskopf

Departement Veterinêre Fisiologie, Universiteit van Pretoria, Privaatsak X4, Onderstepoort 0110

Die doel met die verwekking van sogenaamde „proefbuisbabas”, of *in vitro*-bevrugting, by mense is primêr daarop gemik om kinderlose egpare te help om kinders van hul eie te hê. Die tegniek word dus gebruik om sommige vorms van fisiese onvrugbaarheid te oorbrug.

Anders as by mense, is die doel van kunsmatige voortplantingsmetodes by diere nie daarop gemik om onvrugbaarheid te oorbrug nie, maar wel om genetiese verbetering vinniger teweeg te bring. Van die tegnieke wat reeds op groot skaal (veral by beeste) aangewend word, is kunsmatige inseminering, ovulasiesinchronisering, embryo-oorplasing, embrioverdeling en embriobevriëring. Ander wat nog in die eksperimentele fase is, is kloning, die skepping van chimeras en die oorplanting van wenslike, of die verwydering van ongewenste, gene.

Hedendaagse metodes om genetiese verbetering van plaasdiere teweeg te bring is steeds om die beste (t.o.v. wenslike eienskappe) met die beste te paar. Hoe minder eienskappe daar gelyktydig voor geselekteer word, hoe vinniger is die vordering met daardie eienskappe. Weens vervoerafstande is dit dikwels nie prakties moontlik om die beste bul van 'n ras by die beste koeie te bring nie. Kunsmatige teelmetodes kan egter dié probleem oorkom. Die getal nakomelinge wat 'n uitstaande bul of koei onder natuurlike omstandighede kan voortbring, is boonop beperk. Onder gewone plaastoestande bring 'n bul selde meer as 20 tot 40 kalwers per jaar voort en 'n koei slegs 'n enkele kalf. Met só min nakomelinge is sinvolle nageslagtoetsing nie moontlik nie en word 'n meerderwaardige teeldier dikwels eers na sy/haar dood ontdek. Ook hierdie probleem kan tot 'n groot mate deur kunsmatige teelmetodes oorkom word.

Kunsmatige inseminering. Hierdie tegniek word reeds sedert 1950 op groot skaal in Suid-Afrika onder beeste en skape toegepas. Aanvanklik was dit gebruiklik om die verspreiding van veneriese siektes onder beeste te beperk, maar deesdae word dit hoofsaaklik vir die doel van veeverbetering aangewend.

Waar minstens een uit elke 40 bulkalwers wat gebore word, vir natuurlike teeldoelindes gehou moet word, is slegs een uit elke 2 000 tot 2 500 van die bulkalwers nodig om dieselfde getal koeie deur kunsmatige inseminering (KI) te bevrug. As doeltreffende seleksiemetodes gebruik word om die beste bulle te identifiseer is dit dus voor-die-hand-liggend dat dié bulle wat vir KI uitgesoek word, beslis geneties-meerderwaardige bulle behoort te wees.

In die beginjare was daar nog nie metodes bekend om semen (bulsaad) vir langer as ongeveer drie dae te bewaar nie. Dit het die gebruik van die tegniek baie beperk. In 1949 het Polge¹ en medewerkers per ongeluk ontdek dat sperme bevrugting en ontduoing kan oorleef, mits gliserol by die saad gevoeg word om die vorming van yskristalle te voorkom. Sedertdien is verskeie metodes ontwikkel wat dit moontlik maak om derduisende dosisse bulsaad in termoskanne by -196°C vir onbepaalde tye onder vloeibare stikstof te bewaar.

Ovulasiesinchronisering. Die doel met die sinchronisering van die geslagsiklusse van koeie is tweërlei. By veldbeeste, waar dit nie altyd prakties moontlik is om die koeie gedurig dop te hou vir tekens van bronsigheid sodat hulle op die regte tydstip geïnsemineer kan word nie, kan die tegniek bydra om 'n hoër persentasie van die koeie se ovulasietye binne een of twee dae te groepeer. Die ander toepassingsveld vir die tegniek is by embryo-oorplasing waar dit noodsaaklik is dat die skenker-en ontvangerkoeie binne enkele ure van mekaar moes ovuleer.

Gesinchroniseerde ovulasietye kan met twee groepe middels met teenoorgestelde uitwerkings bereik word. Die een groep is die progestogene wat dieselfde uitwerking as die natuurlike hormoon, progesteron, het. Progesteron word deur die geelliggaampie (corpus luteum) op die eierstok afgeskei en is vir die rustige fase van die vroulike dier, tussen die bronsighedsperiodes, verantwoordelik. Indien progesteron of een van die sintetiese progestogene oor 'n termyn van ongeveer 17 dae aan 'n kudde nieldragtige koeie in verskillende stadiums van die geslagsiklus toegedien word, sal hulle gedurende daardie termyn nie bronsig word nie. Nadat die behandeling by al die koeie gelyktydig gestaak is, word die geslagsiklusse weer hervat en gewoonlik is die meeste van die koeie dan drie tot vier dae later bronsig en kan hulle geïnsemineer word.² Verskeie interessante toedieningsmetodes van die progestogene is al gebruik. Die middel kan met die diere se voer gemeng word, binnespiers ingespuut word, deur middel van maklik-verwyderbare intravaginale sponse of spirale toegedien word, of selfs in 'n geskikte draer onderhuids ingeplant en weer op 'n bepaalde dag verwyder word.

Die ander groep middels wat gebruik kan word, is prostaglandien $F_2\alpha$ of derivate daarvan. Hierdie hormoon, prostaglandien, word deur die baarmoeder gevorm wanneer bevrugting nie plaasgevind het nie

en is daarvoor verantwoordelik dat die aktiewe corpus luteum op die eierstok begin degenereer. Die corpus luteum skei dan nie langer progesteron af nie, met die gevolg dat die aktiewe fase van die vroulike siklus weer kan begin.

As sintetiese prostaglandien $F_2 \alpha$ in 'n koei met 'n aktiewe corpus luteum ingespuit sou word, sal dieselfde reaksie plaasvind en die koei behoort dan ongeveer 72 tot 96 h later bronstigheid te vertoon en te ovuleer.³

Embrio-oorplasing. Met die bevrugtingsproses verdeel die eisel of ovum in twee identiese dogterselle wat op hul beurt weer en weer verdeel om 'n embrio te vorm. Na 'n aanvanklike vrylewende stadium, wat van enkele dae tot selfs weke by verskillende diersoorte mag duur, groei die embrio se vrugvliese aan die baarmoeder vas (inplanting). Voor daardie stadium lê die embrio nog los in die eierleier of die baarmoeder en kan dit uitgespoel word en na die baarmoeder van 'n geskikte ontvangerdier oorgeplaas word. Dit ontwikkel dan verder en implanteer in die ontvangerdier se baarmoeder asof dit sy eie moeder is.⁴ Bloedvermenging tussen die fetus en die moeder se bloed vind nie plaas nie. Die kleintjie se genetiese samestelling is reeds tydens bevrugting vasgelê en bly dus soos dit was. 'n Rooi Afrikanerontvangerkoei kan dus geboorte skenk aan 'n swartbont Frieskalfie wat in die embrio-stadium op haar oorgeplant is.

Die bevrugte eisel of embrio is mikroskopies klein en word moeilik gevind. Om dié rede is die embrio aanvanklik uit die dun eierleier (Fallopiese buis) uitgespoel voordat dit na die baarmoeder migreer het. (By koeie is die derde dag van bevrugting die geskikste vir die doel). Minder spoelvog is nodig en die embrio word makliker daarin gevind. Die nadeel is egter dat die spoeling van die eierleier tydens operasie onder narkose gedoen moet word.

Mettertyd is 'n nie-chirurgiese metode ontwikkel wat tans algemeen gebruik word.⁵ 'n Spesiale tweekant spoelapparaat is ontwikkel wat die embrio(s) uit die baarmoeder kan uitspoel sonder om die skenkerkoei veel te ontstel. Die baarmoederspoeling word gewoonlik eers op die sewende dag na bevrugting gedoen wanneer die embrio reeds van die eierleier af deurbeweeg het.

Die embrio's word met 'n stereomikroskoop in die spoelvog opgespoor, vir lewensvatbaarheid ondersoek en dan een-een met 'n bietjie van die spoelvog in die baarmoeder van gesinchroniseerde ontvangerkoeie ingespuit.

Superoovulasie. Koeie produseer gewoonlik net een eisel met elke bronstigheid. Om meer eiselle van 'n gesogte koei te verkry kan sy met follikelstimulerende hormoon behandel word wat meer follikels en dus meer eiselle met die daaropvolgende bronstigheid sal laat vorm. Ongelukkig is daar by koeie nie 'n vaste korrelasie tussen die hormoon dosis en die aantal eiselle wat vorm nie en varieer die resultate nog baie. Gewoonlik kan daar op ongeveer agt eiselle na so 'n behandeling gereken word. Groot verliese vind egter plaas deur embrio's wat nie uitgespoel of gevind

word nie, eiselle wat nie bevrug word nie, embrio's wat nie geskik vir oorplasing bevind word nie, embrio's wat nie in die ontvangerkoeie ontwikkel en geïnplanteer word nie en daarbenewens ook moontlike latere vrugverliese by sommige van die ontvangerkoeie.

Die gemiddelde getal kalwers wat uiteindelik by die meeste van die gespesialiseerde embrio-oorplasing-sentrums uit die resultate van een spoeling gebore word, is maar net tussen twee en drie. Sover bekend, is die meeste lewendige kalwers wat nog na superovulasie uit een spoeling van 'n skenkerkoei voortgebring is, een-en-dertig.⁶

Embrioverdeling. Om nog meer embrio's vir oorplasing beskikbaar te hê, kan die skynbare lewenskragtige embrio's verdeel word. Dit gebeur ook in die natuur dat die selle van 'n embrio in twee groepe verdeel en dan elk aan 'n nuwe individu oorsprong gee. So 'n tweeling is dan altyd identies en het dieselfde genetiese samestelling.

Identiese tweeling het 'n besondere waarde vir navorsingsdoeleindes. Omrede hulle dieselfde reaksies op gelyke behandelings sal toon, is proefresultate met identiese tweeling, waar een van elke tweeling in 'n kontrolegroep en een in die behandelingsgroep geplaas word, soveel betekenisvoller.

Spesiale tegnieke is nodig om die mikroskopiese klein embrio te kan verdeel. Die tegniek moet uiteraard onder 'n mikroskoop uitgevoer word. 'n Glasbuisie wat in 'n vlam tot 'n dun kapillêre buisie uitgerek is, met 'n ligte suigkrag daarin, word gebruik om die embrio vas te suig en so te stabiliseer. Die omhulsel van die embrio (zona pellucida) is 'n relatief stewige doppie waarin die embrionale selle hulle bevind. Dié zona pellucida word dan met 'n uiters fyn en skerp glasmessie of wolframdraadjie wat d.m.v. elektrolise skerp gepunt is, oopgesny. Met 'n ander, nog fyner suigpypie as die stabiliseringspypie, word ongeveer die helfte van die embrioselle uitgesuig en in 'n ander lê zona pellucida gedeponeer.⁷ Die lê zona pellucida word van afgekeurde embrio's verkry. Weens die inherente stewigheid van die zona pellucida sluit die opening vanself en die twee helftes van die embrio kan daarna afsonderlik groei en ontwikkel as dit weer in 'n baarmoeder teruggeplaas word. Die verdeling van embrio's in vier is ook moontlik, maar effens minder suksesvol.

Bevriesing van embrio's. Vir die beste resultate moet embrio's so gou as moontlik lief binne twee ure na versameling na die ontvangerdiere oorgeplaas word. Daar was egter 'n behoefte daaraan om embrio's langer te kan bewaar en na baie proefnemings is uiteindelik daarin geslaag om embrio's te bevries.⁸ In die bevrore vorm kan embrio's vir onbepaalde tye bewaar word. Uiteraard moet sowel die bevriesings- as ontdooiingsprosedures met absolute akkuraatheid en versigtigheid uitgevoer word. Desondanks kom mislukkinge nog voor.

Die voordele van bevrore embrio's is dat hulle in dié vorm vervoer kan word en dat 'n gesinchroniseerde ontvangerkoei nie noodwendig op die dag van embrioversameling beskikbaar hoef te wees nie. Dit

bring mee dat bevrore embrio's eerder as teeldiere, van 'n ander land af ingevoer kan word. Dit maak dit ook moontlik dat embrio's later oor die toonbank verkoop sal kan word. As die embrio se geslag boonop a.g.v. chromosoomstudies vasgestel is, sal dit dus later moontlik wees dat 'n boer byvoorbeeld 15 vroulike Jersey-embrio's en 10 manlike Hereford-embrio's kan bestel om op sy gewone melkkoeie oor te plant. Met die Jerseyverskalwers kan hy 'n Jersey-stoetery begin en die Herefordbultalwers kan as slag-ossies grootgemaak word.

Kloning en chimeras. Kloning is waar 'n replika van 'n bestaande dier geproduseer word. Die nasaat moet dus net een ouer hê sodat hy dieselfde genetiese samestelling as die ouer sal hê. Teoreties is so iets wel moontlik as die kernmateriaal van die embrionale selle met kernmateriaal van dié besondere dier waarvan 'n replika gemaak moet word, vervang kan word.

'n Chimera is 'n organisme met selle van verskillende genetiese oorsprong. As twee embrio's van verskillende ouers verdeel sou word en die helfte van elkeen se selle sou op die ander oorgeplaas word en groei, sal twee chimeras verwek word.⁹ Elk van die twee chimeras sal dan twee vaders en twee moeders hê. Dit bied dus die moontlikheid om wenslike eienskappe van twee uitstaande vaders en twee hoogaan-geskrewe moeders in een dier te vermeng. Die bekende navorsingsgroep in Cambridge, Engeland, het ook al daarin geslaag om 'n skaap/bok-chimera op dié manier te verwek.¹⁰

Manipulasie van gene. Met volgehoue navorsing word die misterie van gene wat vir sekere genetiese eienskappe verantwoordelik is – en hul posisies op die chromosome – geleidelik ontrafel. Navorsers het ook al daarin geslaag om sekere genes uit selle te verwyder en op ander selle oor te plaas. Retrovirusse word onder andere gebruik om die vreemde kernmateriaal in die embrioselle in te dra.¹¹

Die moontlikheid om eendag gene wat byvoorbeeld horinggroei in beeste beheer, te kan verwyder of die gene vir hoër melkproduksie in embrio's in te voeg, is dus glad nie te vergesog nie. Waar jare se

teling en seleksie vir sulke eienskappe vandag nodig is, sal dit dan binne 'n enkele generasie afgehandel kan word. Die nageslag van sulke spesiaal geteelde diere sal dan ook die wenslike genetiese faktore dra en dit op hulle beurt weer aan hul nageslag kan oordra.

Die fenomenale vordering wat oor die afgelope veertig jaar met kunsmatige teelmetodes by diere gemaak is, is te danke aan 'n gedurige wisselwerking tussen navorsing en die praktiese toepassing daarvan. Saam met die ontwikkeling van verfynde metodes om die potensiële teelwaarde van diere te bepaal, het dié tegnieke daartoe bygedra dat die produksiepotensiaal van die wêreld se plaasdiere aansienlik verhoog is.

VERWYSINGS

1. Polge, C. (1957). Low temperature storage of mammalian spermatozoa, *Proc. Roy. Soc. London B*, 147, 498.
2. Grosskopf, J.F.W. (1976). Die herkonsepsie van lakterende vleisraskoeie as beperkende faktor by die praktiese toepassing van ovulasiesinchronisasie, *PhD-proëfskrif, Univ. van Stellenbosch*, pp. 5-25.
3. Rowson, L.E.A., Tervit, R. & Brand, A. (1972). Synchronization of oestrus in cattle by means of prostaglandin F₂ α, *Proc. VIIth Int. Cong. Anim. Reprod. & A.I., München, June 1972*, p. 866.
4. Rowson, L.E.A., Moor, R.M. & Lawson, R.A.S. (1969). Fertility following egg transfer in the cow. Effect of method, medium and synchronization of oestrus, *J. Reprod. & Fert.*, 18, 517.
5. Elsdon, R.P., Haster, J.F. & Seidel, G.E. (1976). Non-surgical recovery of bovine embryos, *Theriogenology*, 6, 523.
6. Gerlaugh, A. (1984). Besamungsverein, Birkenfelder Strasse 21-23, 8530 Neustadt/Aisch. Persoonlike mededeling.
7. Pintér, Zs., Szabad, J. & Agnes Pethö. (1986). Embryo splitting without a micromanipulator, *Proc. 37th Cong. Europ. Assoc. Anim. Prod., Budapest, 1-4 Sept. 1986*, p. 189.
8. Whittingham, D.G. (1971). The survival of mouse embryos after freezing and thawing, *Nature (London)*, 233, 125.
9. Tarkowski, A.K. (1961). Mouse chimaeras produced from fused eggs, *Nature (London)*, 190, 857.
10. Tucker, E.M., Moor, R.M. & Rowson, L.E.A. (1974). Tetraparental sheep chimaeras induced by blastomere transplantation, *Immunology*, 26, 613.
11. Brem, G. (1986). Techniques for the production of transgenic livestock, *Proc. 37th Congr. Europ. Assoc. Anim. Prod., Budapest, 1-4 Sept. 1986*, p. 181.