

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Ana ZANJKOVIČ

**PLODNOST LABORATORIJSKIH MIŠI PRI SELEKCIONIRANIH
LINIJAH ODBRANIH NA VEČJI OZIROMA MANJŠI DELEŽ
TELESNIH MAŠČOB**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**FERTILITY OF LABORATORY MICE IN LINES SELECTED FOR
HIGH OR LOW PERCENTAGE OF BODY FAT**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstvo – zootehnika. Delo je bilo opravljeno na Katedri za prehrano in v Centru za rejo in poskuse z laboratorijskimi mišmi na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo, imunologijo, splošno živinorejo in konjerejo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Andreja Orešnika in za somentorja prof. dr. Simona Horvata.

Recenzent: doc. dr. Tatjana Pirman

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof dr. Jurij POHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Andrej OREŠNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Simon HORVAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Tatjana PIRMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Ana Zanjkovič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 616-092.9(043.2)=163.6
KG	laboratorijske živali/linije miši/plodnost/reprodukcija/velikost gnezda
KK	AGRIS L10
AV	ZANJKOVIČ, Ana
SA	OREŠNIK, Andrej (mentor)/HORVAT, Simon (somentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2007
IN	PLODNOST LABORATORIJSKIH MIŠI PRI SELEKCIONIRANIH LINIJAH ODBRANIH NA VEČJI OZIROMA MANJŠI DELEŽ TELESNIH MAŠČOB
TD	Diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP	XI, 88 str., 30 pregl., 14 sl., 53 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Plodnost je ena pomembnejših lastnosti v živinoreji in miši so najpogosteje uporabljene kot model pri proučevanju teh zakonitosti. Namen te diplomske naloge je določiti ali so med dvema linijama miši razlike v parametrih plodnosti. Liniji miši izhajata in dvosmernega selekcioniranja na višji (linija FLI) in nižji (linija FHI) odstotek telesnih maščob. V prvem delu smo analizirali podatke o parametrih plodnosti v štirih generacijah zbrane na Centru za rejo laboratorijskih miši na Biotehniški fakulteti, Odd. za zootehniko. V drugem delu smo izvedli poskus z monogamnimi paritvami, da bi proučili dodatne parametre plodnosti, ki jih v reji ne spremljajo redno. Ocenili smo 40 monogamnih paritev za linijo FLI in 38 za linijo FHI. Določili smo tudi, če je prišlo do razlik med že obstoječim rejskim sistemom in poskusom. Odstotek kotitev je bil v primerjavi s pričakovanimi vrednostmi pri liniji FHI višji (50, 5 % v reji in 58,9 % v poskusu) kot pri liniji FLI (42,5 % v reji in 48,8 v poskusu). Število odstavljenih mladičev po samicah je bilo večje v obstoječem rejskem sistemu za obe liniji in pri liniji FHI v obeh delih raziskave (7,61 v reji in 8,48 v poskusu). Paritve v poporodnem estrusu za naši liniji niso bile značilne v primerjavi z drugimi standardnimi linijami miši. Pri samicah smo po prvi kopulaciji opazili velik odstotek zaporednih in ponovnih čepov (80,0 % pri FLI in 42,2 % pri FHI). V povprečju sta bili liniji FHI in FLI v primerjavi z drugimi inbridiranimi linijami slabše plodni. Kljub temu sta liniji dobro plodni in tako lahko uporabljeni kot model pri proučevanju debelosti in vitkosti. Končni rezultati te naloge pa bodo uporabni v prihodnjih raziskavah kot glavna informacija pri pridobivanju določenega števila živali za različne genetske in prehranske poskuse kot tudi pri proučevanju razmerij med plodnostjo in povečanjem maščob.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 616-092.9(043.2)=163.6
CX laboratory animals/mice strains/fertility/reproduction/litter size
CC AGRIS L10
AU ZANJKOVIČ, Ana
AA OREŠNIK, Andrej (supervisor)/HORVAT, Simon (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department
PY 2007
TI FERTILITY OF LABORATORY MICE IN STRAINS SELECTED FOR HIGH
OR LOW PERCENTAGE OF BODY FAT
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 88 p., 30 tab., 14 fig., 53 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Fertility is one of the most important characteristics in animal husbandry and mice are the most frequently used model for the investigation of these characteristics. The purpose of the present graduation thesis was to investigate if there are any differences between fertility parameters in two strains of mice from a divergent selection experiment on high (line FLI) and on low (line FHI) body fat percent. In the first part we analysed recorded fertility data in four generations for the above mentioned strains of mice in the Breeding facility for laboratory mice at the Biotechnical Faculty, Zootechnical Department. In the second part, we performed an experiment with a monogamous mating system to examine additional fertility parameters that are not followed regularly in the present recording system. 40 and 38 monogamous pairs were evaluated for strains FLI and FHI, respectively. We also determined if there are any differences in the experimental data. Percent of littering compared to expected values was higher for strain FHI (50.5 % in recorded data and 58.9 % in the experiment), compared to strain FLI (42.5 % and 48.8 %, respectively). The number of weaned pups per female was higher in the recorded fertility data for both strains and for the strain FHI in both recorded and experimental data (7.61 and 8.48, respectively). Mating within postpartum estrus was not frequent for FLI and FHI in comparison with standard inbred mouse lines. A high percentage of re-plugs in females after first copulation (80.0 % for strain FLI and 42.2 % for strain FHI) was noticed. On average our strains FHI and FLI had lower fertility rate compared to standard inbred mouse strains. Despite of all that, strains are still fertile and can be used as a model in research of obesity and leanness – as most mutant obese or lean strains are infertile. The obtained results can be used in future investigations as a key information to determine the number of mice needed in genetic and nutritional experiments as well as to investigate relationship between fertility and fat accretion.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	IV
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ANATOMIJA REPRODUKTIVNIH ORGANOV	3
2.1.1 Samica	3
2.1.2 Samec	4
2.1.3 Razlike med spoloma	5
2.2 ZNAČILNOSTI REPRODUKCIJSKEGA CIKLUSA PRI SAMICAH	6
2.2.1 Puberteta	7
2.2.2 Estrični cikel	8
2.2.2.1 Ovulacija	9
2.2.2.2 Poporodni estrus	10
2.2.3 Paritev	11
2.2.3.1 Različni sistemi paritev	12
2.2.4 Kopulacija	13
2.2.4.1 Uspešnost kopulacije	14
2.2.5 Brejost	16
2.2.5.1 Dolžina brejosti	16
2.2.5.2 Potek brejosti	17
2.2.6 Sesno obdobje	18
2.3 PARAMETRI PLODNOSTI PRI SAMICAH LABORATORIJSKIH MIŠI	20
2.3.1 Doba med kotitvama	20
2.3.1.1 Vpliv velikosti gnezda	20
2.3.1.2 Vpliv linije	21

2.3.2	Velikost gnezda	21
2.3.2.1	Maternalni vpliv (vpliv matere)	21
2.3.2.2	Vpliv laktacije na velikost gnezda	22
2.3.2.3	Vpliv linije na velikost gnezda	23
2.3.2.4	Vpliv prehrane na velikost gnezda	23
2.3.3	Razmerje spolov	23
2.3.4	Število gnezd	24
2.3.5	Število odstavljenih mladičev	26
3	MATERIALI IN METODE	27
3.1	LABORATORIJSKE MIŠI IN NOMENKLATURA	27
3.1.1	Nastanek linije FLI in FHI	27
3.2	OSKRBA MIŠI	28
3.2.1	Krma in voda	29
3.2.2	Temperatura in vlaga zraka, ter svetloba	29
3.2.3	Oprema	29
3.2.4	Čiščenje	29
3.3	ANALIZA ZBRANIH PODATKOV IZ REJE	30
3.3.1	Paritve	30
3.3.2	Odstavitve	31
3.3.3	Pregled podatkov iz reje	32
3.4	POSKUS	32
3.4.1	Izbira miši	32
3.4.2	Nastavitev paritev	32
3.4.3	Vodenje evidenc v poskusu	33
3.4.4	Odkrivanje vaginalnih čepov	34
3.4.5	Tehtanje	35
3.4.5.1	Masa gnezda ob rojstvu	35
3.4.5.2	Odstavitvena telesna masa mladičev	36
3.5	OBDELAVA PODATKOV	37
4	REZULTATI	39
4.1	ANALIZA ZBRANIH PODATKOV IZ REJE	39
4.1.1	Pregled paritev	39
4.1.1.1	FLI linija	39
4.1.1.2	FHI linija	41

4.1.2	Pregled odstavitov	42
4.1.2.1	Linija FLI	42
4.1.2.2	Linija FHI	44
4.1.2.3	Primerjava linij FLI in FHI	46
4.2	POSKUS	48
4.2.1	Pregled paritev	48
4.2.2	Rojeni mladiči	52
4.2.3	Odstavljeni mladiči	56
4.2.4	Tehtanje odstavljenih mladičev	59
4.2.5	Primerjava linije FHI in FLI	61
4.2.6	Rezultati statistične obdelave modelov	61
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	64
5.1	RAZPRAVA	64
5.1.1	Primerjava evidenčnih podatkov o plodnosti linije FHI in FLI	64
5.1.2	Primerjava podatkov o plodnosti linije FHI in FLI iz poskusa	68
5.1.3	Primerjava podatkov o plodnosti linije FLI z drugimi modeli debelih miši	73
5.1.4	Zaključki in priporočila	74
5.2	SKLEPI	77
6	POVZETEK	80
7	VIRI	84
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Razvoj miši od rojstva do odrasle velikosti (Inglis, 1980)	19
Preglednica 2: Odstotek samcev v gnezd (Altman in Dittmer-Katz, 1979)	24
Preglednica 3: Število in velikost gnezd izbranih posameznih inbridiranih linij miši, objavljeno po različnih avtorjih	25
Preglednica 4: Osnovna statistika za linijo FLI	40
Preglednica 5: Število samic v posameznih sistemih parjenja	40
Preglednica 6: Starost samice ob prvi in zadnji kotitvi ter trajanje dobe med zaporednima kotitvama za linijo FLI	41
Preglednica 7: Osnovna statistika za linijo FHI	41
Preglednica 8: Število samic v posameznih sistemih parjenja za linijo FHI	42
Preglednica 9: Starost samice ob prvi in zadnji kotitvi ter trajanje dobe med zaporednima kotitvama pri liniji FHI	42
Preglednica 10: Osnovna statistika zaporednih gnezd za vsako generacijo pri liniji FLI	43
Preglednica 11: Osnovna statistika zaporednih gnezd za vsako generacijo pri liniji FHI	45
Preglednica 12: Odstotek kotitev, povprečno število odstavljenih mladičev na samico skupaj in po spolu	47
Preglednica 13: Primerjava povprečnega števila odstavljenih mladičev na zaporedno gnezdo za vsa gnezda in za odstavljen gnezda med linijama FLI in FHI	47
Preglednica 14: Primerjava razmerja med spoloma odstavljenih mladičev pri linijah FHI in FLI	48
Preglednica 15: Pregled paritev v poskusu za liniji FHI in FLI	49
Preglednica 16: Primerjava samic obeh linij v starosti in telesni masi ob paritvi in prvi uspešni kopulaciji	49
Preglednica 17: Trajanje obdobj med kotitvami pri linijah FHI in FLI	50
Preglednica 18: Povprečna doba brejosti za linijo FHI in FLI	50
Preglednica 19: Primerjava intervalov pojava posameznega čepa med linijama	51

Preglednica 20: Primerjava povprečnega števila rojenih, živorojenih in mrtvorjenih mladičev na rojeno gnezdo skupaj in po zaporednih gnezdih med linijama FLI in FHI	53
Preglednica 21: Povprečna masa gnezda živorojenih mladičev in masa posameznega živorojenega mladiča v zaporednih gnezdih	55
Preglednica 22: Povprečno število odstavljenih mladičev in izgube mladičev od rojstva do odstavitve na rojeno gnezdo za liniji FHI in FLI	57
Preglednica 23: Odstotek mrtvorjenih mladičev od vseh rojenih in odstotek izgub od rojstva do odstavitve pri liniji FHI in FLI	57
Preglednica 24: Masa odavljjenega mladiča po spolu skupaj in po zaporednem gnezd pri liniji FLI in FHI	59
Preglednica 25: Masa odavljjenega mladiča skupaj in po zaporednem gnezd pri liniji FHI in FLI	60
Preglednica 26: Delež kotitev, povprečno število odstavljenih mladičev na samico in skupno število gnezd na samico v zaporednem gnezd	61
Preglednica 27: Vpliv linije, zaporednega gnezda in interakcije med njima na posamezne opazovane lastnosti	62
Preglednica 28: p-vrednosti za vpliv linije na določene lastnosti	63
Preglednica 29: Primerjava podatkov o lastnostih plodnosti med linijama FLI in FHI pridobljenih z analizo in v poskusu	65
Preglednica 30: Podatki pridobljeni v posksu	69

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Ločevanje mladičev po spolu ob rojstvu in ob odstavitvi (prirejeno po Duke Univeristy..., 2007)	6
Slika 2: Prikaz cikličnih dogajanj v reprodukciji samice od pubertete do odstavitve njenih mladičev	7
Slika 3: Postopek izvedbe poskusa za analizo plodnostnih parametrov linij FLI in FHI	33
Slika 4: Pregled samice za prisotnost vaginalnega čepa (foto: Prevoršek Z., 2006)	34
Slika 5: Breja samica genetsko heterogene linije ICR (foto: Zanjekovič A., 2007)	35
Slika 6: Gnezdo z en dan starimi mladiči, levo in z dva dni starimi mladiči, desno (foto: Zanjekovič A., 2006)	36
Slika 7: Povprečno število odstavljenih mladičev na vsa gnezda v zaporednih kotitvah štirih generacij za linijo FLI	44
Slika 8: Povprečno število odstavljenih mladičev na vsa gnezda v zaporednih kotitvah štirih generacij za linijo FHI	46
Slika 9: Odstotek opazovanih samic v posameznih intervalih pojava ponovnega čepa	52
Slika 10: Povprečno število živorojenih mladičev v zaporednem gnezdu za liniji FHI in FLI	54
Slika 12: Povprečna rojstna masa mladiča v zaporednem gnezdu	56
Slika 13: Povprečno število odstavljenih mladičev v zaporednem gnezdu za linijo FHI in FLI	58
Slika 14: Povprečna masa odstavljenega mladiča v zaporednem gnezdu	60

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DB - doba brejosti

DMK - doba med kotitvama

DPK - doba od paritve do kotitve

FHI - linija selekcionirana na nižji odstotek telesnih maščob (L-lean)

FLI – linija selekcionirana na višji odstotek telesnih maščob (F-fat)

FSH - folikle stimulirajoči hormon

GN - gnezdo

HG - selekcionirana linija miši na velikost – ang. »high growth«

IM - izgubljeni mladiči od rojstva do odstavitve

KOT - zaporedna kotitev

K₁ - prva kotitev

K₂ - druga kotitev

K₃ - tretja kotitev

K₄ - četrta kotitev

LH - luteinizirajoči hormon

mM - masa rojenega mladiča

mG - masa rojenega gnezda

mOM - masa odstavljenega mladiča

MM - mrtvorojeni mladiči

OM - odstavljeni mladiči

PB – psevdobrejost

PE – poporodni estrus

PMSG - pregnant mare serum gonadotropin

RM - rojeni mladiči

SP - starost ob paritvi

SPUK - starost ob prvi uspešni kopulaciji

SPK – starost ob prvi kotitvi

SZK – starost ob zadnji kotitvi

TK - telesna masa ob kopulaciji

UV - ultra-vijolično

ZG - zaporedno gnezdo

ŽM - živorojeni mladiči

1 UVOD

Osnovne zakonitosti v razmnoževanju laboratorijskih živali so enake zakonitostim pri gospodarsko koristnih domačih živalih. Pogosto uporabljamo laboratorijske živali kot model pri proučevanju teh zakonitosti. Miši imajo prednost zaradi majhnih prostorskih zahtev in hitrega reprodukcijskega ciklusa (Bogovič, 1981).

Za opis lastnosti določene linije laboratorijskih miši je potrebno navesti podatke o plodnosti samic in samcev. Med lastnosti, ki jih v rejskih organizacijah spremljajo, sodijo: nastop spolne zrelosti, uspešnost kopulacije, trajanje brejosti, velikost gnezda (število živorojenih in število mrtvorojenih mladičev), rojstna masa, razmerje med spoloma, število odstavljenih mladičev, razmerje med spoloma ob odstavitvi in odstavitvena telesna masa mladičev. V plodnosti laboratorijskih miši so razlike med genetsko heterogenimi in genetsko homogenimi (inbridiranimi) linijami miši. Tudi znotraj heterozigotne ali homozigotne linije so v lastnostih plodnosti lahko velike razlike, še posebej, če so selekcionirane na različne druge lastnosti.

V Centru za rejo in poskuse z laboratorijskimi mišmi Katedre za genetiko, animalno biotehnologijo, imunologijo, splošno živinorejo in konjerejo Oddelka za zootehniko redijo dve inbridirani liniji laboratorijskih miši, ki se razlikujeta v večjem (linija »fat«, FLI) oziroma manjšem (linija »lean«, FHI) deležu telesnih maščob. V reji spremljajo podatke o številu rojenih mladičev v gnezdu in o številu odstavljenih mladičev. Ti podatki še niso sistematično urejeni in ne predstavljeni. Poleg tega pa bi bilo potrebno pridobiti in opisati tudi druge lastnosti, ki opisujejo plodnost pri obeh linijah in ugotoviti, ali se liniji v plodnosti razlikujeta med seboj in kakšni sta v plodnostnih parametrih v primerjavi z drugimi standardnimi linijami miši. Znano je, da ekstrema kot prekomerna ali pomanjkljiva zamaščenost lahko negativno vplivata na lastnosti plodnosti pri živalih in ljudeh. Delovna hipoteza poskusa je bila, da so med linijama FLI in FHI v plodnostnih parametrih statistično značilne razlike.

Pri poskusih pogosto potrebujemo veliko število živali, ki so kar se da enake starosti. To je glede na dosedanje izkušnje pri reprodukciji s tema dvema linijama v pogojih reje in z dosedanjim modelom razmnoževanja na Oddelku za zootehniko težko doseči. Zato je za

načrtovanje poskusov pri teh linijah še posebej pomembno poznavanje plodnostnih lastnosti, da bi lahko čim bolj učinkovito določali obseg in časovni načrt poskusov.

Iz dostopnih podatkov v reji smo v diplomski nalogi opravili analizo plodnosti laboratorijskih miši štirih generacij obeh linij in sistematično predstavili urejene podatke. V eni generaciji obeh linij smo v posebnem poskusu z istočasnim parjenjem v monogamni reji spremljali naslednje lastnosti: uspešnost kopulacije (prisotnost vaginalnega čepa), trajanje obdobj med kotitvami, trajanje brejosti, število živorojenih in število mrtvorojenih mladičev, rojstno maso gnezda in mladičev ter število gnezd po samici v poskusnem obdobju. Ob odstavitvi (21. dan po rojstvu) smo ugotavljali število odstavljenih mladičev, razmerje med spoloma ob odstavitvi in odstavitveno težo mladičev. V diplomski nalogi navajamo izračunane povprečne vrednosti za vsako lastnost in za vsako linijo posebej. S statistično analizo smo testirali razlike v lastnostih med linijama, s kvalitativno analizo pa primerjali podatke evidenc iz reje in poskusa.

Predstavljeni podatki sodijo v opis lastnosti genetsko determiniranih linij miši, ki jih redimo na Oddelku za zootehniko in jih uporabljamo v genetskih in prehrabnih poskusih. Na podlagi rezultatov opravljenega dela bomo lahko v reji izboljšali model razmnoževanja, ki bo omogočal zanesljivo oceno plodnosti miši v naslednjih generacijah in zagotavljal potrebno število živali za poskuse. Poleg tega bodo rezultati lahko osnova za nadaljnje raziskave o povezanosti plodnosti in zamaščenosti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANATOMIJA REPRODUKTIVNIH ORGANOV

2.1.1 Samica

Razmnoževanje pri laboratorijskih miših, podobno kot pri drugih živalskih vrstah in pri človeku, je odvisno od razvitosti spolnih organov, ki jih pri ženskemu spolu sestavljajo: dva jajčnika (*ovarium*) z jajcevodoma (*oviduct*), rogova maternice (*uterus*), maternični vrat (*cervix*), nožnica (*vagina*), žleze klitorisa in klitoris (*clitoridis*) (Cook, 1983; Rugh, 1990). Na razvoj, funkcionalne sposobnosti in delovanje spolnih organov vplivajo genetske lastnosti živali, pogoji v okolju in dražljaji, ki jih žival sprejema s čutili.

Jajčnika sta rožnate barve, prekrita z tanko, prepustno membrano, imenovano *tunica albuginea*. Na maternične rogove in na dorzalno steno trebušne votline so pripeti z vezivnim tkivom, imenovanim *ovarian ligaments*. Površina jajčnika je pri nezrelih samicah gladka in se z razvojem foliklov in rumenih teles v času pubertete naguba. Naloga jajčnika je proizvodnja estrogenih hormonov in progesterona, ter proizvodnja jajčec (Cook, 1983).

Jajcevod omogoča transport jajčeca v eno smer in semenčic v drugo smer. Povezuje jajčnik z rogom maternice. Jajcevod se deli na štiri dele:

- lijak (*infundibulum*)
- razširjeni del jajcevoda (*ampulla*)
- ožji del jajcevoda (*isthmus*)
- notranja maternična stena (*intramural portion*)

Celice mišičnih vlaken v steni jajcevoda močno utripajo in tako delajo pretok, ki omogoča prenos spuščeneja jajčeca do tkiva, ki povezuje lijak z razširjenim delom jajcevoda. Slednji je tudi omišičen in raztegljiv. V tem delu jajčece v času estrusa počaka na oploditev. Jajcevod je omišičen in lahko tako s pomočjo peristaltike prenaša jajčece do rogov maternice (Cook, 1983).

Maternica je sestavljena iz dveh materničnih rogov ali *cornua*, ki se začenjata pri jajcevodu, nato pa se združita v srednje maternično telo, ki se zaključi z materničnim

vratom (*cervix*). S tem oblikujeta črko Y. *Cervix* se zaključí z zgornjim delom vagine (Cook, 1983).

Vagina je kratka in se na spodnji trebušni strani razteza od *cervix*-a do zunanjega dela nad zadnjikom, kjer se potem odpira na zunanjo stran (Cook, 1983; Rugh, 1990). Slednji del se imenuje sramnica (*vulva*) (Rugh, 1990). Na hrbtni strani vulve se odpira sečnica. V notranjosti je vagina s spodnje strani narahlo pripeta na danko, ob strani pa na sečnico. Pri odprtju vagine se nad odprtino nahaja klitoris (Cook, 1983).

Samica ima pet parov mlečnih žlez na spodnji strani telesa. Trije pari so na predelu prsi, dva para sta v trebušno – dimeljskem predelu (Rugh, 1990). Vsaka žleza je ločena enota zase in se v zunanji del odpira s seskom. Žleze sestavlja razširjen in razvejan sistem kanalov in režnjev iz sekretornih alveol. Seski so majhni in kratki. Obdani so z debeljšo kožo, ki ni poraščena z dlako (Cook, 1983).

2.1.2 Samec

Reproduktivne organe pri samcu sestavljajo parni organi: moda (*testis*), obmodek (*epididymis*), semenovoda (*vas deferens*) in pomožne (akcesorne) spolne žleze ter neparni organ penis.

Moda so kot pri večini sesalcev ovalne oblike. Nahajajo se v skrotalni vreči, ki je malo nad zadnjikom, na vsaki strani sečnice po eno modo. Skrotalna vreča je povezana s telesno votlino in se tako lahko moda pomaknejo v notranjost dimeljskega kanala. Pokrita so s tanko membrano (*tunica albuginea*). Sestavljajo jih povezani snopiči cevčic, ki so podprti z vezivnim tkivom. Moda imajo funkcijo eksokrinih žlez (izločajo semenčice v semenske kanale) in endokrinih žlez (izločajo androgene hormone neposredno v kri). Sekretorne celice so razporejene v vezivnem tkivu, spolne celice pa znotraj semenskih kanalčkov zaključijo spermatogenezo. Moda se povezujejo s sečnico preko obmodka in semenovoda. Znotraj membrane mod oblikujejo kanali mrežo iz katere nastajajo številni izvodilni kanali. Pri tem predrejo membrano (*tunica albuginea*) in se povežejo z obmodkom v enojni obmodkov kanal. Semenovod nastane iz obmodkovega kanala in se razširi v *ampullo*, potem pa vstopi v sečnico poleg vratu sečnega mehurja (Cook, 1983).

Sečnica poteka iz sečnega mehurja do odprtine na koncu penisa. Telo penisa se začneja z dvema krakoma na sednici, ki se potem združita v eno telo. Sestavljeno je iz gobastega tkiva, ki se ob spolnem vznburjenju napolni s krvjo in to povzroči erekcijo penisa (Orešnik, 1992). Penis se konča na mestu spolne bradavice, ki je na zunanji površini paličasto oblikovane parne prepucijske žleze in je prekrit z kožico prepucija (sluznica in poseben kožni list). Penisu dajejo obliko tri plasti trdnih tkiv (Cook, 1983).

Žlezi semenskih mešičkov sta beli, nakodrani in lepo vidni, medtem pa se parna Cowper-jeva žleza ali Bulbouretralni žlezi slabše vidijo. Cowper-jeva žleza leži na spodnji strani, kjer se stikata sečnica in penis ter je pripeta na konkavno oblikovani del žlez semenskih mešičkov. Vsak par ima kanal, ki vstopa v sečnico čez *ampullo* semenovoda. Na trebušni strani je parna žleza prostata, roza barve in lepo vidna od strani poleg mehurja. Ima številne kanale, ki se končajo v sečnici (Cook, 1983).

2.1.3 Razlike med spoloma

Engelen in sod. (1995) pravijo, da nastopi razlika v telesni masi med spoloma že zelo zgodaj v razvoju, saj je razlika opazna že ob rojstvu. Pri tem so samci večji od samic. Najbolj očitna razlika je razdalja med zadnjikom ter genitalno papilo oz. klitorisom ali imenovano tudi presredek, ki je pri samcih daljši, v grobem za 1/3 daljši od razdalje med zadnjikom in klitorisom pri samicah (Rugh, 1990). Eden od načinov razlikovanja je tudi prisotnost seskov pri samicah, ki so opazni kmalu za tem, ko so mladiči poraščeni z dlako.

Samice so bolj mirne, medtem ko odrasli samci lahko kažejo agresivnost proti drugim samcem, kar je med linijami različno. To je najbolj opazno, ko spolno dozori in se v skupini, kjer je več samcev, ustvarja hierarhija (Rugh, 1990).

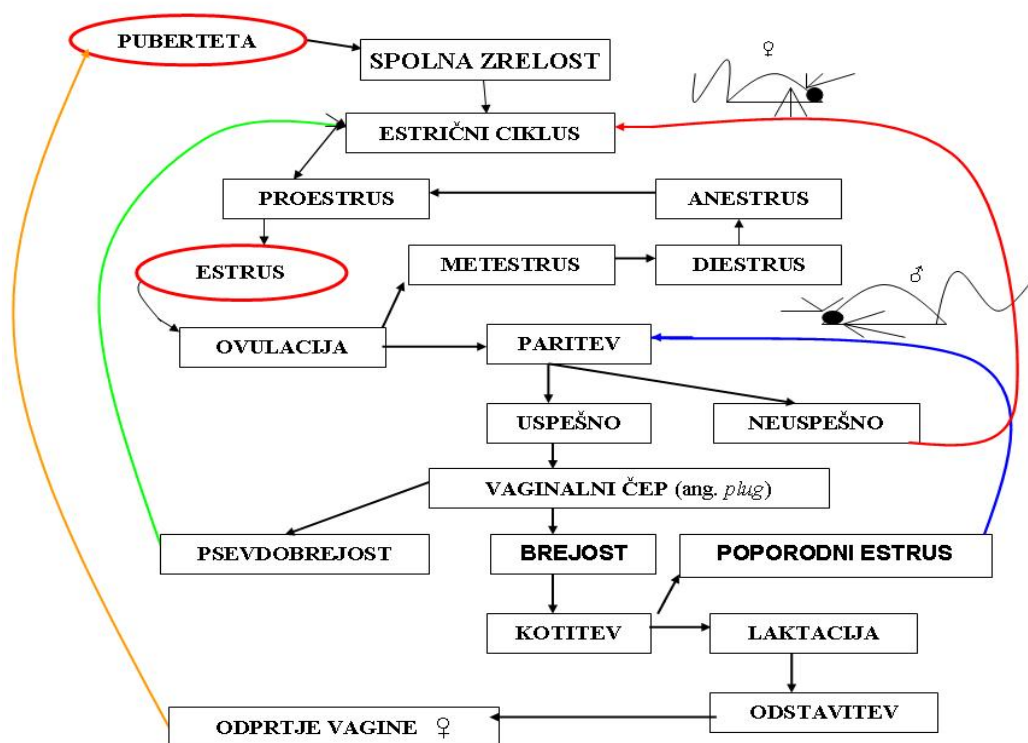


Slika 1: Ločevanje mladičev po spolu ob rojstvu in ob odstavitvi (prirejeno po Duke University..., 2007)

Na sliki 1 je prikazano ločevanje samcev in samic po spolu. Levo je prikazana razlika med samcem in samico takoj po rojstvu, desno pa različna dolžina presredka samca in samice pri starosti treh tednov.

2.2 ZNAČILNOSTI REPRODUKCIJSKEGA CIKLUSA PRI SAMICAH

Na sliki 2 je shematično predstavljen prikaz cikličnih dogajanj v reprodukciji pri mišjih samicah.



Slika 2: Prikaz cikličnih dogajanj v reprodukciji samice od pubertete do odstavitve njenih mladičev

2.2.1 Puberteta

Nastanek fizioloških sprememb in sprememb v obnašanju živali v povezavi z zrelostjo reproduktivnega sistema imenujemo puberteta (Whittingham in Wood, 1983). Zaključni se, ko samice spolno dozori. Za ta pojav je značilno, da pri različnih živalskih vrstah in tudi pri različnih inbridiranih linijah miši, nastopi ob različni starosti. Večina samic inbridiranih linij doseže spolno zrelost pri starosti med 6-8 tednov, medtem ko samice genetsko heterogenih linij dosežejo puberteto (spolno zrelost) lahko že pri 4 tednih starosti (Silver, 1995). Na nastop spolne zrelosti vplivajo tudi prehrana in drugi dejavniki v okolju kot na primer:

- izpostavitve samic odraslemu samcu ali njegovemu urinu lahko povzroči hitrejši nastop spolne zrelosti
- prisotnost odraslih samic ali njihov urin lahko povzroči kasnejši nastop spolne zrelosti pri spolno nezrelih samicah (Silver, 1995)

Zadnjo trditev sta proučevala tudi Hoover in Drickamer (1979, cit. po Drickamer, 1984) v svoji raziskavi, kjer je prisoten urin brejih in laktirajočih samic, dodan v kletko v obliki kapsul podaljšal trajanje estričnega ciklusa pri nebrejih samicah. Na to naj bi vplival prisoten feromon v zraku kletke. Tudi Jemiolo in Novotny (1993) sta v poskusu ugotovila, da se je samicam podaljšal interval in zmanjšala pogostost pojava estričnega ciklusa, če so jih tretirali z 2,5-dimethylpyrazine (sestavni del urina). V drugem delu poskusa je Drickamer (1984) mladim samicam namazal urin samca na zunanji del nosnic, le to pa je pospešilo nastop spolne zrelosti v primerjavi s samicami, ki so bile namazane z vodo.

Kot prvi znak pubertete lahko opazimo odprtje vagine. Po odstavitvi vsak dan pregledamo samice, če je prišlo do odprtja in tako dobimo podatek s katerim lahko določimo starost ob začetku pubertete (Cecim in sod., 1995; Cargill in sod., 2000). Odprtje vagine je ponavadi 24.-28. dan (Silver, 1995), lahko pa tudi kasneje, pri nekaterih miših pri starosti 35 do 40 dni (Silver, 1995; Rugh, 1990). Cecim in sod. (1995) pravijo, da na nastop pubertete vpliva telesna masa ob odstavitvi. Transgene miši PEPCK.bGH-1 so stopile v puberteto pri nižji starosti (29,2 dni), vendar pri večji telesni masi (22,0 g), kot njihove netransgene sovrstnice (15,2 g pri starosti 32,4 dni). Cargill in sod. (2000) navajajo v svoji raziskavi, da telesna masa nima velikega vpliva na nastop pubertete. Samice linije HG (»high growth«) in C57BL/6J so dosegle puberteto pri enaki starosti, približno 2-3 dni po odstavitvi. Čeprav so imele različne telesne mase, to ni imelo bistvenega vpliva na kasnejši nastop spolne zrelosti.

2.2.2 Estrični cikel

Nastop prvega estričnega ciklusa lahko imenujemo tudi nastop spolne zrelosti. Pri laboratorijskih miših je dolžina normalnega estričnega ciklusa 4-5 dni (Inglis, 1980; Hardy, 2004; Crispens, 1979). Silver (1995) ter Whittingham in Wood (1983) navajajo tudi do 6 dni dolg estrični cikel. Posameznim fazam ciklusa lahko sledimo oz. jih lahko določimo z vaginalnimi brisi (Inglis, 1980; Rugh, 1990). Posamezni brisi, ki jih vzamemo, nam določijo fazo ciklusa v katerem se samica nahaja, kar je razvidno kot prisotnost določenih vrst celic v brisu (Inglis, 1980). Na pojav posameznih faz estričnega ciklusa vpliva vsakodnevni svetlobni cikel. Svetloba preko oči vpliva na centralni živčni sistem in preko hipotalamusa na hipofizo, kar povzroči izločanje gonadotropnih hormonov in s tem

spremembe v ciklusu (Rugh, 1990). Ciklus se deli na štiri faze: proestrus, estrus, metestrus in diestrus (Silver, 1995). Fazi proestrus in estrus imenujemo tudi folikularna faza, fazi metestrus in diestrus pa lutealna faza (Rugh, 1990). Faze se med seboj razlikujejo fiziološko, morfološko in vedenjsko:

1. Proestrus se začne, ko jajčeca dosežejo zrelost znotraj jajčnikovih foliklov. Folikli so veliki, dozoreli in popolnoma razviti (Rugh, 1990). Preden folikli dozoriijo, jajčeca preidejo v metafazo druge mejotične delitve (Orešnik, 1992). Maternica je otekla in dobro prekrvavljena. Kot zunanji znak pa pri samici opazimo nabreklo vulvo in odprto vagino (Silver, 1995). Proestrus traja 1 do 1,5 dni. V vaginalnem brisu opazimo levkocite in celice epitelija z jedrom (Rugh, 1990).
2. Estrus se začne z ovulacijo zrelih oocit. Vulva ostane v razprtem stadiju, prav tako tudi vagina. Samice so pripravljene sprejeti samca oz. se mu pustijo zaskočiti (Silver, 1995). Estrus traja 1 do 3 dni. V vaginalnem brisu opazimo celice epitelija brez prisotnih levkocitov (Rugh, 1990).
3. Metestrus je faza, ki sledi estrusu, ko se ovulirana jajčeca premikajo skozi jajcevod proti maternici. Vulva ni več nabrekla in vagina je zaprta (Silver, 1995). Rugh (1990) in Inglis (1980) sta to fazo razdelila na dva dela, kjer je razlika le v vaginalnem brisu. Drugi del faze (pozni metestrus) ima v brisu prisotne levkocite, medtem ko je v prvem delu (zgodnji metestrus) prisoten le zrnast epitelij. Metestrus traja 1 do 5 dni.
4. Če do brejosti ne pride, potem metestrusu sledi diestrus, ki je zadnja faza ciklusa. Neoplojena jajčeca se v maternici razkrojijo in izločijo, vulva in vagina pa sta v najmanjši velikosti (Silver, 1995).

2.2.2.1 Ovulacija

Ovulacija je sprostitvev zrelega jajčeca iz njegovega folikla v periovarialni prostor. Ta proces traja 30-45 minut (Rugh, 1990). Iz jajčnika se lahko sprostijo do 10 jajčec in več v zelo kratkem času in tu se potem ustalijo v lijaku jajcevoda, kjer lahko pride do oploditve (Rugh, 1990). Različne linije miši imajo različen čas nastopa ovulacije, vendar pa se proces odvija nekje na sredini temne faze dneva. Razmerje svetlobe in teme kontrolira čas dogodkov v ciklusu (Whittingham in Wood, 1983). Po Rughu (1990) nastopi ovulacija 2-3

ure po začetku estrusa, to je približno 4-6 ur po nastopu teme. Estrus in ovulacija se torej odvijata v nočnem delu dnevnega ciklusa in se lahko prestavita, če se prestavi ciklus (Rugh, 1990). Dnevni ritem svetlobe in teme je povezan z izločanjem luteinizirajočega hormona (LH) iz hipofize, ki sproži ovulacijo (Whittingham in Wood, 1983).

Število ovuliranih jajčec v času estrusa je pomemben pokazatelj stanja reprodukcijskih dogajanj pri sesalcih (Spearow in Bradford, 1983). Število ovuliranih jajčec je znotraj posamezne linije miši konstantno in je bolj odvisno od trajanja stimulacije jajčnikov z FSH hormonom, kot pa od nivoja FSH (Whittingham in Wood, 1983). S to trditvijo se Fowler in Edwards (1960) ne strinjata. Pravita, da je število ovuliranih jajčec v naravnem estrusu kontrolirano s količino endogenega FSH, ki se izloča iz hipofize. Število ovuliranih jajčec, ki so jih našli pri samicah v poskusu, naj bi bilo v večini primerov odvisno od količine injiciranega PMSG (angl. pregnant mare serum gonadotropin). Rezultati raziskave (Land in Falconer, 1969) so pokazali, da imajo linije miši, selekcionirane na število ovuliranih jajčec na podlagi naravne ovulacije, manjše število ovuliranih jajčec, kot linije selekcionirane na podlagi sprožene ovulacije. Bradford (1969) je ugotovil v svojem poskusu, da se s selekcijo na velikost pri miših povečuje tudi število ovuliranih jajčec, prav tako pa se povečuje tudi s selekcijo na velikost gnezda.

Gonadotropini so hormoni, ki vodijo estrični ciklus in sprožijo ovulacijo (Rugh, 1990). Naraščajoči nivo FSH in LH v krvi v fazi proestrusa spodbudi sintezo estrogenih hormonov. Začne se rast in razvoj foliklov pod vplivom FSH, LH pa je potreben za dozorevanje foliklov (znotraj foliklov zorijo oocite). Ko folikel poči, nivo estrogena v krvi pade in oblikuje se rumeno telo (*corpus luteum*), ki v začetku proizvaja le malo progesterona. Zaradi nizkega nivoja estrogena in progesterona v krvi se ponovno začne izločati FSH. Cikel se ponovi (Whittingham in Wood, 1983). Odziv jajčnikov na tretiranje z gonadotropnimi hormoni znotraj populacije je odvisen od genetskih razlik, ki so v veliki meri kontrolirane s številom razvijajočih se foliklov in količino LH receptorjev v jajčniku (Spearow in Bradford, 1983).

2.2.2.2 Poporodni estrus

Ob prisotnosti samca lahko v času poporodnega estrusa (PE) pride do kopulacije in uspešne oploditve. PE nastopi pri samicah 12 do 20 ur po kotitvi (Rugh, 1990). Orešnik

(1977) navaja daljši interval, od 14 do 28 ur, Bronson (1966, cit. po Rugh, 1990) pa pravi, da so se miši sposobne pariti v krajšem intervalu, od 12 do 18 ur po kotitvi. Njegov nastop je odvisen od časa nastopa kotitve v povezavi z vsakodnevnim ciklusom teme in svetlobe.

Oploditev v poporodnem estrusu (brejost ob vzporedni laktaciji) ima lahko negativne vplive na v maternici prisotno gnezdo, kot tudi mladiče, ki sesajo. Samica mora namreč energijo, ki jo ima na voljo, razdeliti med dve gnezdi (Rugh, 1990). To vpliva na tekmovanje za prostor v trebušni votlini med prebavnim traktom in razvijajočimi zarodki. V takem primeru je lahko vnos krme omejen ali pa pride do stisnjenosti zarodkov (Speakman, 2007; Johnson in sod., 2001b). Produkcija mleka bo pri vzporedni brejosti upadla hitreje kot bi, če v poporodnem estrusu ne bi prišlo do oploditve (Rugh, 1990).

2.2.3 Paritev

Izraz paritev navadno uporabimo za postopek združitve samca in samice v isto kletko za več kot en dan (Silver, 1995, Fowler in Edwards, 1960). Miši so pripravljene za kopulacijo, kot večina drugih samic iz rodu sesalcev, samo v času estrusa (Rugh, 1990). Kopulacija je omejena na pozni proestrus oz. zgodnji estrus, saj je samica le v tem času voljna sprejeti samca in se bo le ta zanjo tudi zanimal (Silver, 1995; Wittingham in Wood, 1983). Če so miši izpostavljene rednemu standarnemu časovnemu izmenjavanju svetlobe in teme, se estrični ciklus navadno pojavi kmalu po polnoči (Rugh, 1990; Silver, 1995) in traja 6-8 ur (Silver, 1995). Torej pride do kopulacije v temnem delu dnevnega ciklusa, približno v času ovulacije (Whittingham in Wood, 1983) na splošno okoli druge ure zjutraj. Estrus se lahko prične tudi v jutranjih urah, če so samice za kratek čas izpostavljene prisotnosti samca (Rugh, 1990).

Lahko se zgodi, da samec »posili« samico. Najpogosteje pride do tega, ko sta prvič združena in v primeru, da je samica premlada ali pa še ni v estrusu (Silver, 1995). To trditev potrjujeta tudi Whittingham in Wood (1983) pri liniji C57BL/6. Velik delež takih kopulacij je bilo sterilnih, kar nakazuje kopulacijo izven estrusa. Rugh (1990) pa pravi, da spolno nezrele samice ne želijo sprejeti samca. Kljub temu, če vseeno pride do kopulacije, po vsej verjetnosti ne bo prišlo do oploditve. Prva zdrava in uspešna kopulacija je pri starosti samice vsaj 7-8 tednov.

2.2.3.1 Različni sistemi paritev

Za določen sistem parjenja se odločimo na podlagi poskusa, linije miši in velikosti prostora, kjer vzrejamo miši. V osnovi delimo parjenje na tri različne sisteme (Suckow in sod., 2001):

- inbriding (parjenje v sorodstvu- brat/sestra, hči/oče)
- načrtno parjenje (križanje)
- naključno (ang. random) parjenje

Pri inbridiranih linijah miši je cilj ohraniti genetsko homogenost v celotni koloniji. Ta je pomembna za ponovljivost poskusov, kjer uporabimo različne linije miši. V tem primeru ne zahteva več kot to, da parimo samca in samico iz iste linije, še bolj pa, če parimo po sistemu brat/sestra. Kadar je linija v zaprti koloniji in je izolirana za več generacij, moramo paziti, da ne ustvarimo podlinije. Slednja se lahko razlikuje od prvotne inbridirane linije (Suckow in sod., 2001).

Poslužujemo se lahko različnih metod:

A. Monogamno parjenje

Kadar želimo od določene samice čim večje število odstavljenih mladičev, je najbolje pustiti samca in samico skupaj celotno reproduktivno obdobje (Suckow in sod., 2001; Inglis, 1980). V posameznih primerih lahko samca začasno ločimo od samice, da jo njegova prisotnost ne vznemirja. Slabost takšnega načina parjenja je, da potrebujemo več kletk in s tem več prostora. Evidenco prisotnih živali v koloniji najlažje vodimo, če ostane samec pri samici in jo tako lahko oplodi v času poporodnega estrusa (Inglis, 1980).

B. »Trojno« parjenje

Pri tej metodi združimo v kletko enega samca in dve samici. Prednost te metode je večje število gnezd na posamezno kletko. Vendar pa težje beležimo nova gnezda, kadar imata samici kotitev v istem časovnem obdobju (Inglis, 1980).

C. Haremsko (poligamno) parjenje

Pri tem sistemu parimo dve samici ali več z enim ali več samci. Na ta način dosežemo večjo reprodukcijsko učinkovitost posameznega samca (Suckow in sod., 2001; Inglis, 1980). Slabost takšnega sistema je, da prisotne samice brez gnezd v kletki lahko motijo tiste z gnezdi ali pa se lahko mladiči zadušijo, kadar na njih leži preveč odraslih samic (Inglis, 1980). Problem tekmovalnosti med gnezdi lahko odpravimo tako, da brejo samico nekaj dni pred kotitvijo ločimo v drugo kletko in jo ob odstaviti mladičev zopet vrnemo. Na ta način pa seveda izpustimo poporodni estrus pri samici (Inglis, 1980).

D. Rotirajoči sistem

Če je samec zaradi genotipa ali dobrih reprodukcijskih lastnosti posebej zanimiv, ga lahko rotiramo med več samicami, vendar pa moramo za uspešnost razmnoževanja pri tem upoštevati določene pogoje (Silver, 1995):

- dolžina estričnega ciklusa samice
- čas, ki je potreben do obnovitve polnega števila semenčic v semenovodu
- čas obnovitve libida

2.2.4 Kopulacija

Akt kopulacije lahko spremljamo oz. opazujemo kmalu za tem, ko združimo samca in samico, saj do tega pride v intervalu 15-60 min po združitvi z nekoliko razlikami za določene linije, npr. samci linije DBA so hitri (20 min), med tem pa so samci pri liniji BALB/c počasnejši (1h) (Wimer in Fuller, 1966, cit. po Whittingham in Wood, 1983).

Voljna samica je mirna in radovedna, tako jo lahko samec najprej razišče in ji prevoha genitalije. Nato se nanjo povzpne oz. jo zaskoči od 1-100x. Do ejakulacije pride med zadnjim zaskokom. Samec je po tem nekaj časa pri miru, preden ponovno preide v normalno aktivnost. Vendar pri ponovni spolni aktivnosti število semenčic v semenovodu še ni obnovljeno vsaj približno dve uri po prvem spolnem aktu. Nekateri samci genetsko heterogene linije se lahko v eni noči parijo tudi do trikrat in obrežijo vse samice. Libido je lastnost samca, ki določa njegovo željo in sposobnost zaskoka samice in je opisan kot čas med dvema zaporednima kopulacijama. Vendar pa je obnovitveni libido različen pri različnih samcih znotraj linije in med linijami (Silver, 1995).

2.2.4.1 Uspešnost kopulacije

Eden izmed znakov opravljene kopulacije je lahko vaginalni čep. To je koagulum iz tekočine semenskih mešičkov in izločka Cowper-jevih žlez pri samcu. Njegov nastanek povzroči samec, ki po zaskoku na samico pusti v vagini bel do rumen kremast strdek in s tem zamaši vaginalno odprtino. Čep lahko naredijo tudi vazektomirani samci (Silver, 1995; Rugh, 1990). Koagulum se ponavadi tako strdi, da lahko mehanska odstranitev poškoduje vaginalno sluznico in vezi maternice (Rugh, 1990). Vaginalni čep lahko odkrijemo s preprostim vizualnim pregledom vulve. V nekaterih primerih je čep prisoten globlje v vagini in moramo za pregled uporabiti palčko s topo konico, s katero narahlo razpremo vulvo (Silver, 1995). Prisotnost čepa najlažje opazimo v jutranjih urah. Pri nekaterih inbridiranih linijah se začne čep topiti in izgine do opoldneva, kljub temu lahko ostane v vagini od 16 do 24 ur. Nekatere genetsko heterogene linije pa lahko ohranijo čep v vagini tudi do nekaj dni (Silver, 1995). Suckow in sod. (2001) omenjajo krajši čas (od 8 do 24 ur).

Vendar pojav čepa ni garancija, da je prišlo do oploditve. Pomeni le, da je do kopulacije prišlo (Suckow in sod., 2001). Uspešnost kopulacije se torej določi glede na to ali je prišlo do oploditve. Kadar prisotnemu vaginalnemu čepu sledi brejost, je prišlo do oploditve in to označimo kot uspešno kopulacijo, če pa ne sledi brejost, pomeni to neuspešno kopulacijo. Rugh (1990) navaja, da se je v kratkem paritvenem obdobju pojavilo 6,98 % vaginalnih čepov in pri 92,4 % od teh se je kasneje izkazalo, da so bile samice breje oz. je bila oploditev uspešna. Če samec in samica ob paritvi nimata izkušenj, sta pa spolno zrela (10 tednov ali več), je pogostost povprečnega pojava vaginalnega čepa manjša in znaša 3,5 %. Oploditev je boljše zagotovljena, če samico združimo s spolno zrelim in izkušenim samcem (Fowler in Edwards, 1960).

Prisotnost vaginalnega čepa štejemo kot pol dneva (0,5) od oploditve oz. pol dneva brejosti (Dorsch, 2004), medtem pa so Cargill in sod. (2000) dan, ko so opazili čep, šteli kot začetek brejosti (dan 0). Suckow in sod. (2001) pravijo, da je dan, ko smo opazili čep, prvi dan brejosti.

Ponovni čep (angl. *replug*) brez prekinitve brejosti, je pojav dveh zaporednih čepov v intervalu 1-4 dni. Reciklaža je pojav dveh zaporednih čepov, brez prekinitve brejosti, v intervalu 1-8 dni (Cargill in sod., 2000). Pojav ponovnega čepa pomeni podaljšanje

intervala od kopulacije do oploditve in s tem daljši interval med zaporednima kopulacijama. Cargill in sod. (2000) poročajo, da so imele samice iz mutantne linije HG (ang. *high growth*) pogostejši pojav reciklaže v primerjavi s samicami C57BL/6J iz kontrolne linije. Podobne rezultate sta dobila Fowler in Edwards (1960) v svoji raziskavi, kjer so selekcionirali linijo N v dve različni liniji: NL (velike miši) in NS (majhne miši). Le 16 % NS samic je imelo interval od paritve do kopulacije v času 5-8 dni, pri 46 % samic pa ni prišlo do kopulacije. Za linijo NL so določili, da je največji odstotek samic z vaginalnim čepom v intervalu 3-4 dni in je znašal 47 %, brez prisotne kopulacije pa je bilo le 6% samic.

Spolno nezrele samice tretirane z eksogenimi hormoni z namenom sproženja ovulacije težko ostanejo breje. Brejost lahko zagotovimo s tretiranjem brejih samic s progesteronom. Dnevno tretiranje z 0,125 – 0,25 mg progesterona zagotovi implantacijo, med tem pa tretiranje s količino 1,0 – 2,0 mg omogoči, da ostanejo breje. Ker je maternica pri spolno nezrelih samicah prostorsko neprimerna in slabo pripravljena, je za veliko število jajčec, ki so posledica sprožene ovulacije, značilna prezgodnja implantacija in umrljivost zarodkov. Za zarodke, ki le uspejo preživeti, je najbolje, da se kotijo s carskim rezom (Rugh, 1990). Tudi Fowler in Edwards (1960) navajata možnost uporabe progesterona za večje število implantiranih zarodkov in s tem vzdrževanje brejosti. Če je le tega premalo, je število vsajenih zarodkov manjše. V svojem poskusu sta tako uspešno tretirala samice linije N, ki je bila selekcionirana na majhno velikost (NS), medtem pa progesteron ni imel vpliva na kontrolno linijo in linijo selekcionirano na večjo velikost (NL).

Reprodukcijska dogajanja pri miših kontrolirajo feromoni, ki izzovejo specifične odzive pri drugih miših (Suckow in sod., 2001):

A. *Whitten učinek* je značilen pojav za skupino samic, ki se jim sinhronizirano pojavi estrus v času približno 72 ur po izpostavitvi samcu oz. njegovim feromonom. Veliko jih prestopi v anestrus, kar 40-50% pa jih prestopi v estrus.

B. *Bruce-ov učinek* imenujemo pojav, ko breja samica doživi abortus po tem, ko je izpostavljena novemu samcu ali njegovim vonjavam v fazi približno štiridnevne brejosti (Suckow in sod., 2001). Enako opisujeta Whittingham in Wood (1983), kjer naj bi

izpostavitve brejih ali namišljeno brejih samic tujemu samcu povzročila abortus še ne implantiranih zarodkov. Samica se vrne v začetno fazo estričnega ciklusa.

Samci z drugačnim genotipom so še bolj učinkoviti pri blokiranju brejosti (Whittingham in Wood, 1983).

C. *Lee-Boot* učinek imenujemo pojav namišljene, lažne ali psevdobrejosti (PB). Pojav je značilen pri samicah, ki so v večjem številu vblevljene v skupni kletki (Suckow in sod., 2001). Namišljeno breja samica se razširi v trebušnem predelu in pojavijo se vedenjske spremembe, ki jih lahko primerjamo z znaki pri brejih samicah (Inglis, 1980). Zgodnji stadiji PB niso drugačni od prave oz. fertile brejosti (Whittingham in Wood, 1983). Dolžina namišljene brejosti je variabilna, povprečno od 10 do 13 dni (Whittingham in Wood, 1983; Suckow in sod., 2001). Pri nekaterih paritvah so lahko samice v fazi namišljene brejosti (PB) do 12 dni, ali pa traja slednja kot normalna brejost od 19 do 20 dni (Inglis, 1980).

Namerno povzročena oz. sprožena namišljena brejost se uporablja pri paritvah s sterilnim samcem (vazektomirani samec) za pridobitev sprememb, ki so značilne za začetno fazo brejosti. Sterilni paritvi sledi aktivna lutealna faza, katere rezultat je podaljšanje estričnega ciklusa. Progesteron se izloča in maternica gre skozi faze normalne priprave na sprejem oplojenih jajčec (Whittingham in Wood, 1983). Samice so potem uporabne kot nadomestne matere pri postopku prenosa neimplantiranih (še ne vsajenih) zarodkov, ki so v fazi blastociste (starost 3,5 dni). Namišljeno brejost lahko sprožimo tudi z draženjem vagine in *cerviksa* pri jemanju vzorcev brisa za določevanje faze estrusa (Whittingham in Wood, 1983; Dorsch, 2004).

2.2.5 Brejost

2.2.5.1 Dolžina brejosti

Normalno traja brejost pri samicah 19-20 dni (Crispens in sod., 1975; Whittingham in Wood, 1983; Inglis, 1980), Silver (1995) pa navaja čas od 18 do 22 dni. Vendar se vsi raziskovalci strinjajo, da dolžina brejosti lahko močno variira. Ta razlika je odvisna od linije, starosti samice, vzporedne laktacije, števila zarodkov v maternici in zaporednega gnezda.

Brejest je pri genetsko heterogenih linijah krajša kot pri inbridiranih linijah (Whittingham in Wood, 1983). Temu je lahko vzrok, da imajo heterogene linije večja gnezda in tudi večje mladiče (Silver, 1995). Whittingham in Wood (1983) omenjajo dolžino brejosti pri dveh inbridiranih linijah: DBA ima dolžino 21 dni in C57BL 19 dni.

Število implantiranih zarodkov nima tako velikega vpliva na dolžino brejosti, kot skupna masa zarodkov in placentalnega tkiva. Zaradi tega so težji zarodki povezani s krajšo brejostjo (Rugh, 1990).

Trajanje dobe brejosti se lahko podaljša, če pride do paritve takoj po porodu (Whittingham in Wood, 1983; Inglis, 1980). Vzrok podaljšane brejosti je odložena implantacija (Rugh, 1990; Gabrovšek, 1998). Inglis (1980) navaja, da se brejest lahko podaljša za teden dni ali več. Pravi, da so pri tem vzroki razlike med linijami miši in večje potrebe zaradi prisotnosti različnega števila sesnih mladičev. Vzporedna laktacija značilno podaljša brejest v primerjavi s trajanjem brejosti po prvem pripustu (Gabrovšek, 1998).

2.2.5.2 Potek brejosti

Brejest se začne z oploditvijo jajčec s semenčicami in se zaključi s kotitvijo (Inglis, 1980; Whittingham in Wood, 1983). Estrični cikel se po oploditvi in implantaciji oplojenih jajčec v maternici in z razvojem zarodkov in plodov začasno ustavi (Inglis, 1980). Pri vretenčarjih poteka normalni razvoj znotraj maternice v teh fazah (Rugh, 1990):

- A. Primarni razvoj od oploditve do razvoja zarodnih plasti
- B. Osnovni razvoj organov
- C. Diferenciacija tkiv z razvojem funkcij in organizma kot celote

Semenčica prodre membrano jajčeca, ki jo imenujemo *zona pellucida*, ko se nahaja v jajcevodu. Oplojeno jajčece oz. zigota začne s svojim razvojem v jajcevodu in se do trenutka, ko se implantira v steno maternice, razvije do skupka večih celic. Skupek celic se razvije do blastociste in ta se implantira približno 4.-5- dan po oploditvi. Ta skupek celic se skozi razvoj prehranjuje s snovmi iz izločka žlez v steni maternice, ki se izloča v lumen maternice, v lutealni fazi po ovulaciji. Posteljica je selektivno difuzijska bariera. V jajčniku ostane struktura Grafovega folikla iz katere se je jajčece sprostilo. Ta žlezna struktura izloča hormon progesteron in se imenuje rumeno telo (Inglis, 1980). Prisotnost rumenih

teles na jajčniku je pomembna za prehrano prostih blastocist in vzdrževanje brejosti (Rugh, 1990).

Število rumenih teles je lahko tako, kot je bilo število ovuliranih jajčec, ne pa kot število vsaditev ali kasneje končno število zarodkov. Zgodnji zarodki, ki se vsadijo blizu *cerviksa*, se ponavadi bolj pogosto absorbirajo. Zarodki, ki pa se vsadijo bliže jajcevodu, so bolj razviti in naprednejši (Rugh, 1990).

Pri mladih samicah je mogoče brejost določiti s preprostim vizualnim pregledom, ki ne zahteva veliko znanja. Pri samicah, ki so prvič breje in imajo poleg tega še veliko gnezdo, lahko opazimo veliko izboklino na vsaki strani trebuha. Med tem pa se pri samicah, ki so že večkrat imele gnezdo in je slednje še majhno, tega ne opazi. Vendar pa lahko starejše samice pregledamo na brejost (v fazi 10-12 dni) z rahlim tipanjem (Silver, 1995).

2.2.6 Sesno obdobje

Pri miših je podobno kot pri drugih sesalcih vzdrževanje brejosti odvisno od prisotnih rumenih teles v jajčnikih. Porod se sproži zaradi degeneracije rumenih teles na jajčnikih in s tem velike spremembe v koncentraciji izločenega progesterona. Porod se začne ponavadi med polnočjo do 4.00 ure zjutraj (Rugh, 1990).

Preglednica 1: Razvoj miši od rojstva do odrasle velikosti (Inglis, 1980)

Čas (dni)	Vidni znaki sprememb
0 do 1	zaprte oči (vidna barva skozi veke) in ušesa, kratke brčice, so rožnate barve in goli, lahko jih že ločimo po spolu (genitalno-analna razdalja)
2 do 3	ušesa so odprta in brčice so daljše
5 do 16	koža postane močno pigmentirana
8 do 10	so delno poraščeni z dlako in je že vidna barva, vidni so seski pri samicah
11 do 14	oči so odprte, začno rasti zobje, mladiči postanejo bolj aktivni, manj sesajo
18	odprta ušesa se povečajo
21 do 23	dosežena je zrelost za odstavitvev, težje jih je ločiti po spolu zaradi poraslosti z dlakami, postanejo zelo aktivni
35 do 46	vagina se odpre (pri nekaterih linijah) in testesi se spustijo (se jih vidi), možno je opaziti spolno aktivnost

V preglednici 1 so zapisane zunanje značilnosti v razvoju miši. Miš se skoti brez dlake, z zaprtimi očmi in ušesi, pri samicah je vagina zaprta in prekrita z membrano. Dlaka začne rasti pri starosti 2 dni in ko so stari 3 do 5 dni se jim odprejo ušesa (Silver, 1995). Rugh (1980) omenja začetek rasti dlake pri starosti 3 dni in odprtje ušes pri starosti 3-4 dni. Gledati začnejo pri starosti 14 dni (Silver, 1995; Rugh, 1980). Mladiči postanejo pri 17-ih dneh zelo aktivni. S tem že začenjajo odstavitveni proces (Rugh, 1980).

Mladiči laboratorijskih miši se v prvih 14-ih dneh po rojstvu hranijo samo z materinim mlekom. Način prehrane samice v obdobju brejosti močno vpliva na razvoj zarodkov, prehrana v času laktacije pa določa mlečnost samice in s tem posledično vpliva na razvoj sesnih mladičev. Slaba prehrana samice vodi do manjše mlečnosti samice tudi do 40 %. V času laktacije to vpliva na dolgotrajno zmanjševanje konzumacije hranljivih snovi pri mladičih (Orešnik, 1979). Mlečnost samic, ki imajo gnezdo veliko, npr. do 14 mladičev, ne zadostuje za intenzivno rast mladičev, medtem ko so intenzivnejšo rast dosegli mladiči tistih samic, ki so imele gnezdo veliko do sedem mladičev (Bogovič, 1981).

Mladiče lahko odstavimo pri starosti 18 dni (Silver 1995), medtem ko so Cargill in sod. (2000) v svojem poskusu odstavljali med 20. in 22. dnem starosti. Mladiče inbridiranih

linij s slabšimi reprodukcijskimi lastnostmi je bolje odstaviti pri starosti štirih tednov. S tem bo večja verjetnost, da se bodo bolje razvili v odrasle živali (Silver, 1995).

Povprečne telesne mase mladičev ob odstavitvi so odvisne od števila mladičev v gnezd, ter od dolžine intervala od kotitve do odstavitve (Epstein, 1978). Samice, vzrejene v velikem gnezd, imajo manjšo telesno maso ob spolni zrelosti in tudi kasneje manjše število mladičev v lastnem gnezd. Obratno pa samice iz manjših gnezd dosežejo večjo težo ob spolni zrelosti in imajo gnezda z večjim številom mladičev (Eisen in Durrant, 1980).

Z zaporednim gnezd, pada povprečna rojstna masa mladičev ob odstavitvi, tako tistih v velikem, kot tudi tistih v majhnem gnezd (Bogovič, 1981). Johnson in sod. (2001a) so podobno ugotovili, da so mladiči v drugi laktaciji lažji ob rojstvu in tudi ob odstavitvi kot mladiči v prvi laktaciji. Zastoji v rasti do odstavitve niso posledica slabše mlečnosti samic, ampak jih lahko razložimo s pomanjkljivim funkcionalnim razvojem plodov v maternici (Orešnik, 1979).

2.3 PARAMETRI PLODNOSTI PRI SAMICAH LABORATORIJSKIH MIŠI

2.3.1 Doba med kotitvama

Izraz »doba med kotitvama« (DMK) uporabljamo za oznako intervala med dvema zaporednima gnezd. Dolžina te dobe je odvisna od različnih dejavnikov.

2.3.1.1 Vpliv velikosti gnezda

Samice z večjim gnezd, ki se oplodijo v času poporodnega estrusa, imajo ob vzporedni laktaciji daljši interval med zaporednima kotitvama kot samice z manjšim gnezd. S prelaganjem implantacije samice zagotovijo, da je vrh brejosti dosežen v tistem času, ko so sesni mladiči že odstavljani in se tako izognejo temu, da bi oba dogodka nastopila hkrati (Johnson in sod., 2001a).

Bogovič (1981) je v svojem poskusu ugotovila, da je doba med kotitvama trajala ob vzporedni laktaciji pri samicah z sedmimi mladiči v gnezd 21 dni, pri samicah z

štirinajstimi mladiči v gnezdu pa 23 dni. Samice z večjim številom mladičev v gnezdu so imele statistično značilno daljšo dobo med kotivama, kot samice z manj mladiči.

2.3.1.2 Vpliv linije

Miši genetsko heterogene linije MF1 so imele v kontrolni skupini normalno dolžino brejosti, skupina selekcionirana na velikost gnezda pa je imela dolžino druge brejosti med 21 in 30 dni, torej je bila implantacija prestavljena za 2 do 11 dni (Johnson in sod., 2001b).

2.3.2 Velikost gnezda

Eden glavnih parametrov plodnosti, ki jih spremljamo, je velikost gnezda. S tem je povezana sposobnost samice oz. velikost njene maternice, da »donosi« čim večje število mladičev (Bogovič, 1981). Na splošno imajo miši relativno velik reprodukcijski potencial. Velikost gnezda narašča nekje do tretjega, doseže vrh in se ustavi, nato proti koncu življenjskega reprodukcijskega ciklusa postopoma pada (Whittingham in Wood, 1983). Število mladičev v gnezdu in zaporednost posamezne laktacije vplivata na odstavitveno težo mladičev (Bogovič, 1981).

Na velikost gnezda vpliva več dejavnikov (Silver, 1995; Whittingham in Wood, 1983):

- maternalni vpliv
- število mrtvorojenih in zavrženih mladičev
- število živorojenih mladičev
- število odstavljenih mladičev
- vzporedna laktacija
- linija miši
- prehrana

2.3.2.1 Maternalni vpliv (vpliv matere)

Število ovuliranih jajčec določa zgornjo vrednost za število rojenih mladičev (Bünger in sod., 2005). Večje kot je število mladičev v gnezdu ob kotitvi, manjša je povprečna rojstna masa mladičev (Bogovič, 1981). Masa novorojenega mladiča se zmanjša, če se poveča število zarodkov v maternici in je tekmovalnost za oskrbo s hranljivimi snovmi znotraj večja in bolj intenzivna. Če se maternica ni prilagodila potrebam večjega števila zarodkov, potem so v večjih gnezdihi manjši mladiči in le ti bodo v rojstni masi zelo variabilni

(Engelen in sod., 1995). S povečevanjem velikosti gnezda se zmanjšuje rojstna masa posameznega mladiča, kar bi lahko pomenilo, da samice v času laktacije niso sposobne za oskrbo večjega števila plodov (Johnson in sod., 2001a).

Večje število zarodkov v maternici povzroči povečanje telesne mase matere in tiste, ki imajo večjo sposobnost za rast v času brejosti, lahko omogočijo preživetje večjemu številu zarodkov (Engelen in sod., 1995). Maternica, ki nima primerne fizične sposobnosti za vzdrževanje brejosti, lahko postane omejujoči dejavnik oz. ovira pri zgodnjem razvoju in kasneje ovira pri povečevanju telesne mase zarodkov (Bradford, 1971). Kadar je število zarodkov preveliko, ponavadi breje samice ob vzporedni laktaciji raje izločijo oz. odrinejo »odvečne« sesajoče mladiče, kot da bi pojedle več krme (Speakman, 2007).

Bogovič (1981) je v poskusu z mišmi linije NMRI, ugotovila, da je bila rojstna masa v gnezdih z večjim številom mladičev manjša. Pari, ki so ob prvi kotitvi imeli velika gnezda, so to lastnost obdržali naprej. Festing (1976) pa je v svojem poskusu ugotovil, da imajo inbridirane linije manjšo velikost gnezda, večjo smrtnost mladičev in s tem slabšo plodnost, kot križanci. Sposobnost maternice se povečuje, ko se povečuje telesna masa in delovanje ovulacije (Bradford, 1971). Kljub temu je bila smrtnost zarodkov pred porodom večja pri veliki liniji (NL) in manjša pri majhni liniji (NS) (Fowler in Edwards, 1960).

Maternalni vpliv so Cargill in sod. (2000) merili z odstotkom vseh gnezd, kjer so bili vsi mladiči mrtvorojeni, ubiti ali zavrženi. Primerjavo so delali med linijama HG (ang. *high growth*) in C57BL/6J (kontrolne živali), ter ugotovili, da so imele HG večji odstotek gnezd z vsemi mrtvorojenimi mladiči v primerjavi z C57BL/6J. Predvidevajo, da HG zgubijo veliko mladičev v pozni brejosti ali ob kotitvi, saj so imele na 17. dan brejosti več živih zarodkov kot samice C57BL/6J. Vzroki izgub pred rojstvom so lahko neuspešna oploditev, neuspešna implantacija ali pa smrtnost zarodkov ali plodov po implantaciji (Bradford, 1971).

2.3.2.2 Vpliv laktacije na velikost gnezda

Orešnik (1977) navaja podatke o slabi plodnosti pri miših heterogene linije NIH, kjer so bolj obremenjene samice imele v zaporednih paritvah slabšo plodnost. Vzrok temu naj bi

bilo veliko število sesnih mladičev. Podobno navaja tudi Bogovič (1981), kjer so imele samice manj mleka v drugi oz. tretji laktaciji, ko so kotile največ mladičev.

2.3.2.3 Vpliv linije na velikost gnezda

S selekcijo na povečanje odrasle velikosti je v poskusu Bradford (1971) ugotovil, da se povečuje tudi velikost gnezda, ki potem po končani selekciji ostane na približno enaki ravni. Tudi Büngrer in sod. (2005) pravijo, da se s selekcijo na slabšo rast ponavadi zmanjša tudi velikost gnezda. V nasprotju pa so v neki drugi raziskavi (Büngrer in sod. 1992) z uspešno selekcijo na povečanje telesne mase posledično zmanjšali velikost gnezda pri samicah, ki jim niso standardizirali število mladičev v gnezdu, za 3,8 mladiča (podatkov o prvotni velikosti gnezda niso navedli). Eisen in Durrant (1980) sta pri selekciji na velikost gnezda ugotovila, da so imele samice s povečano telesno maso tudi povečano velikost gnezda.

2.3.2.4 Vpliv prehrane na velikost gnezda

Festing (1976) je v svoji raziskavi primerjal vpliv različne prehrane na plodnost inbridiranih linij miši in prvo generacijo križanja teh linij. Uporabil je dve vrsti krme: krma FFG sterilizirana z obsevanjem pod gama žarki (kontrolna krma) in krma FFG sterilizirana po istem postopku, poleg tega pa še avtoklavirana na 127 °C za 30 minut. Na avtoklavirani krmi inbridirane linije v povprečju niso uspele proizvesti drugega gnezda, ali pa so imele gnezdo po daljšem presledku. Interval med zaporednima gnezdoma je trajal 27,6 dni. Križanci med linijami (F1 generacija) so skorajda vsi proizvedli drugo gnezdo, vendar šele po daljšem intervalu in na kontrolni krmi. Učinek avtoklavirane krme v primerjavi s kontrolno krmo je bil pri križancih večji. Ti so imeli boljšo plodnost in večje število mladičev na samico kot inbridirane linije. Njegova ugotovitev je bila, da so križanci fenotipsko stabilnejši in se lažje prilagodijo neugodnim pogojem (avtoklavirana krma).

2.3.3 Razmerje spolov

V teoriji se vsa oplojena jajčeca, ki končajo kot živorojeni mladiči, v povprečju razdelijo po spolu na polovico. Razmerje 1:1 predstavlja v povprečju le verjetnost, predvsem pa ne moremo to trditi za eno samo paritev. V praksi je opazen rahel nagib v prid samcev (Rugh,

1990). V preglednici 2 so za primerjavo prikazani odstotki samcev v gnezdu med nekaterimi linijami.

Preglednica 2: Odstotek samcev v gnezdu (Altman in Dittmer Katz, 1979)

LINIJA	Razmerje spolov (% ♂)	
	Rojstvo	Odstavitev
BALB/c	52,5	/
CBA	/	49,9
C3H/He	/	50,3
C57BL	54,9	51,9
A2G	/	48,0

Rosenfeld in sod. (2003) so v svoji raziskavi spremljali kako vpliva prehrana na razmerje samcev in samic v gnezdu. Uporabili so dve različni dieti, LF (malo nasičenih maščobnih kislin in več ogljikovih hidratov) in VHF (veliko nasičenih maščobnih kislin, predvsem iz svinj. masti). Rezultati so pokazali, da so imele samice na dieti LF večje število samic v gnezduh (v četrtem zaporednem gnezdu 62 % samic) in samice na dieti VHF večje število samcev v gnezduh (v četrtem zaporednem gnezdu 71 % samcev). Pri tem je na razmerje spolov vplivala dieta in ne teža matere.

Vandenbergh in Huggett (1994) sta ugotovila, da na razmerje spolov v gnezdu lahko vpliva tudi položaj plodu v maternici pred rojstvom. Kljub temu, da je bil skupni delež samcev 49,7 %, so bile med posameznimi gnezdi velike razlike. Samice, ki so bile v maternici med dvema samcema, so imele večji delež moških potomcev, kot samice, ki v maternici niso bile poleg samcev.

2.3.4 Število gnezd

Miši imajo v svojem življenjskem reprodukcijskem obdobju od dve do šest gnezd, kar je odvisno predvsem od linije. Poznavanje lastnosti samice o njeni sposobnosti za čim večje število gnezd je pomembno predvsem za raziskovalne inštitucije, ki se tako lažje odločijo koliko samic potrebujejo in koliko časa naj jih izkoriščajo, da dobijo določeno število mladičev. Dalj časa kot je samica v reji, večji so stroški, zato je pomembno, da v tem času od nje dobijo čim več potomcev. To je še bolj pomembno pri linijah, ki so slabše plodne in imajo v povprečju manjša gnezda. V preglednici 3 so predstavljene povprečne vrednosti za

velikost gnezda in število gnezd na samico za bolj pogosto uporabljene linije miši v raziskavah.

Preglednica 3: Število in velikost gnezd izbranih posameznih inbridiranih linij miši, objavljeno po različnih avtorjih

LINIJA	POVPREČNA VELIKOST GNEZDA	ŠTEVILO GNEZD	VIR
A/J	6,3	2,9	Silver, 1995;
	5,0	/	Crispens, 1975; Crispens, 1979
AKR/J	6,1	2,2	Silver, 1995
	5,3	/	Crispens, 1975
BALB/cJ	5,2	3,8	Silver, 1995;
	5,3	/	Crispens, 1979
C3H/HeJ	5,7	2,9	Silver, 1995;
	6,2	/	Crispens, 1975;
	6,2		Crispens, 1979
C57BL/6J	7,0	4,0	Silver, 1995;
	6,0	/	Crispens, 1975;
	6,0		Crispens, 1979
CBA/CaJ	6,9	2,7	Silver, 1995;
	5,3	/	Crispens, 1975;
	5,3		Crispens, 1979
DBA/2J	5,4	3,9	Silver, 1995;
	4,9	/	Crispens, 1975
	4,9		Crispens, 1979
SJL/J	6,0	3,1	Silver, 1995;
	7,9	/	Crispens, 1975; Crispens, 1979
DBA/1	3,0	4,0	Festing, 1975
	4,1	/	Crispens, 1975 Crispens, 1979
A2G	6,0	5,0	Festing, 1975
	5,4	/	Crispens, 1975 Crispens, 1979
CBA	7,3	4,0	Festing, 1975
	6,3	/	Crispens, 1975 Crispens, 1979
C57BL	5,0	4,0	Festing, 1975
	7,0	/	Crispens, 1975 Crispens, 1979

Samice z manjšim številom gnezd (npr. AKR/J) v življenjskem reprodukcijskem obdobju imajo večjo povprečno velikost gnezda, kot samice z večjim številom gnezd (npr. DBA/2J).

2.3.5 Število odstavljenih mladičev

Število mladičev v gnezdu, kjer so bile živali vzrejene, ima pomemben vpliv na maso odraslih živali. Velikost gnezda vpliva tudi na reprodukcijske lastnosti samic, ki so bile v njem vzrejene (Suckow in sod., 2001). Samice vzrejene v majhnih gnezdih so imele odprtje vagine pri nižji starosti in večji telesni masi, kot samice vzrejene v velikih gnezdih (Nelson in Robison, 1976a).

Čim večja so gnezda ob odstavitvi, tem lažji so odstavljeni mladiči (Bogovič, 1981). Tudi Eisen in Durrant (1980) pravita, da se s povečevanjem števila mladičev v gnezdu zmanjšuje njihova odstavitvena teža. Ob paritvi so tako samice, ki izhajajo iz gnezda z večjim številom mladičev, lažje. Če želimo povečati število odstavljenih mladičev na gnezdo, je bolje če samico, ki je vidno breja, ločimo v drugo kletko (Suckow in sod., 2001).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 LABORATORIJSKE MIŠI IN NOMENKLATURA

Poimenovanje laboratorijskih miši in podgan še vedno v večini ni poenoteno. Najpogosteje uporabljeni izraz za prevod anglešk besede »strain« je sev ali soj, ki je glede na značilnosti takih osebkov strokovno neustrezen. Izraz sev v biološkem smislu pomeni skupino mikroorganizmov iste vrste s posebnimi lastnostmi. Tako se v biološkem in socialnem pomenu uporablja za označitev potomstva živali in ljudi v zaporednih generacijah izraz linija (SSKJ, 2005; cit po Perše in Rozman, 2006). Homozigotne osebke, ki so parjeni v ožjem sorodstvu in so zaradi tega genetsko identični, označujemo s strokovnim izrazom inbridirana linija (angl. *inbred strain*) (Ločniškar, 1999).

3.1.1 Nastanek linije FLI in FHI

V poskusu smo spremljali plodnost pri dveh selekcioniranih linijah miši, FLI ali F (*fat*), ki imajo velik delež telesnih maščob in FHI ali L (*lean*) z manjšim deležem telesnih maščob. V laboratoriju v Edinburghu na Škotskem so začeli s selekcijo linij miši iz trosmernega križanja, kjer so vključili dva inbridirani liniji CBA in JU, ter eno genetsko heterogeno linijo CFLP. Paritve v prvi generaciji so potekale naključno in so jo označili kot generacijo 0 (Sharp in sod., 1984).

V nadaljevanju je iz izhodiščne generacije 0 potekala selekcija v treh selekcioniranih linijah (Sharp in sod., 1984):

- Linija A (apetit) – selekcionirana glede na konzumacijo krme
- Linija F (debelost) – selekcionirana glede na delež telesnih maščob
- Linija P (protein) – selekcionirana na telesno maso pri 10-ih tednih starosti.

Za vsako lastnost so upoštevali tri selekcijske kriterije v treh ponovitvenih linijah:

- linija selekcionirana na podlagi povečanja opazovane lastnosti,
- linija selekcionirana na podlagi zmanjšanja opazovane lastnosti
- kontrolna linija, ki ni bila selekcionirana, ampak so bile paritve naključne. Končno število linij je bilo 27 : 3x3 za linijo A + 3x3 za linijo F + 3x3 za linijo P. Na začetku je vsako linijo sestavljalo 16 paritev, od osme generacije dalje pa le še osem paritev (Sharp in sod., 1984).

Linija F, iz katere izhajata naši liniji, je bila selekcionirana glede na odstotek gonadalne maščobe pri samcih starih 10 tednov. Gonadalna maščoba je maščobna zaloga in se jo lahko z disekcijo hitro in natančno določi. Korelacija med odstotkom gonadalnih in skupnih maščob je visoka, kar 0,9. Ta kriterij so upoštevali pri odbiru samcev z najmanjšim in največjim odstotkom gonadalnih maščob. V 11. generaciji so naredili prvo obsežnejšo analizo fenotipskih sprememb – pri liniji F, selekcionirani na večji odstotek gonadalnih maščob, se je le ta povečal za 36 %, pri liniji F selekcionirani na manjši odstotek gonadalnih maščob, pa se je zmanjšal za 44 % od kontrolnih vrednosti (Sharp in sod. 1984).

Po dvajsetih generacijah parjenja so vse tri selekcionirane in vse tri ponovitvene linije F križali, da bi formirali eno samo F in eno L linijo (Horvat in sod., 2000). Seleksijski kriterij se je spremenil in samce so odbirali pri starosti 14 tednov glede na odstotek telesnih maščob določen z metodo sušenja zamrznjenih vzorcev (Hastings in Hill, 1989; cit. po Bünger in Hill, 1999). Končni odstotek maščob v osnovni (kontrolni) populaciji je tako znašal 10 %. Po 53-ih generacijah parjenja se je delež maščobe v telesu pri 14 tednov starih samcih v F liniji povečal na 23 % in pri L liniji zmanjšal na 4% (Bünger in Hill, 1999).

3.2 OSKRBA MIŠI

Pri oskrbi miši se je potrebno strogo držati določenih zahtev. Miši so zelo dojemljive za različne bolezni, zato se je potrebno pred vstopom v kolonijo preobleči v čisto obleko in gumijaste škornje, v katerih pridemo od garderobe do vhoda v samo kolonijo. V koloniji se preobujemo, nadanemo mrežasto kapo, masko za usta, gumijaste rokavice za enkratno uporabo in haljo, ki se nahaja samo v sobi z nastanjenimi živalmi. Prostor ima glavni vhod in hkrati tudi tako imenovani čisti vhod, kjer prinašamo čiste in razkužene kletke, ter druga vrata, kjer iz kolonije odnašamo umazane kletke, izločene živali in vso orodje in material, ki se ne sme križati s čistimi potmi. Za razkuževanje prostora in predmetov v prostoru uporabljamo razkužilo VirkonS (KRKA, Slovenija). Karkoli prinašamo v kolonijo (vreče stelje, krme, različne posode, itd.) moramo dobro razkužiti tako, da s pripravljenim razkužilom v razpršilniku poškropimo material.

3.2.1 Krma in voda

Dnevno smo pregledali in poskrbeli, da so imele živali na voljo zadostno količino krme v krmilniku in vode v napajalniku. Napajalniki so plastični s kovinskim nastavkom, v obliki stekleničke z volumnom 200 ml. Vodo smo natočili v večji sod in jo razredčili s 37 % HCl tako, da je imela pH 3-4. Tako pripravljeno smo nalili v posamezne napajalne stekleničke.

Krmili smo po volji peletirano krmo Altromin 1324, ki po deklaraciji vsebuje: SB 19,00 %, SM 4,00 %, SVI 6,00 %, SP 7,00 %, Ca 0,90 %, P 0,70 %, vit A 15.000 IE, vit D3 600 IE, vit E 75 mg, Cu 5 mg.

3.2.2 Temperatura in vlaga zraka, ter svetloba

V koloniji smo imeli 12-urni svetlobni cikel, torej 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Povprečno stanje temperature zraka je bilo $21,0 \pm 0,5$ °C. Relativna vlaga je bila za časa poskusa med 50-70 %.

3.2.3 Oprema

Uporabljali smo kletke (Techniplast, Italija) dimenzije 33 cm dolžina x 16 cm širina x 12,5 cm višina. Kletke so bile razporejene v stojalu s prostorom za 64 kletk.

3.2.4 Čiščenje

Enkrat tedensko smo opravili čiščenje kletk. V oprane kletke smo nasuli svežo steljo, vanje postavili živali in jih pokrili z čistimi mrežami. Stelja je iz lesnih opilkov, pripravljena posebej za laboratorijske živali, ki jo dela podjetje Lignocel iz Nemčije (J. Rettenmaier & Söhne). Zamenjali smo tudi napajalne stekleničke s svežo vodo, ter presuli krmo. Brejim samicam smo kot obogatitev dodali poseben bombažen izdelek (ang. »nestlets«, Plexx) za pripravo gnezda. Posamezna stojala s kletkami smo na grobo očistili z metlico in posesali prostor. Zamenjali smo tudi filtre na zračniku klime naprave. Na koncu smo posameznim kletkam, kjer je primanjkovalo krme, dodali sveže pelete po potrebi.

V zunanjem delu je potekalo čiščenje in razkuževanje umazanih kletk. S posebno metlico smo počistili umazano steljo iz kletk ter jih postopoma prali v pomivalnem stroju (Winterhalter). En cikel pranja traja tri minute pri temperaturi 95°C ob uporabi detergenta

in sredstva za izpiranje. Tako je oprema po pranju sterilizirana (Prevoršek, 2005). Čiste kletke odlagamo na poseben pult, kjer počakamo da se posušijo. Paziti moramo, da si med prenašanjem čistih in umazanih kletk dobro razkužimo rokavice. Oprane in posušene kletke takoj prenesemo v kolonijo. Prostor z oprano opremo, po čiščenju, pustimo čez noč pod UV lučjo.

3.3 ANALIZA ZBRANIH PODATKOV IZ REJE

V koloniji vodijo register z zapisanimi podatki o živalih, ki so v koloniji. Zbrani so podatki o paritvah, gnezdih in odstavljenih mladičih.

Pregled nad živalmi v koloniji je sistematičen. Posamezne paritve in nova gnezda zapisujejo na liste, ki so shranjeni v mapah, tudi ko živali ni več v koloniji. Čeprav so na oblikovanih matricah označeni prostori za pregled nad določenimi parametri, nekaterih niso redno spremljali, ker je bila mišja kolonija šele v ustanavljanju in ni bilo rednega osebjaja za oskrbo.

V paritvenem listu so zapisani podatki o starših (samec in samica, ki sta bila združena v paritev): linija, generacija, identifikacijska številka (zaporedno gnezdo, spol, ušesna številka), datum rojstva, datum paritve (v nekaterih primerih je to hkrati datum odstavitve) in datumi zaporednih gnezd v posamezni paritvi.

V registru sledijo zaporedno za paritvenim listom, listi s podatki o novem gnezdu. Na njih so zapisani podatki za generacijo potomcev, zaporedna številka gnezda, datum paritve staršev, datum odstavitve mladičev, podatki o starših, datum rojstva in podatki o gnezdu (spol, število, ID in tehtanja). Podatki so zapisani tudi na plastičen listek, ki je obešen na kletki.

Za diplomsko nalogo smo analizo zbranih podatkov opravili za liniji FLI in FHI. V koloniji pa na podoben način vodijo evidenco tudi za vse ostale linije.

3.3.1 Paritve

V koloniji se poslužujejo treh možnih načinov parjenja miši:

- monogamno parjenje (je v koloniji bolj poredko)
- trojna paritev (ta način je kar pogost)

- poligamno ali haremska parjenje (ta način je zelo pogost)

Monogamne paritve pomenijo eno samico na enega samca. V koloniji take paritve nastavijo že takoj ob odstavitvi mladičev tako, da datuma dejanske paritve nimajo. Lahko odčitamo koliko gnezd je imela samica in kdaj so bili posamezni datumi rojstev teh gnezd.

Trojna paritev pomeni dve samici na enega samca. Tu se je v večini primerov še dalo določiti kateri samici pripada določeno gnezdo in s tem tudi število mladičev v tem gnezdu.

Haremski način parjenja predstavlja več samcev in samic v isti kletki. Brejih samic ne ločujejo, ampak le te ostanejo do kotitve v kletki. Tako je zelo težko ali skoraj nemogoče določiti, kateri samici pripada določeno gnezdo. Datum paritve smo tu določili kot razliko med rojstvom gnezda in povprečno dolžino brejosti 21 dni, ki jo najdemo v številnih objavah. V taki paritvi je bilo veliko gnezd potolčenih, pogosta pa so bila številčnejša gnezda, kar je bila verjetno posledica dveh kotitev hkrati – potem sta obe samici skrbeli za »skupno« gnezdo. Takih podatkov v analizi nismo upoštevali.

Pogost način parjenja je bilo tudi rotiranje samca, saj je bilo vmes obdobje pomanjkanja živali oz. samcev s preverjenimi reprodukcijskimi sposobnostmi.

3.3.2 Odstavitve

Mladiče odstavljajo skupaj v isto kletko, kadar gre za manjše število mladičev. Slednji ostanejo skupaj do paritve in naprej. Če je v gnezdu več mladičev, naredijo po potrebi nove mlade paritve, ostale izločijo.

Na listu za popis novega gnezda je zapisano: generacija potomcev, podatki o starših, število živorojenih po spolu in mrtvorojenih. Zadnjih dveh podatkov niso redno zapisovali, zato jih nismo vključili v analizo. Zapisani pa so bili podatki o rojstvu gnezd, ter število morebitnih odstavljenih mladičev. Morebitno omenjamo zato, ker so nekatera gnezda izločali že pred odstavitvijo, če je bilo več živali, kot so jih potrebovali. Vendar pa v tem primeru niso zapisali števila in spola izločenih odstavljenec. Tudi takih podatkov o gnezdu v analizi nismo upoštevali. Tam, kjer je bilo zapisano, se je dalo ločiti podatke o mladičih po spolu, samice so označene s črkami od A do O in samci od P do Z.

3.3.3 Pregled podatkov iz reje

Pregled smo opravili na štirih generacijah za linijo FHI in štirih generacijah za linijo FLI.

Te generacije so bile v reji približno eno leto in pol:

-za linijo FHI so bili podatki zbrani iz štirih generacij (42, 43, 44, 45) v obdobju od 7.3.2005 do 14.12. 2006

- za linijo FLI so bili podatki zbrani iz štirih generacij (43, 44, 45, 46) v obdobju od 8.7.2005 do 15.12.2006

Podatke smo prenesli iz registra prisotnih živali v koloniji, v program Excel (Microsoft office, 2003), kjer smo opravili osnovno statistiko posameznih parametrov. Pri obdelavi smo upoštevali le podatke, ki so bili na voljo v celoti:

1. Starost ob prvi paritvi
2. a) Starost ob prvi kotitvi
b) Obdobje med 1. in 2. kotitvijo, 2. in 3. kotitvijo ter 3. in 4. kotitvijo
3. Število odstavljenih mladičev: po gnezdih in po spolu

3.4 POSKUS

3.4.1 Izbira miši

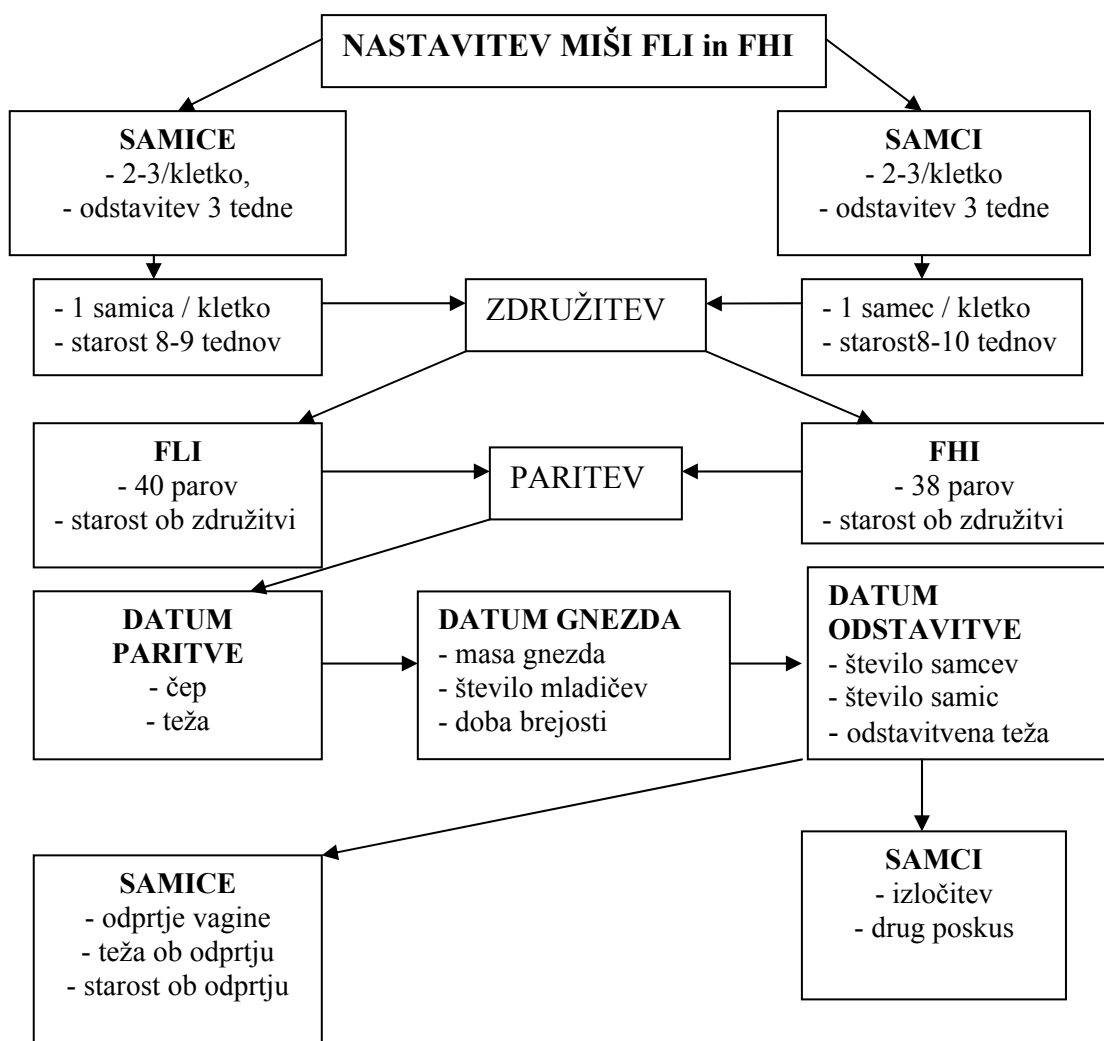
Poskus smo začeli v mesecu maju 2006. Miši linije FHI in FLI smo odstavljali pri starosti treh tednov. Zbirali smo jih iz prisotnih paritev v koloniji. V posamezno kletko so bile odstavljene po tri živali, samice in samci ločeno. Miši so bile v kletkah skupaj do starosti 8 do 10 tednov.

3.4.2 Nastavitev paritev

Julija 2006 smo nastavili prve pare oz. paritve za spremljanje plodnosti. Do septembra 2006 smo nastavili za linijo FLI 40 paritev in za linijo FHI 38 paritev. Živali so bile ob paritvi stare 8 do 10 tednov.

Postopek izvedbe poskusa je shematično prikazan na sliki 3. Paritve so bile monogamne. V vsaki paritvi smo sledili uspešnost kopulacije, katere znak je vaginalni čep in si zapisali datum in težo samice ob kopulaciji. Posamezne paritve smo po uspešni kopulaciji samca in samice (velja, če je kopulaciji sledila brejost pri samici), pregledovali za novim gnezdrom.

Novo gnezdo smo tehtali na drugi dan in mladiče prešteli. Datum kotitve nam je služil pri izračunu povprečne dobe brejosti in dobe med posameznimi kotitvami. Mladiče smo odstavljali na 21. dan po rojstvu. Ob odstavitvi smo jih stehali ter samce in samice ločili v posamezne kletke. Odstavljene samice smo v naslednjih dneh pregledovali za odprtjem vagine in jih na ta dan tudi stehali. Samce smo po potrebi uporabili za drug poskus ali izločili.



Slika 3: Postopek izvedbe poskusa za analizo plodnostnih parametrov linij FLI in FHI

3.4.3 Vodenje evidenc v poskusu

V paritveni list smo zapisali podatke o starših (samca in samice, ki sta bila združena v paritev): linija, generacija, identifikacijska številka (zaporedno gnezdo, spol, ušesna

številka), datum rojstva, datum paritve, teža ob paritvi in datum prvega gnezda. Dnevno smo pregledali posamezno kletko in tako sledili reprodukcijskim dogajanjem.

Vsako novo gnezdo smo zapisali na posamezne liste, ki so zaporedno sledili paritvenemu listu. Podatke smo zapisali tudi na listek, ki se je potem nahajal na kletki in smo tako živali izsledili in opazovali. V dnevni koledar opravil smo zapisali tudi datum odstavitve novega gnezda, to je 21. dan od dneva rojstva.

3.4.4 Odkrivanje vaginalnih čepov

Vsak dan od paritve naprej smo samice pregledovali za prisotnost vaginalnega čepa. Pregled smo opravljali ob 9.00 uri, ker se miši ponavadi parijo ponoči. Tako smo lahko pravočasno opazili čep. Na dan pojava čepa smo samico stehtali in nato pregled ponavljali 8 dni zapored. Če se v teh dneh ni pojavil nov čep, smo predvidevali to kot uspešno paritev in samico pregledali na brejost. Če pa se je pojavil nov čep, je to pomenilo, da je prišlo do nove kopulacije. Samica je tako prišla v reciklažo (1-8 dni) oz. v nov estrični cikel (1-4 dni).



Slika 4: Pregled samice za prisotnost vaginalnega čepa (foto: Prevoršek Z., 2006)

Pri pregledu za vaginalni čep smo samico postavili na mrežo kletke in ji narahlo privzdignili rep. Kadar je prišlo do kopulacije se je v vagini samice naredil bel do rumenkast strdek. To se lepo vidi brez razpiranja vulve. Kadar se čepa ni videlo dobro oz. je bil le ta globlje v vagini, smo si pomagali s palčko (slika 4).



Slika 5: Breja samica genetsko heterogene linije ICR (foto: Zanjekovič A., 2007)

Na sliki 5 je breja samica linije ICR, ki lahko skoti povprečno 8 mladičev. Samica je visoko breja, kar se lepo vidi. Brejost pri liniji FLI je vidna manj izrazito, pri liniji FHI pa samo kadar samica nosi večje število zarodkov.

Po pregledu na brejost, kjer je bila ta uspešno vidna, smo pustili samico čim bolj na miru. Stres lahko povzroči abortus in s tem prekinitev brejosti, pri vzporedni laktaciji se lahko pojavi tudi kanibalizem (žretje mladičev). Iz predhodnih objav smo, za lažje opazovanje datuma pojava gnezda, vzeli povprečno dolžino brejosti, 21 dni. Medtem ko se miši pariyo v nočnih urah, pa kotitve pogosto potekajo popoldan, ko se živali umirijo.

3.4.5 Tehtanje

3.4.5.1 Masa gnezda ob rojstvu

V zadnjih dneh brejosti smo bili bolj pozorni in si na dan rojstva mladičev zapisali datum rojstva in prešteli živorojene mladiče (opazno mleko v želodčku) in mrtvorojene mladiče (sem smo šteli vse pogrižene in zavržene mladiče). Število mrtvorojenih v našem poskusu ni tako zanesljiva številka, saj bi morali za to miši dejansko spremljati 24 ur/dan. Samice namreč pogostokrat šibke mladiče pojedjo.

Naslednji dan smo gnezdo stehtali. Na tehtnico smo položili papirnato brisačo, nanjo pa mladiče. Po tehtanju smo mladiče ponovno prešteli. Če se je število mladičev med prvim in drugim dnem razlikovalo, smo razliko upoštevali kot mrtvorrojene mladiče. Pri tehtanju smo med posameznim gnezdом dobro razkužili rokavice, da ne bi prenašali vonjav med gnezdami. Maso posameznega mladiča smo dobili kot izračun med povprečnim številom mladičev in povprečne mase gnezda.



Slika 6: Gnezdo z en dan starimi mladiči, levo in z dva dni starimi mladiči, desno (foto: Zanjekovič A., 2006)

Na sliki 6 je za primerjavo prikazano gnezdo, staro en dan in gnezdo staro dva dni. En dan stari mladiči so temno rdeče do vijolične barve, koža je rahlo nagubana, ter jih ločimo od dva dni starih mladičev glede na prisotnost mleka v želodcu. Poleg prisotnega mleka v želodcu je pri dva dni starih mladičih tudi koža že bolj napeta in gladka.

3.4.5.2 Odstavitvena telesna masa mladičev

Gnezda smo odstavljali na 21. dan starosti. V primeru velikega gnezda in slabše doraslih mladičev smo odstavitve prestavili za 2-4 dni. Na dan odstavitve smo mladiče zopet prešteli in ločili po spolu. Vsakega mladiča smo stehtali in identificirali tako, da je dobil svojo ušesno številko. V registru je poleg te številke zapisana še številka gnezda v katerem je rojen in njegov spol. Ločene po spolu smo naselili v posamezne kletke, najprej po 5 živali na kletko do 6. tedna, nato pa so bili razeljeni po 3 živali na kletko.

Samice smo po odstavitvi pozorno opazovali naprej za morebitno novo kotitev. Postopek smo ponovili, ko je samica skotila novo gnezdo.

Odstavljenim v poskusu rojenim samicam smo v nadaljem poskusu opazovali odprtje vagine. To naj bi bil začetek spolne zrelosti, saj jo od tega trenutka naprej lahko samec zaskoči. Kljub temu samice niso vedno pripravljene na kopulacijo. Samicam smo pregledovali vagino vsak dan in jih ob odprtju tudi stehali. Nelson in Robison (1976a) poudarjata, da je odprtje vagine znak pubertete, vendar to poimenovanje ne pomeni še pojava prvega estrusa oziroma spolne zrelosti.

3.5 OBDELAVA PODATKOV

V programu Excel smo opravili osnovno statistiko za parametre plodnosti po podatkih iz evidenc. Pri obdelavi podatkov o brejosti smo samice z dobo brejosti krajšo od 18 dni in daljšo od 24 dni, izključili iz obdelave.

Posamezne parametre plodnosti (število rojenih, živorojenih, mrtvorojenih in odstavljenih mladičev, maso gnezda ob rojstvu, maso rojenega mladiča in maso odstavljenega mladiča) smo testirali v spodaj zapisanem modelu z metodo GLM (General linear model) v programu SAS (SAS, 1999-2001).

$$\text{Model: } y_{ijk} = L_i + G_j + LG_{ij} + e_{ijk} \quad \dots(1)$$

y = lastnost

L_i = linija $i = 2$

G_j = zaporedno gnezdo $j = 4$

LG_{ij} = razmerje med linijo in gnezdrom

e_{ijk} = napaka

Ostale parametre za podatke iz poskusa (doba brejosti, doba med kotitvami, paritvena teža samice, starost samice ob uspešni kopulaciji) smo testirali v modelu samo za vpliv linije.

$$y_{ij} = \mu + L_i + e_{ij} \quad \dots(2)$$

y = lastnost

L_i = linija $i = 2$

e_{ij} = napaka

Vpliv velikosti gnezda (število živorojenih mladičev) na maso rojenega mladiča smo pregledali v modelu:

$$y = \mu + b(x) + e \quad \dots(3)$$

$y = masa$

$x = število \text{ živorojenih}$

$e = napaka$

4 REZULTATI

4.1 ANALIZA ZBRANIH PODATKOV IZ REJE

4.1.1 Pregled paritev

Pregled podatkov smo najprej opravili za vsako linijo posebej za štiri generacije od marca 2005 do decembra 2006, da bi ugotovili splošno stanje v linijah. Po mnenju številnih raziskav način paritve, ki se je poslužujemo, močno vpliva na plodnost samice, kot tudi samca. Poligamne paritve velikokrat povzročijo kanibalizem mladičev, agresivnost med samci, ki se rangirajo, težko pa tudi sledimo stanju posamezne samice. Brejo samico bi morali iz poligamne paritve izolirati in jo po odstavitvi vrniti nazaj in na ta način spremljati ali je aktivna ali ne. Ta praksa se v tej koloniji ne izvaja. Samice in samci so v katerihkoli paritvah stalno skupaj. Izjema so bile nekatere paritve, ker so morali samca rotirati, zaradi pomanjkanja živali.

Generacija potomcev je številka generacije, ki jo dobi vsaka nova paritev. Starši v tej generaciji potomcev imajo oz. izhajajo iz svoje generacije (ponavadi ena do dve generaciji nazaj) in imajo svojo oznako.

V koloniji ne spremljajo dejanskega nastopa kopulacije, saj je večina samcev in samic v paritvi skupaj že od odstavitve. Tako smo za izračun dobe med kotitvama (DMK) vzeli povprečno dolžino brejosti (21 dni), ki je navedena tudi v strokovnih objavah.

4.1.1.1 FLI linija

V preglednici 4 je podana osnovna statistika paritev za linijo FLI. Skupno število paritev v štirih opazovanih generacijah je bilo 34. Največje število paritev je bilo v generaciji 46 in temu primerno tudi največje število odstavljenih mladičev in znaša, od skupnega števila odstavljenih mladičev v štirih generacijah, kar 43%. Najmanj mladičev je bilo odstavljenih v generaciji 43 in znaša 14 % od skupnega števila odstavljenih mladičev.

Preglednica 4: Osnovna statistika za linijo FLI

	GENERACIJA				Skupaj
	43	44	45	46	
ŠTEVILO PARITEV	7	8	6	13	34
ŠTEVILO SAMIC	10	15	16	26	67
ŠTEVILO SAMCEV	8	11	8	19	46
ŠTEVILO VSEH GNEZD (GN)	18	22	21	47	114
ŠTEVILO ODSTAVLJENIH MLADIČEV (OM)	66	96	102	199	463
$\bar{x}$ OM / GN	3,67	4,36	4,86	4,23	4,10

$\bar{x}$ OM / GN – povprečno število odstavljenih mladičev na vsa gnezda

Za linijo so bile poleg monogamnih, značilne tudi trojne in poligamne paritve. To je razvidno iz preglednice 5, kjer je zapisano, da je bilo skupaj prisotnih kar 15 poligamnih paritev in štiri trojne. Največ poligamnih paritev je bilo v generaciji 46.

Preglednica 5: Število samic v posameznih sistemih parjenja

PARITEV	GENERACIJA				Skupaj
	43	44	45	46	
monogamna	4	5	/	6	15
trojna	2	/	1	1	4
poligamna	1	3	5	6	15

Doba od paritve do prve kotitve je v povprečju za štiri generacije znašala 59 dni, kar pomeni da je prišlo do kopulacije precej kasneje od nastavitve paritve. Ta doba je najkrajša v generaciji 43, kjer je najmanj poligamnih paritev in najdaljša v generaciji 45, kjer je drugo največje število poligamnih paritev.

Preglednica 6: Starost samice ob prvi in zadnji kotitvi ter trajanje dobe med zaporednima kotitvama za linijo FLI

	GENERACIJA				Povprečje
	43	44	45	46	
SPUK (dni)	106	107	79	70	86
SPK (dni)	127	128	100	93	108
SZK (dni)	173	192	146	137	140
DPK (dni)	32	53	79	62	59
DMK ₁ (dni)	42	39	55	32	34
DMK ₂ (dni)	43	31	52	34	40
DMK ₃ (dni)	/	74	/	31	42

SPUK – starost ob prvi uspešni kopulaciji; SPK – povprečna starost samice ob prvi kotitvi; SZK – povprečna starost samice ob zadnji kotitvi; DPK – doba od paritve do prve kotitve; DMK₁ – doba od prve in drugo kotitvijo; DMK₂ – doba od druge in tretje kotitve; DMK₃ – doba od tretje do četrte kotitve

4.1.1.2 FHI linija

Osnovna statistika paritev za linijo FHI je zapisana v preglednici 7. Največje število paritev je bilo v generaciji 45 in je znašalo 28 % od vseh paritev. Vendar pa je bilo največje število odstavljenih mladičev v generaciji 44, kjer je bilo najmanjše število paritev, in je znašalo 25 % od vseh paritev. Najmanjše število mladičev je bilo v generaciji 43 in je znašalo 22 % od vseh odstavljenih mladičev.

Preglednica 7: Osnovna statistika za linijo FHI

	GENERACIJA				SKUPAJ
	42	43	44	45	
ŠTEVILO PARITEV	9	9	7	10	36
ŠTEVILO SAMIC	9	13	10	12	46
ŠTEVILO SAMCEV	13	10	7	11	43
ŠTEVILO VSEH GNEZD (GN)	22	24	27	20	93
ŠTEVILO ODSTAVLJENIH MLADIČEV (OM)	80	77	104	89	350
$\bar{x}$ OM / GN	3,64	3,21	3,85	4,45	3,76

$\bar{x}$ OM / GN – povprečno število odstavljenih mladičev na vsa gnezda

Največ poligamnih paritev je bilo v generaciji 44 in to 57,1 % od vseh poligamnih paritev. Hkrati pa je bilo v tej generaciji tudi najmanjše število monogamnih paritev, ki je znašalo 9,5 % od vseh monogamnih paritev (preglednica 8).

Preglednica 8: Število samic v posameznih sistemih parjenja za linijo FHI

	GENERACIJA				
PARITEV	42	43	44	45	SKUPAJ
monogamna	8	3	2	8	21
trojna	/	6	1	1	8
poligamna	1	1	4	1	7

Za linijo FHI niso bile značilne poligamne paritve, a kljub prevladujočim monogamnimi paritvam je bila starost ob prvi kopulaciji veliko višja. Slednja je bila najvišja v generaciji 43, a v primerjavi z ostalimi generacijami ni velikih razlik. Pri slednjih se starost ob prvi kopulaciji razlikuje za 1-8 dni in v povprečju ostaja približno enaka.

Preglednica 9: Starost samice ob prvi in zadnji kotitvi ter trajanje dobe med zaporednima kotitvama pri liniji FHI

	GENERACIJA				
	42	43	44	45	Povprečje
SPUK (dni)	80	88	80	83	84
SPK (dni)	101	109	101	107	107
SZK (dni)	185	174	198	167	178
DPK (dni)	47	68	81	61	65
DMK ₁ (dni)	49	52	49	40	47
DMK ₂ (dni)	33	36	48	35	46
DMK ₃ (dni)	36	32	46	/	35

SPUK – starost ob prvi uspešni kopulaciji; SPK – povprečna starost samice ob prvi kotitvi; SZK – povprečna starost samice ob zadnji kotitvi; DPK – doba od paritve in prve kotitve; DMK₁ – doba od prve do druge kotitve; DMK₂ – doba od druge in tretje kotitve; DMK₃ – doba od tretje in četrte kotitve

Doba med kotitvijo je bila v povprečju najkrajša med tretjo in četrto kotitvijo, najdaljša pa je bila med prvo in drugo kotitvijo. Med vsemi zaporednimi gnezdi se je naslednja kotitev od prejšnje pojavila kasneje za obdobje povprečne brejosti in več, torej od 19-26 dni. V tem primeru v povprečju ni prišlo do paritve v poporodnem estrusu.

4.1.2 Pregled odstavitvev

4.1.2.1 Linija FLI

Za posamezno generacijo smo opravili osnovno statistiko parametrov plodnosti po zaporednih gnezdih. Skupno število gnezdi je bilo 114 od tega je bilo 15 gnezdi (13,2 %) izločenih ali pa so mladiči poginili pred odstavitvijo. Ta gnezda smo upoštevali skupaj kot izločena gnezda. Od skupnega števila gnezdi je bilo 86,8 % gnezdi odstavljenih.

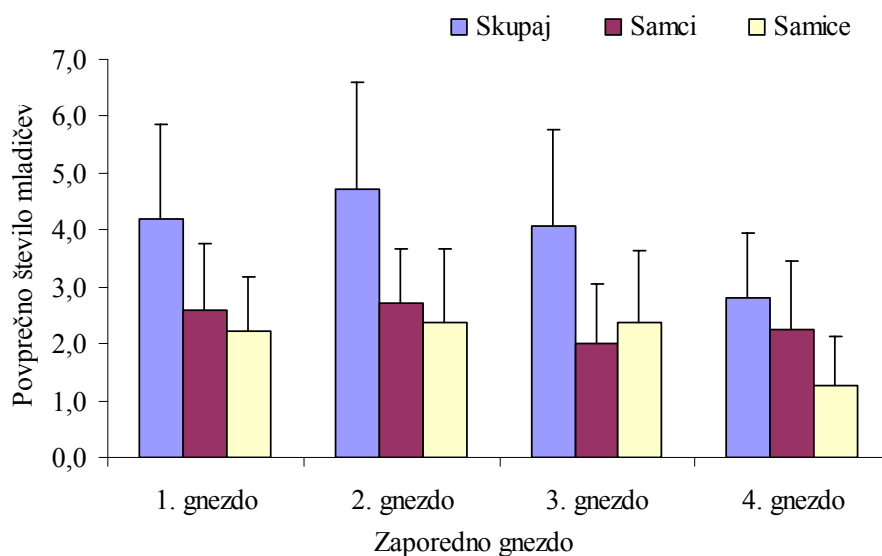
Preglednica 10: Osnovna statistika zaporednih gnezd za vsako generacijo pri liniji FLI

GEN	KOT	ŠT.GN.	ŠT.IZL.GN.	ŠT.ODST.GN.	ŠT.OM	ŠT.♀	ŠT.♂
43	K1	10	1	9	34	12	22
	K2	5	1	4	19	6	13
	K3	3	/	3	13	6	7
	K4	/	/	/	/	/	/
44	K1	14	3	11	64	31	33
	K2	5	1	4	21	7	14
	K3	2	/	2	7	4	3
	K4	1	/	1	4	1	3
45	K1	14	1	13	68	26	42
	K2	5	1	4	21	10	11
	K3	3	1	2	13	11	2
	K4	/	/	/	/	/	/
46	K1	25	3	22	89	48	41
	K2	16	1	15	76	41	35
	K3	7	1	6	24	10	14
	K4	4	1	3	10	4	6
Σ	K1-4	114	15	99	463	217	246

GEN – generacija; KOT – kotitev; ŠT.GN. – število vseh gnezd; ŠT.IZL.GN.– izločena gnezda; ŠT.ODST.GN. – število odstavljenih gnezd; ŠT.OM – število vseh odstavljenih mladičev; ŠT.♀ - število vseh odstavljenih samic; ŠT.♂ - število vseh odstavljenih samcev; K1 – podatki o prvi kotitvi; K2 – podatki o drugi kotitvi; K3 - podatki o tretji kotitvi; K4 – podatki o četrti kotitvi; Σ - skupaj

Skupno število odstavljenih mladičev v štirih generacijah je 463, od tega je 217 samic ali 46,9 % in 246 samcev ali 53,1 % (preglednica 10 in 14). Število gnezd se je z zaporedno kotitvijo v vsaki generaciji zmanjševalo, s tem pa tudi število odstavljenih mladičev. Največje število gnezd je bilo v generaciji 46 (41,2 %), prav tako je bilo največje tudi število odstavljenih mladičev. Najmanjše število gnezd in število odstavljenih mladičev je bilo v generaciji 43 (15,8 %).

Na sliki 7 so grafično prikazane vrednosti povprečnega števila odstavljenih mladičev na vsa gnezda v zaporednih kotitvah skupaj in po spolu.



Slika 7: Povprečno število odstavljenih mladičev na vsa gnezda v zaporednih kotitvah štirih generacij za linijo FLI

Razviden je vrh v drugem zaporednem gnezdu, to je 4,72 mladičev, število se je potem postopoma zmanjševalo (preglednica 13). Povprečno število odstavljenih samcev nima posebnega standarda naraščanja ali padanja, je pa bilo v tretjem zaporednem gnezdu najnižje. Povprečno število samic je naraščalo do tretjega gnezda, potem pa se je močno zmanjšalo. V zadnji kotitvi je razmerje med samci in samicami 1,13:1. To pomeni, da je v povprečju na gnezdo več odstavljenih samcev (preglednica 14).

4.1.2.2 Linija FHI

Osnovna statistika nekaterih parametrov plodnosti je zapisana v preglednici 11. Število odstavljenih mladičev in število gnezd se je z zaporedno generacijo povečalo. Skupno število gnezd v štirih generacijah je 93, od tega je 12,9 % gnezd izločenih in 87,1 % odstavljenih.

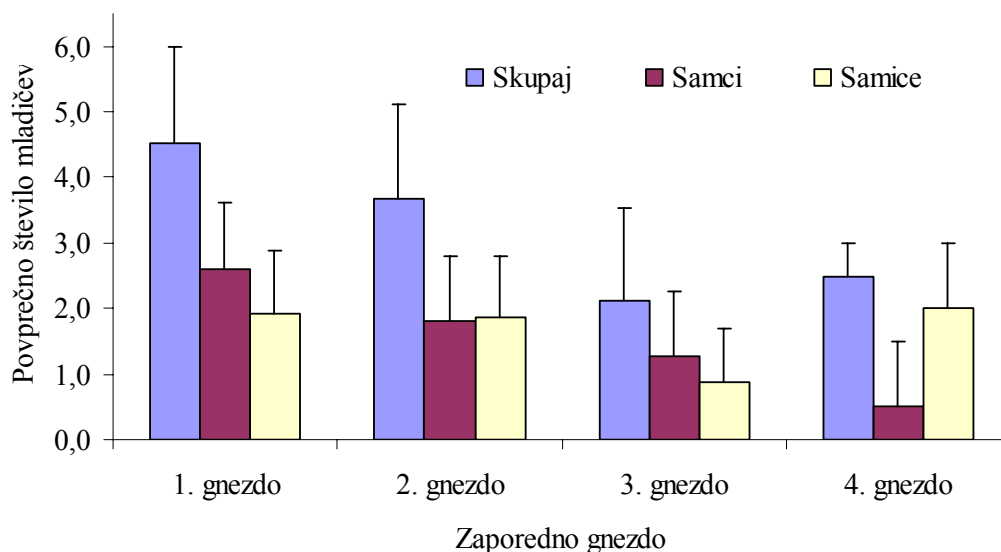
Preglednica 11: Osnovna statistika zaporednih gnezd za vsako generacijo pri liniji FHI

GEN.	KOT	ŠT.GN.	ŠT.IZL.GN.	ŠT.ODST.GN.	ŠT. OM	ŠT.♀	ŠT.♂
42	K1	9	1	8	34	11	23
	K2	8	/	8	35	22	13
	K3	3	1	2	6	2	4
	K4	2	/	2	5	4	1
43	K1	13	/	13	53	20	33
	K2	7	2	5	19	12	7
	K3	3	1	2	5	2	3
	K4	1	1	/	0	0	0
44	K1	10	1	9	53	25	28
	K2	10	1	9	38	16	22
	K3	7	3	4	13	3	10
	K4	/	/	/	/	/	/
45	K1	12	/	12	59	28	31
	K2	6	1	5	22	8	14
	K3	2	/	2	8	6	2
	K4	/	/	/	/	/	/
Σ	K1-4	93	12	81	350	159	191

GEN – generacija; KOT – kotitev; ŠT.GN. – število vseh gnezd; ŠT.IZL.GN.– izločena gnezda; ŠT.ODST.GN. – število odstavljenih gnezd; ŠT.OM – število vseh odstavljenih mladičev; ŠT.♀ - število vseh odstavljenih samic; ŠT.♂ - število vseh odstavljenih samcev; K1 – podatki o prvi kotitvi; K2 – podatki o drugi kotitvi; K3 - podatki o tretji kotitvi; K4 – podatki o četrti kotitvi; Σ - skupaj

Skupno število odstavljenih mladičev je 350, od tega je 159 ali 45,5 % samic in 191 ali 54,6 % samcev. Razmerje med samci in samicami je bilo 1,2:1, torej je bilo tudi pri liniji FHI v povprečju odstavljenih več samcev (preglednica 14). To smo preverili z testom χ^2 , vendar razlika ni bila statistično značilna. Skupno število gnezd se je z zaporedno kotitvijo v posameznih generacijah zmanjševalo in je skupaj obsegalo 93 gnezd. Največje število gnezd je bilo v generaciji 44 (29 %), najmanjše pa v generaciji 45 (21,5 %). Z zaporedno kotitvijo se je zmanjševalo tudi število odstavljenih mladičev.

Povprečno število odstavljenih mladičev na vsa gnezda skupaj in po spolu za linijo FHI je grafično prikazano na sliki 8. To število se je z zaporednim gnezdом zmanjševalo, v četrtem pa malo povečalo. V prvem zaporedem gnezdū znaša 4,52 mladičev, v četrtem zaporednem gnezdū pa 2,57 mladičev.



Slika 8: Povprečno število odstavljenih mladičev na vsa gnezda v zaporednih kotitvah štirih generacij za linijo FHI

Število odstavljenih samic z zaporednim gnezdом niha. Največ je bilo odstavljenih v četrtem gnezdо in sicer povprečno 2,0 samic na gnezdo, potem sledita prvo in drugo zaporedno gnezdo. Najmanj odstavljenih samic je bilo v tretjem gnezdо v povprečju 0,9 samic na gnezdo. Število samcev z zaporednim gnezdом pada. V prvem gnezdо je bilo 2,7 samcev na gnezdo, v četrtem pa 0,5 na gnezdo.

4.1.2.3 Primerjava linij FLI in FHI

V preglednici 12 je prikazana primerjava med linijama za odstotek kotitev, povprečno število odstavljenih mladičev na samico, v zaporednem gnezdо. Odstotek kotitev nam pove kako uspešne so bile paritve v posamezni kotitvi. Slednji se z zaporedno kotitvijo zmanjšuje in je pri liniji FHI v prvih zaporednih gnezdih višji kot pri liniji FLI. V povprečju ima v proučevani reproduktivni dobi samica linije FHI 2,02 gnezd in linija FLI 1,70 gnezd na samico.

Preglednica 12: Odstotek kotitev, povprečno število odstavljenih mladičev na samico skupaj in po spolu

	FHI					FLI				
	ŠT. GN.	%KOT	$\bar{X}_{OM}$	$\bar{X}_{\text{♀}}$	$\bar{X}_{\text{♂}}$	ŠT. GN.	%KOT	$\bar{X}_{OM}$	$\bar{X}_{\text{♀}}$	$\bar{X}_{\text{♂}}$
K1	44	95,65	4,32	1,82	2,50	63	94,03	3,81	1,75	2,06
K2	31	67,39	2,48	1,62	1,22	31	46,27	2,04	0,95	1,09
K3	15	32,61	0,69	0,28	0,41	15	22,39	0,85	0,46	0,39
K4	3	6,82	0,11	0,08	0,02	5	7,46	0,21	0,08	0,13
Σ	93	2,02*	7,61	4,71	5,34	114	1,70*	6,91	3,24	3,67

ŠT. GN. – število vseh gnezdi; %KOT - delež kotitev; $\bar{X}_{OM}$ - število odstavljenih mladičev po samici; $\bar{X}_{\text{♀}}$ - povprečno število odstavljenih samic po samici; $\bar{X}_{\text{♂}}$ - povprečno število odstavljenih samcev po samici; K1 – prvo gnezdo; K2 – drugo zaporedno gnezdo; K3 - tretje zaporedno gnezdo; K4 – četrto zaporedno gnezdo; Σ – skupno število; * - število gnezdi po samici

Odstotek kotitev se z zaporedno kotitvijo zmanjšuje, prav tako se zmanjšuje tudi povprečno število odstavljenih mladičev na samico. Teh je bilo za vsa zaporedna gnezda skupaj več pri liniji FHI in sicer 7,61 mladiča na samico, kot pri liniji FLI, kjer je bilo 6,91 mladiča na samico. Od 46 samic linije FHI ni imelo nobenega gnezda 4,34 % samic in pri liniji FLI 5,97 % od skupno 67 samic.

V preglednici 13 so prikazani podatki o številu odstavljenih mladičev na odstavljenem gnezdu in na vsa gnezda skupaj. Razlike so tako znotraj linije kot tudi med linijama

Preglednica 13: Primerjava povprečnega števila odstavljenih mladičev na zaporedno gnezdo za vsa gnezda in za odstavljen gnezda med linijama FLI in FHI

KOT	FHI			FLI		
	$\bar{X}_{ODST.GN. \pm SD}$	$\bar{X}_{\Sigma GN. \pm SD}$	%IGN	$\bar{X}_{ODST.GN. \pm SD}$	$\bar{X}_{\Sigma GN. \pm SD}$	%IGN
K1	4,74±2,00	4,52±2,10	4,76	4,63±1,91	4,18±2,36	12,7
K2	4,22±1,53	3,68±2,02	12,9	5,07±2,19	4,72±2,67	12,9
K3	3,20±1,48	2,13±1,96	33,3	4,83±2,18	4,07±2,40	13,3
K4	2,50±0,71	2,50±0,71	33,3	3,50±0,58	2,80±1,64	20,0
Σ1-4	4,32±1,78	3,82±2,19	12,9	4,72±2,03	4,21±2,45	13,2

KOT – zaporedna kotitev; K1 – prva kotitev; K2 – druga kotitev; K3 – tretja kotitev; K4 – četrta kotitev; SD – standardni odklon; $\bar{X}_{ODST.GN.}$ - povprečno število odstavljenih mladičev na odstavljenem gnezdu; $\bar{X}_{\Sigma GN.}$ - povprečno število odstavljenih mladičev na vsa gnezda; %IGN – odstotek izločenih gnezdi pred odstavitvijo

Povprečno število mladičev se je z zaporedno kotitvijo zmanjševalo. V prvem gnezdu je bilo povprečno število mladičev večje pri liniji FHI. Pri liniji FHI je bilo povprečno odstavljenih 4,74 mladičev na gnezdo v prvi kotitvi, pri liniji FLI pa 4,63 mladičev na gnezdo v K1, vendar ta razlika ni bila statistično značilna. V naslednjih zaporednih gnezdih je bilo pri liniji FLI povprečno število odstavljenih mladičev večje kot pri FHI. Povprečno

je bilo v vseh kotitvah odstavljenih 4,72 mladičev na odstavljeno gnezdo pri liniji FLI in 4,32 mladičev na odstavljeno gnezdo pri liniji FHI. Med povprečnim številom odstavljenih mladičev na rojeno in na odstavljeno gnezdo ni statistično značilnih razlik.

Primerjava med linijama v številu odstavljenih samcev in samic, ter njihovo razmerje, je prikazano v preglednici 14. Pri liniji FLI je bilo v primerjavi z linijo FHI vseh kotitvah večje število odstavljenih samic in samcev.

Preglednica 14: Primerjava razmerja med spoloma odstavljenih mladičev pri linijah FHI in FLI

	FHI					FLI				
KOT	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	ΣK ₁₋₄	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	ΣK ₁₋₄
ŠT. ♀	84	58	13	4	159	117	64	31	5	217
ŠT. ♂	115	56	19	1	191	138	73	26	9	146
% ♀	42,2	50,8	40,6	80	45,4	45,9	46,7	54,4	35,7	46,9
% ♂	57,8	49,1	59,4	20	54,6	54,1	53,3	45,6	64,3	53,1

KOT – zaporedna kotitev; ŠT. ♀ število samic; ŠT. ♂ - število samcev; % ♀-odstotek samic; % ♂-odstotek samcev; K₁ – prva kotitev; K₂ – druga kotitev; K₃ – tretja kotitev; K₄ – četrta kotitev

Razmerje med številom odstavljenih samcev in samic pri obeh linijah je podobno. V prvih treh kotitvah je bilo razmerje v prid samev, v četrti kotitvi pa je bil odstotek odstavljenih samic večji in je znašal 80 %. Pri liniji FHI se je skotilo skupaj 350 mladičev (preglednica 11), od tega 45,4 % samic in 54,6 % samcev (preglednica 14). Pri liniji FLI je bilo odstavljenih več mladičev in tudi pri tej liniji je razmerje med spoloma podobno, 46,9 % samic in 53,1 % samcev. To bi lahko podprlo trditve nekaterih raziskovalcev, da je razmerje med spoloma vedno v prid samcev (Rugh, 1990; Altman in Dittmer-Katz, 1979; Crispens, 1975).

4.2 POSKUS

4.2.1 Pregled paritev

V poskusu smo spremljali 38 paritev za linijo FHI in 40 paritev za linijo FLI. Začetno število paritev pomeni število paritev, ki smo jih nastavili za poskus. Uspešnih paritev je bilo pri liniji FHI 94,7 % in pri liniji FLI 90,0 %. Neuspešnih je bilo tako za linijo FHI 5,3 % paritev in za FLI 10,0 %.

Preglednica 15: Pregled paritev v poskusu za liniji FHI in FLI

	FHI		FLI	
	Število♀	Delež (%)	Število♀	Delež (%)
ZAČETNE PARITVE	38	100,0	40	100,0
USPEŠNE PARITVE	36	94,7	36	90,0
NEUSP. PARITVE	2	5,3	4	10,0
ENO GNEZDO	7	18,4	7	17,5
DVE GNEZDI	12	31,6	19	47,5
TRI GNEZDA	11	27,5	7	17,5
ŠTIRI GNEZDA	6	16,7	3	7,5
SKUPNO ŠT. GN.	88	/	78	/
GN / ♀	2,32	/	1,95	/

ZAČETNE PARTIVE – začetno število samic v poskusu; USPEŠNE PARITVE – število samic v poskusu, ki so imele vsaj eno gnezdo; NEUSP. PARITVE – število samic v neuspešnih paritvah, ki niso imele nobenega gnezda; ENO GNEZDO – število samic samo z enim gnezdrom DVE GNEZDI – število samic samo z dvema gnezdroma; TRI GNEZDA – število samic samo z tremi gnezdi; ŠTIRI GNEZDA – število samic samo z štirimi gnezdi; SKUPNO ŠT. GN. – skupno število gnezd; GN/♀ - število gnezd po samici

Delež samic, ki so kotile, od drugega gnezda naprej pada, torej je bilo največ samic z dvema gnezdrom in najmanj samic z štirimi gnezdi. V preglednici 15 lahko vidimo postopno od drugega zaporednega gnezda dalje zmanjševanje deleža samic, ki so kotile. To velja za obe liniji.

Povprečna SP (starost ob paritvi) samice, je bila pri FHI 61,8 dni, pri FLI pa 61,1 dni. Pri tem ni bilo statistično značilnih razlik med linijama (preglednica 16), kar je pričakovano, saj smo načrtno nastavili v paritve samice približno enake starosti pri obeh linijah zaradi kasnejše primerjave rezultatov.

Preglednica 16: Primerjava samic obeh linij v starosti in telesni masi ob paritvi in prvi uspešni kopulaciji

	FHI					FLI				
	n	$\bar{x}$	SD	MIN	MAX	n	$\bar{x}$	SD	MIN	MAX
SP (dni)	38	61,80 ^a	10,68	55	84	40	61,10 ^a	12,75	52	100
TP (g)	38	19,54 ^a	1,38	16,9	22,8	40	26,23 ^b	2,26	22,1	31,9
SPUK (dni)	37	68,44 ^a	10,56	56	91	39	70,29 ^a	16,89	56	110
TK (g)	37	20,46 ^a	1,51	16,8	23,7	39	26,71 ^b	2,36	21,1	32,2
SZK (dni)	38	136,0 ^a	34,3	78	203	38	124,6 ^b	36,6	75	210

SP – starost ob paritvi; TP – teža ob paritvi; SPUK – starost ob prvi uspešni kopulaciji; TK - teža ob kopulaciji; SZK – povprečna starost samice ob zadnji kotitvi; ^{aa} - ni statistično značilne razlike med linijama; ^{ab} - statistično značilna razlika med linijama

Povprečna telesna masa ob paritvi se med linijama statistično značilno razlikuje, pri FHI je bila 19,54 g, pri FLI pa 26,23 g. SPUK (starost ob prvi uspešni kopulaciji) smo določili kot starost ob pojavu prvega vaginalnega čepa, kateremu je sledila brejost. Samice linije FHI so bile ob prvi uspešni kopulaciji težke 20,46 g, samice linije FLI pa 26,71 g. Za linijo FHI je bila SPUK 68,44 dni, za linijo FLI pa 70,29 dni in ni bilo statistično značilnih razlik med linijama.

V preglednici 17 sledijo zapisane povprečne vrednosti trajanja dobe med kotitvama. DPK je doba med paritvijo in prvo kotitvijo in traja pri liniji FHI 25,9 dni, pri liniji FLI pa 23,5 dni. Med linijama so statistično značilne razlike v dolžini trajanja DPK. Statistično značilne razlike v dolžini trajanja so tudi pri DMK₂ in DMK₃ medtem, ko to ne velja za DMK₁ (preglednica 28).

Preglednica 17: Trajanje obdobj med kotitvami pri linijah FHI in FLI

	FHI				FLI			
	n	$\bar{x} \pm SD$	MIN	MAX	n	$\bar{x} \pm SD$	MIN	MAX
DPK	35	25,9 $\pm$ 4,4	19	38	38	23,5 $\pm$ 2,9	19	33
DMK ₁	29	39,7 $\pm$ 10,6	24	69	27	36,8 $\pm$ 10,7	20	58
DMK ₂	17	31,7 $\pm$ 9,1	23	48	10	44,1 $\pm$ 10,9	21	64
DMK ₃	4	29,8 $\pm$ 2,6	26	32	3	24,3 $\pm$ 0,58	24	25
$\bar{x}$ DMK	50	35,8 ^a $\pm$ 10,5	23	69	40	37,7 ^a $\pm$ 1,4	20	64

DPK – doba med paritvijo in prvo kotitvijo; DMK₁ – doba med prvo in drugo kotitvijo; DMK₂ – doba med drugo in tretjo kotitvijo; DMK₃ – doba med tretjo in četrto kotitvijo; $\bar{x}$ DMK – povprečna dolžina dobe med kotitvami; $\bar{x}$ – povprečna vrednost; SD – standardni odklon; MIN – minimalna vrednost; MAX – maksimalna vrednost; aa – ni statistično značilnih razlik med linijama

Po pregledu povprečne vrednosti za vse DMK skupaj se dolžini med linijama razlikujeta le za 1,9 dni in razlika ni statistično značilna. Pri tem ima linija FLI daljšo povprečno DMK kot linija FHI.

Povprečno dobo brejosti smo spremljali pri samicah od uspešne kopulacije, ki smo jo določili s pojavom vaginalnega čepa, do prve kotitve.

Preglednica 18: Povprečna doba brejosti za linijo FHI in FLI

	FHI				FLI			
	n	$\bar{x} \pm SD$	MIN	MAX	n	$\bar{x} \pm SD$	MIN	MAX
DB	29	20,17 ^a $\pm$ 1,07	18	24	36	20,03 ^a $\pm$ 1,18	18	23

DB – doba brejosti; $\bar{x} \pm SD$ – povprečna vrednost in standardni odklon; MIN – minimalna vrednost; MAX – maksimalna vrednost; aa – ni statistično značilnih razlik

Doba brejosti je bila v povprečju dolga pri liniji FHI 20,17 dni, pri liniji FLI pa 20,03 dni. Med linijama ni bilo statistično značilnih razlik (preglednica 28). Maksimalna dolžina brejosti je bila pri liniji FLI je 23 dni in pri liniji FHI 24 dni.

Po nastavitvi paritev smo spremljali uspešnost prvih kopulacij. Prva kopulacija pa ni pomenila vedno tudi uspešno oploditev. Temu primerno so sledili zaporedni ali ponovni vaginalni čepi. Ponovni vaginalni čep pomeni kasnejši nastop brejosti. Pogostost pojava ponovnega vaginalnega čepa smo razdelili na tri intervale (preglednica 19):

1. interval – čep se je pojavil 2-4 dni po prvem čepu
2. interval – čep se je pojavil 5-8 dni po prvem čepu
3. interval – čep se je pojavil čez več kot 8 dni po pojavu prvega čepa

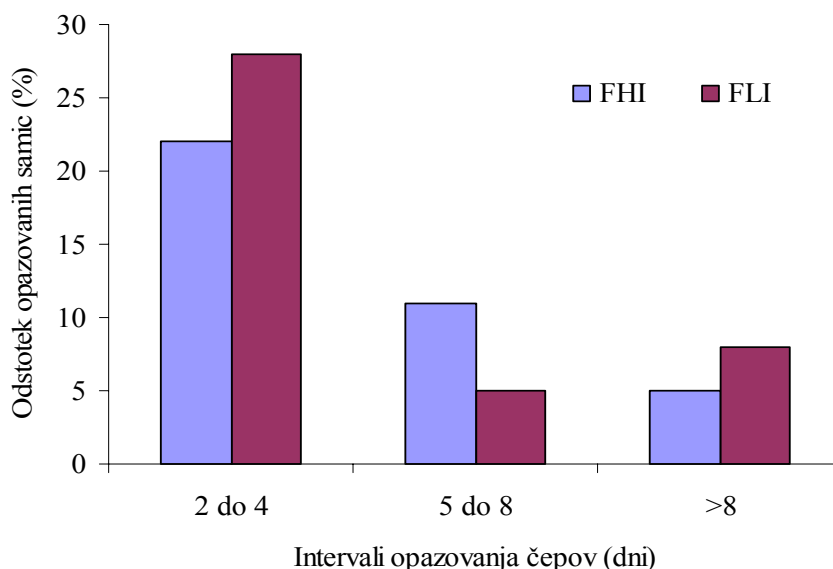
Zaporedni čep pomeni, da je prišlo do paritve takoj naslednji dan. Ponovni čep pa pomeni, da je prišlo do paritve 2 do 8 ali več dni po pojavu prvega čepa.

Preglednica 19: Primerjava intervalov pojava posameznega čepa med linijama

	FHI		FLI	
	ŠT. ♀	DELEŽ (%)	ŠT. ♀	DELEŽ (%)
NI PONOVRNIH ČEPOV	22	57,8	8	20,0
ZAPOREDNI ČEP	2	5,8	16	43,6
PONOVNI ČEP	14	41,2	16	38,5
1. Interval (2-4 dni)	8	23,5	11	28,2
2. Interval (5-8 dni)	4	11,8	2	5,1
3. Interval (> 8 dni)	2	5,8	3	7,7

ŠT. ♀ - število samic; DELEŽ (%) – delež samic

Pogostost pojava ponovnega vaginalnega čepa je bilo pri obeh linijah podobno, torej za linijo FHI 41,2 % in za FLI 38,5 %. Zaporedni čep pa je bil bolj značilen za linijo FLI in se je pojavil pri kar 43,5 % primerov. Za linijo FHI je bil ta odstotek precej manjši in je znašal 5,8 %. V prvem intervalu pojava ponovnega čepa se je nahajalo 23,5 % FHI in 28,2 % FLI samic, v drugem intervalu 11,8 % FHI in le 5,1 % FLI samic. Ti podatki so grafično prikazani na sliki 9.



Slika 9: Odstotek opazovanih samic v posameznih intervalih pojava ponovnega čepa

Odstotek opazovanih samic s prisotnim ponovnim vaginalnim čepom v intervalu 2 do 4 dni je večji pri liniji FLI. Le ta pa je zopet večji od samic iz linije FHI v intervalu >8 dni. Odstotek opazovanih samic pri liniji FHI se s posameznim intervalom opazovanja zmanjšuje.

4.2.2 Rojeni mladiči

Število rojenih mladičev (RM) je skupno število živorojenih in mrtvorojenih mladičev. V preglednici 20 so zapisane vrednosti o povprečnem številu rojenih, živorojenih in mrtvorojenih mladičev na odstavljeno gnezdo. Povprečno število ŽM (živorojenih mladičev) je bilo pri liniji FHI v prvem ZG (zaporednem gnezdu) večje kot pri FLI in je znašalo 4,1 mladiča na gnezdo. Število mladičev se je potem zmanjšalo in v četrtem gnezdu zopet povečalo, na 4,2 mladiča. Pri liniji FLI je bilo v povprečju največ RM v drugem ZG in hkrati tudi največ v primerjavi z obema linijama, ter je znašalo povprečno 5,5 mladičev. Od tega je 5,1 ŽM, katerih število se potem v naslednjih ZG počasi zmanjšuje. Minimalno število RM in ŽM je pri obeh linijah 1, maksimalno število RM je pri liniji FLI 10 od tega 9 ŽM, pri liniji FHI pa 11 RM od tega je 8 ŽM. Maksimalno število MM je pri liniji FHI v tretjem ZG, pri liniji FLI pa v četrtem ZG.

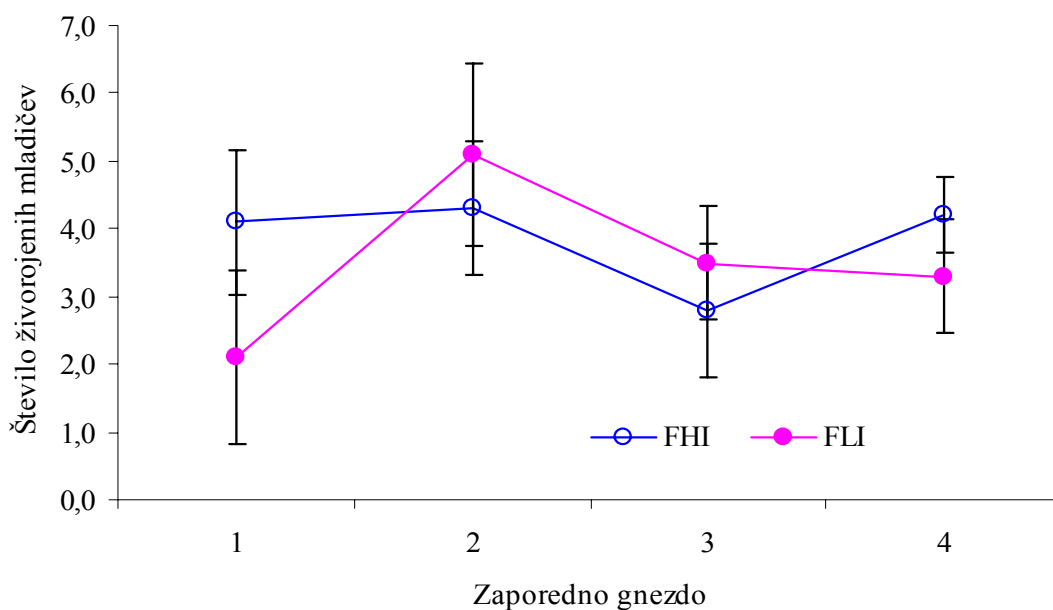
Preglednica 20: Primerjava povprečnega števila rojenih, živorojenih in mrtvorjenih mladičev na rojeno gnezdo skupaj in po zaporednih gnezdih med linijama FLI in FHI

	ZG.	FHI					FLI				
		n	GN	$\bar{x} \pm SD$	MIN	MAX	n	GN	$\bar{x} \pm SD$	MIN	MAX
RM	1	162	36	4,5±2,3	2	9	102	36	2,8±2,4	1	8
ŽM		149		4,1±2,1	2	8	75		2,1±2,5	1	8
MM		13		0,4±0,6	1	2	27		0,8±2,1	1	4
RM	2	137	29	4,7±2,2	1	11	159	29	5,5±2,6	1	10
ŽM		124		4,3±2,0	1	8	148		5,1±2,7	1	9
MM		13		0,4±0,7	1	3	11		0,4±0,8	1	3
RM	3	64	17	3,7±2,3	2	8	40	10	4,0±2,1	2	7
ŽM		48		2,8±2,0	1	6	35		3,5±1,7	2	6
MM		16		0,9±1,2	1	4	5		0,5±1,3	1	4
RM	4	27	6	4,5±1,9	3	8	13	3	4,3±1,5	3	6
ŽM		25		4,2±1,2	3	4	10		3,3±3,1	1	6
MM		2		0,3±0,8	1	2	3		1,0±1,7	1	3
ΣRM	1-4	390	88	4,4±2,3	1	11	314	78	4,1±2,7	1	10
ΣŽM	1-4	346		3,9±2,1	1	8	268		3,5±2,8	1	9
ΣMM	1-4	44		0,5±0,8	1	4	46		0,6±1,1	1	4

ZG. – zaporedno gnezdo; n – število opazovanj; GN – število vseh gnezd; RM – število rojenih mladičev; ŽM – število živorojenih mladičev; MM – število mrtvorjenih mladičev; $\bar{x} \pm SD$ – povprečno število na odstavljena gnezda in standardni odklon; MIN – minimalna vredost; MAX – maksimalna vrednost

Med linijama se število živorojenih in mrtvorjenih mladičev ni statistično značilno razlikovalo. Statistično značilne razlike v številu ŽM in MM so bile med zaporednimi gnezdami znotraj vsake linije in tudi med zaporednimi gnezdami med linijama (preglednica 27).

Povprečne vrednosti živorojenih mladičev na gnezdo so prikazane tudi grafično (slika 10). Število ŽM se je pri liniji FHI z zaporednim gnezdami zmanjševalo. Pri liniji FLI pa je število ŽM do drugega gnezda povečalo in potem zmanjšalo na približno enako vrednost kot je bila pri FHI.



Slika 10: Povprečno število živorojenih mladičev v zaporednem gnezdu za liniji FHI in FLI

V prvem gnezdu je bilo pri liniji FLI povprečno 2,1 ŽM, pri liniji FHI pa 4,1 ŽM na gnezdo. Nato je v drugem gnezdu pri liniji FLI število močno naraslo, na povprečno 5,1 ŽM na gnezdo in je bilo višje kot pri liniji FHI, kjer je bilo v povprečju 4,3 ŽM na gnezdo. Pri liniji FHI je v četrtem ZG število ŽM naraslo za 0,4 mladiča in je bilo v povprečju 4,2 ŽM.

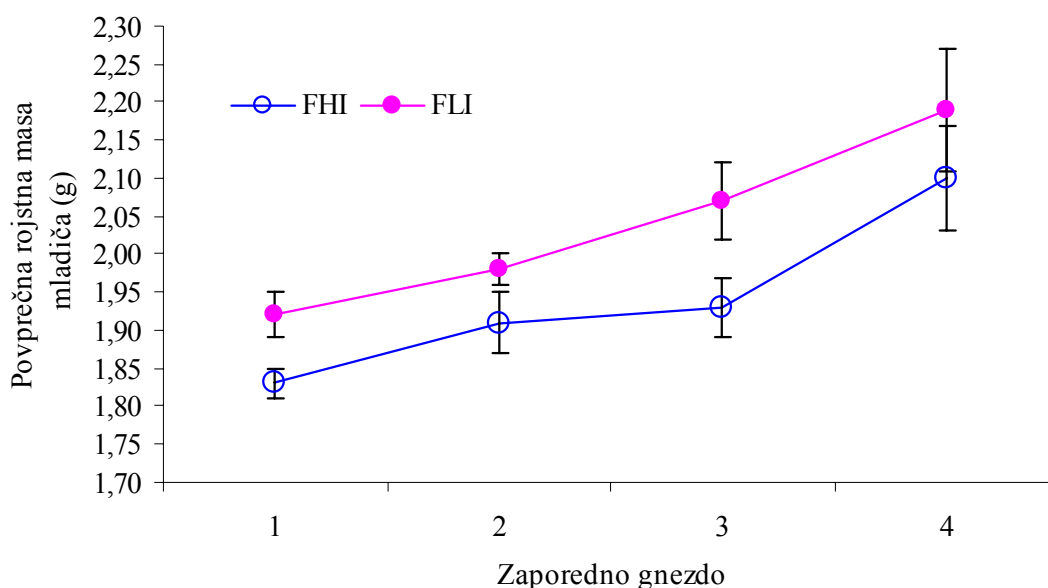
Preglednica 21 prikazuje podatke o masi gnezda (mG) živorojenih mladičev in o izračunani povprečni masi posameznega živorojenega mladiča (mM). Povprečna mG je pri obeh linijah do druge zaporedne kotitve naraščala, potem pa postopoma padala.. Pri liniji FHI je bila povprečna mG v drugi zaporedni kotitvi 10,2 g in pri liniji FLI 11,9 g, V drugem zaporednem gnezdu je bilo pri liniji FLI tudi najtežje gnezdo, z maso 17,3 g

Preglednica 21: Povprečna masa gnezda živorojenih mladičev in masa posameznega živorojenega mladiča v zaporednih gnezdih

	ZG	FHI					FLI				
		n	$\bar{x}$	SD	MIN	MAX	n	$\bar{x}$	SD	MIN	MAX
mG	1	32	8,61	2,80	3,6	15,1	21	6,93	4,39	1,5	14,8
mM		149	1,83	0,19	1,4	2,5	74	1,92	0,25	1,5	2,4
mG	2	6	10,17	3,81	3,2	14,3	13	11,98	3,26	6,6	17,3
mM		31	1,91	0,25	1,8	2,5	88	1,98	0,26	1,6	2,4
mG	3	11	7,60	2,94	2,0	12,5	5	7,80	2,65	4,1	10,8
mM		42	1,93	0,35	1,0	2,8	19	2,07	0,11	1,9	2,2
mG	4	3	7,63	1,56	6,2	9,3	2	10,95	3,04	8,8	13,1
mM		11	2,10	0,19	1,9	2,3	9	2,19	0,01	2,2	2,2
Σ mG	1-4	52	8,52	2,93	2,0	15,1	41	8,83	4,38	1,5	17,3
Σ mM	1-4	275	1,87	0,24	1,0	2,8	190	1,94	0,24	1,5	2,4

ZG - zaporedno gnezdo; n – število opazovanj; $\bar{x}$ – povprečna vrednost; SD- standardni odklon; MIN – minimalna vrednost; MAX – maksimalna vrednost mG – masa gnezda (živorojenih mladičev); mM – masa živorojenega mladiča

Masa gnezda se med linijama statistično ne razlikuje, so pa statistično značilne razlike med zaporednimi gnezdami, kjer se je masa povečala in zmanjšala. Masa mladiča se v povprečju razlikuje med linijama in je pri liniji FLI večja za 0,31 g. Razlike med zaporednimi gnezdami so tudi visoko statistično značilne. Medtem pa razlike med linijama in med zaporednimi gnezdami niso statistično značilne. Masa mladiča je z zaporednim gnezdami naraščala in je bil pri liniji FLI od linije FHI večja približno za 0,1 g. To je razvidno tudi iz slike 12.



Slika 12: Povprečna rojstna masa mladiča v zaporednem gnezdu

Povprečna rojstna masa mladiča (RmM) z zaporednim gnezdom narašča. V prvem gnezdu je bila pri liniji FLI povprečna RmM 1,92 g in pri liniji FHI 1,83 g. V četrtem zaporednem gnezdu je bila povprečna RmM pri liniji FLI 2,19 g in pri liniji FHI 2,10 g.

Povprečna rojstna masa je v negativni korelaciji z velikostjo gnezda, kar pomeni, da se s povečevanjem števila živorojenih mladičev v gnezdu, zmanjšuje njihova rojstna masa (model 3). Vpliv števila živorojenih mladičev na rojstno maso mladiča je statistično značilen ($p < 0,0001$), z modelom pa je bilo pojasnjene 11 % variabilnosti.

4.2.3 Odstavljeni mladiči

V času od rojstva do odstavitve lahko pride tudi do izgube posameznih mladičev oz. pogina v času postnatalnega razvoja. Te vrednosti in tudi povprečno število OM (odstavljenih mladičev) so prikazane v preglednici 22. Izgube mladičev so bile bolj značilne za linijo FLI in je bilo skupno maksimalno 9 izgubljenih mladičev, med tem pa so bili pri liniji FHI izgubljeni le štirje mladiči. Največje povprečno število OM je bilo pri liniji FHI v prvem gnezdu in je znašalo 4,1 mladičev, pri liniji FLI pa je bilo največje število OM v drugem zaporednem gnezdu in je znašalo 5,1 mladičev na gnezdo.

Preglednica 22: Povprečno število odstavljenih mladičev in izgube mladičev od rojstva do odstavitve na rojeno gnezdo za liniji FHI in FLI

	ZG	FHI					FLI				
		n	GN	$\bar{x} \pm SD$	MIN	MAX	n	GN	$\bar{x} \pm SD$	MIN	MAX
OM	1	147	36	4,1 $\pm$ 2,1	2	8	67	36	1,9 $\pm$ 2,6	1	8
IM		2		0,1 $\pm$ 0,3	1	1	8		0,2 $\pm$ 0,6	1	3
OM	2	118	29	4,1 $\pm$ 1,9	1	8	148	29	5,1 $\pm$ 2,7	1	9
IM		6		0,2 $\pm$ 0,4	1	1	/		/	/	/
OM	3	45	17	2,6 $\pm$ 2,0	2	6	28	10	2,8 $\pm$ 2,1	3	6
IM		3		0,2 $\pm$ 0,6	1	2	7		0,7 $\pm$ 1,6	1	5
OM	4	24	6	4,0 $\pm$ 1,4	2	4	9	3	3,0 $\pm$ 3,0	3	6
IM		1		0,2 $\pm$ 0,4	1	1	1		0,3 $\pm$ 0,6	1	1
Σ OM	1-4	334	88	3,8 $\pm$ 2,1	1	8	252	78	3,2 $\pm$ 2,9	1	9
Σ IM	1-4	12		0,1 $\pm$ 0,4	1	2	16		0,2 $\pm$ 0,2	1	5

ZG – zaporedno gnezdo; n – število opazovanj; GN – število vseh rojenih gnezd; OM – število odstavljenih mladičev; IM – število izgubljenih mladičev; $\bar{x}$ – povprečno število odstavljenih mladičev na rojeno gnezdo; SD – standardni odklon; MIN – minimalna vrednost; MAX – maksimalna vrednost; Σ OM – skupno število odstavljenih mladičev; Σ IM – skupno število izgubljenih mladičev

Znotraj linije med zaporednimi gnezdi so bile statistično značilne razlike za število OM. Le to se je pri liniji FHI z zaporednim gnezdom zmanjševalo. Pri liniji FLI se je povprečno število OM do drugega gnezda povečalo, potem padlo in zopet v četrtem gnezdu povečalo za 0,5 mladiča. Grafični prikaz teh podatkov je na sliki 13. V povprečju je pri liniji FHI število OM večje kot pri liniji FLI, vendar pa med linijama ni statistično značilnih razlik. Izgube so bile pri liniji FHI manjše kot pri FLI in to za kar 0,08 mladiča ali 3,2 %.

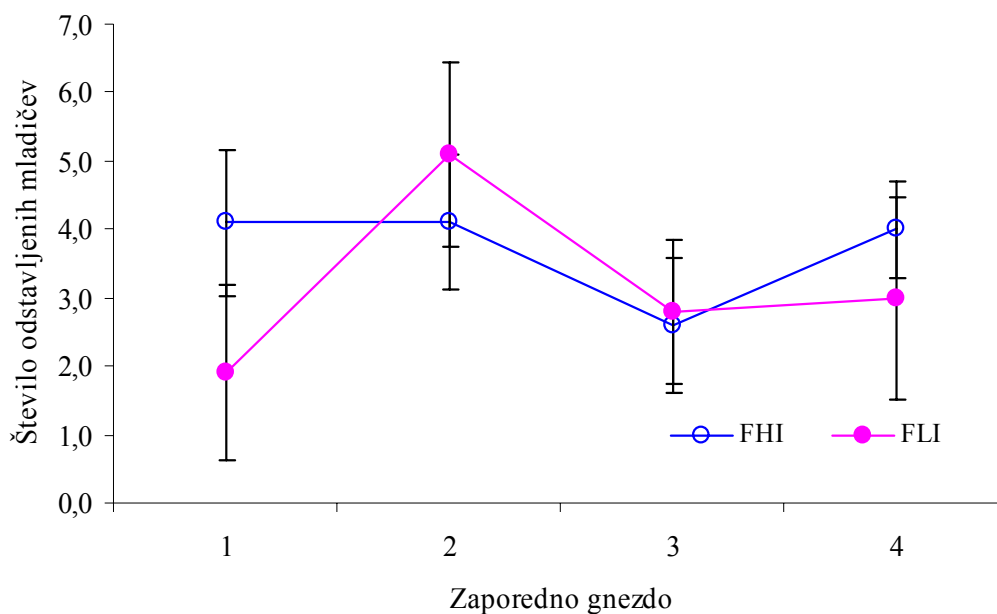
V preglednici 23 so prikazani odstotki mrtvorojenih in izgubljenih mladičev skupaj in po zaporednih gnezdih.

Preglednica 23: Odstotek mrtvorojenih mladičev od vseh rojenih in odstotek izgub od rojstva do odstavitve pri liniji FHI in FLI

ZG	FHI		FLI	
	% MM od RM	% IM	% MM od RM	%IM
1	7,9	1,36	26,5	11,94
2	9,5	5,08	6,9	/
3	25,0	6,67	12,5	25,00
4	7,4	10,00	23,1	11,11
1-4	11,3	3,95	14,6	6,35

ZG – zaporedno gnezdo % MM od RM – odstotek mrtvorojenih mladičev od vseh rojenih mladičev; % IM – odstotek izgubljenih mladičev od rojstva do odstavitve

Odstotek MM je bil precej vsji kot odstotek IM, kar velja za obe liniji. Z zaporednimi gnezdi je pri liniji FHI odstotek MM naraščal do tretjega gnezda (25,0 %) in se potem zmanjšal na odstotek prve kotitve, približno 7 %. Med tem pri liniji FLI ni bilo nekega trenda naraščanja ali padanja odstotka MM. Ta je bil največji v prvem gnezdu in je znašal 26,5 %, najmanjši, 6,9 %, pa je bil v drugem gnezdu. Odstotek izgubljenih mladičev se je pri liniji FHI povečeval do četrtega gnezda in znašal 10,0 %, pri liniji FLI pa se je povečeval do trejega gnezda in znašal 25,0 %, potem pa se je odstotek zmanjšal in je bil približno enak kot v prvi kotitvi (11 %). V drugi kotitvi pri liniji FLI ni bilo izgub mladičev.



Slika 13: Povprečno število odstavljenih mladičev v zaporednem gnezdu za linijo FHI in FLI

Povprečno število OM / odstavljeno gnezdo (slika 13) se, v primerjavi z številom ŽM (slika 11) pri obeh linijah, ne razlikuje bistveno. Kljub temu je pri liniji FLI povprečno število OM večje, kot pri liniji FHI. Povprečno število OM pri linij FHI z ZG pada v povprečju za 0,5 mladiča, med tem pa pri liniji FLI do tretjega gnezda število pade na 4,0 in v četrtem ZG zopet naraste na 4,5 OM.

4.2.4 Tehtanje odstavljenih mladičev

Ob odstavitvi smo vsakega mladiča posebej tehtali in ti rezultati so prikazani v preglednici 24. Povprečne vrednosti se znotraj spola in med spoloma po zaporednih gnezdih niso bistveno razlikovale. Razlika v odstavitveni masi pa je bila med linijama visoko statistično značilna. Maksimalna odstavitvena masa pri liniji FHI je bila za samca 13,3 g in samico 13,8 g. Pri liniji FLI je bila maksimalna masa za samca 17,1 g in samico 14,5 g. V povprečju so v vseh zaporednih gnezdih samice pri liniji FLI težje, kot samice pri liniji FHI. Izjema je četrto zaporedno gnezdo, kjer je bila povprečna masa samice manjša pri liniji FLI. Povprečna masa samcev je bila v vseh zaporednih gnezdih pri liniji FLI večja, kot pri liniji FHI.

Preglednica 24: Masa odstavljenega mladiča po spolu skupaj in po zaporednem gnezdju pri liniji FLI in FHI

ZG	S	FHI					FLI				
		n	$\bar{x}$	SD	MIN	MAX	n	$\bar{x}$	SD	MIN	MAX
1	♂	85	9,10	1,12	5,5	11,9	40	11,27	2,07	6,0	15,5
	♀	62	9,33	1,37	6,1	13,2	27	10,37	2,44	5,1	13,7
2	♂	56	9,30	1,70	5,1	13,3	68	10,48	1,82	6,8	15,8
	♀	62	9,95	1,64	6,4	13,8	80	10,38	2,21	6,7	14,5
3	♂	17	9,82	1,91	8,6	12,0	18	11,81	2,54	7,3	17,1
	♀	28	9,72	1,09	6,1	11,3	10	10,73	1,47	8,5	13,0
4	♂	14	8,42	1,13	6,5	10,1	3	10,40	3,02	7,6	13,8
	♀	10	8,23	0,93	6,9	9,3	6	6,50	0,17	6,3	6,6
Σ_{1-4}	♂	172	9,19	1,56	5,1	13,3	129	10,47	2,34	6,0	15,8
	♀	162	9,52	1,61	6,1	13,8	123	10,76	1,99	5,1	14,5

ZG. – zaporedno gnezdo (1-4); S - spol; n – število opazovanj; $\bar{x}$ – povprečna vrednost; SD – standardni odklon; MIN – minimalna vrednost; MAX – maksimalna vrednost; ♂ - samec; ♀ - samica; Σ_{1-4} – vsi odstavljeni mladiči po spolu

V preglednici 25 so prikazane povprečne mase mladiča v zaporednem gnezdju. V povprečju je mladič linije FLI težji od mladiča FHI linije za 1,27 g. Ta razlika je tudi visoko statistično značilna.

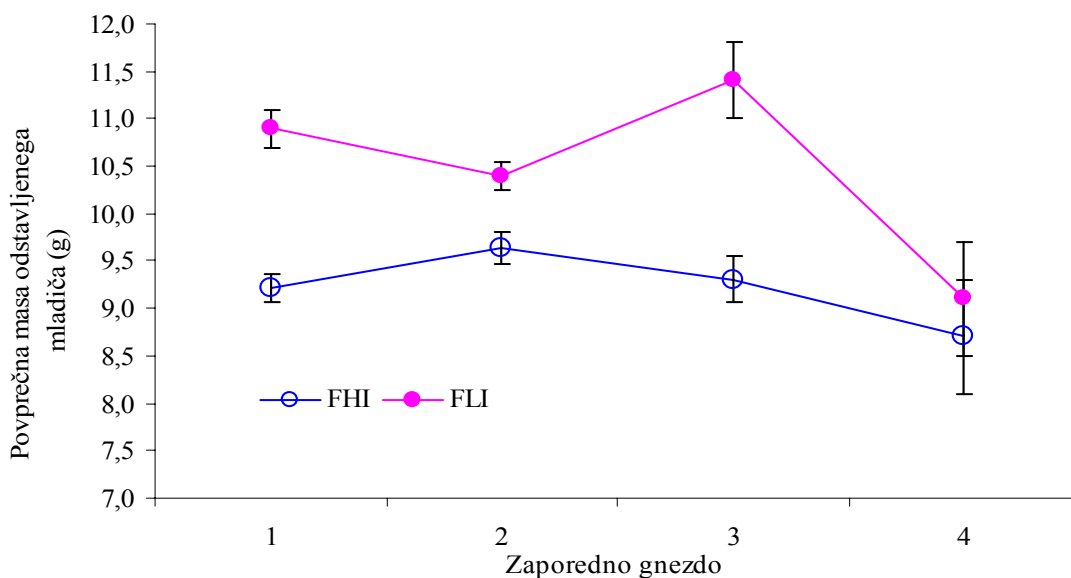
Preglednica 25: Masa odstavljenega mladiča skupaj in po zaporednem gnezdu pri liniji FHI in FLI

ZG	FHI					FLI				
	n	$\bar{x}$	SD	MIN	MAX		$\bar{x}$	SD	MIN	MAX
K1	147	9,2	1,2	5,5	13,2	67	10,9	2,3	5,1	15,5
K2	118	9,6	1,7	5,1	13,8	148	10,4	2,0	6,7	15,8
K3	45	9,3	1,6	1,6	11,4	28	11,4	2,2	7,3	17,1
K4	24	8,7	1,5	6,5	12,0	9	9,1	3,1	6,3	13,8
Σ_{1-4}	334	9,35	1,49	5,1	13,8	252	10,62	2,17	5,1	17,1

ZG – zaporedna kotitev; K1 – prva kotitev; K2 – druga kotitev; K3 – tretja kotitev; K4 – četrta kotitev $\bar{x}$ – povprečna vrednost; SD – standardni odklon; MIN – minimalna vrednost; MAX – maksimalna vrednost

Maksimalna masa mladiča je bila pri liniji FHI v drugem zaporednem gnezdu, pri liniji FLI pa je bila maksimalna vrednost mase mladiča v tretjem zaporednem gnezdu. Minimalna vrednost mase mladiča je bila tako pri FHI kot tudi pri FLI 5,1 g.

Razlike v masi mladičev znotraj linije so bile med zaporednimi gnezdi statistično značilne, prav tako tudi razlike med zaporednimi gnezdi in med linijami.



Slika 14: Povprečna masa odstavljenega mladiča v zaporednem gnezdu

Povprečna masa OM pri liniji FHI do drugega ZG narašča, potem pa postopno pada. Med linijama so razlike med masami OM statistično značilne, kar je lepo razvidno iz slike 14. Masa OM v prvem gnezdu pri FLI je 10,9 g, pri FHI pa 9,2 g, v četrtem gnezdu pa pri FLI

9,1 g in pri FHI 8,7 g. Večje kot je število odstavljenih mladičev manjša je odstavitvena masa mladiča (preglednica 25).

4.2.5 Primerjava linije FHI in FLI

Odstotek kotitev pomeni kakšna je oploditvena sposobnost samic oz. kako uspešne so paritve. V preglednici 6 so prikazane vrednosti odstotek kotitev v posameznih zaporednih gnezdih. Plodnost se je z zaporednimi kotitvami zmanjševala. Pri liniji FHI je bil odstotek prvih kotitev višji kot pri liniji FLI in znaša 94,7 %. Pri liniji FLI je bil odstotek prvih kotitev 90,0 %.

Preglednica 26: Delež kotitev, povprečno število odstavljenih mladičev (skupaj in po spolu) na samico in skupno število gnezd na samico

	FHI					FLI				
	ŠT. GN	% <i>KOT</i>	$\bar{X}_{OM}$	$\bar{X}_{\text{♀}}$	$\bar{X}_{\text{♂}}$	ŠT. GN	% <i>KOT</i>	$\bar{X}_{OM}$	$\bar{X}_{\text{♀}}$	$\bar{X}_{\text{♂}}$
K1	36	94,74	3,86	1,62	2,24	36	90,0	1,68	0,68	1
K2	29	76,32	3,10	1,63	1,47	29	72,5	3,70	2,00	1,70
K3	17	44,73	1,18	0,73	0,45	10	25,0	0,70	0,45	0,25
K4	6	15,79	0,63	0,26	0,37	3	7,50	0,23	0,15	0,08
Σ	88	2,32*	8,78	4,26	4,53	78	2,03*	6,30	3,23	3,07

%*KOT* - delež kotitev; $\bar{X}_{OM}$ - število odstavljenih mladičev po samici; *- skupno število gnezd po samici; K1 – prvo gnezdo; K2 – drugo zaporedno gnezdo; K3 - tretje zaporedno gnezdo; K4 – četrto zaporedno gnezdo; Σ – skupno število

Število odstavljenih mladičev na samico je pri liniji FLI do drugega zaporednega gnezda naraščalo, potem pa se je z nadaljnjimi kotitvami zmanjševalo. Za vse kotive skupaj je pri liniji FHI odstavljenih 8,78 mladičev na samico, kar je za približno dva mladiča več kot pri liniji FLI.

4.2.6 Rezultati statistične obdelave modelov

Po pregledu posameznih lastnosti v modelu smo med posameznimi vplivi dobili statistično značilne razlike (preglednica 27).

Preglednica 27: Vpliv linije, zaporednega gnezda in interakcije med njima na posamezne opazovane lastnosti

Lastnost	L	G	LG	R^2
ŽM	NS (p=0,2749)	* (p=0,0183)	** (p=0,0007)	0,17
MM	NS (p=0,3660)	NS (p=0,2400)	* (p=0,0469)	0,09
OM	NS (p=0,4065)	** (p=0,0061)	** (p=0,0002)	0,20
mG	NS (p=0,3693)	* (p=0,0067)	NS (p=0,1664)	0,21
mM	* (p=0,0120)	*** (p<0,0001)	NS (p=0,4549)	0,10
mOM	*** (p<0,0001)	* (p=0,0083)	** (p=0,0060)	0,14

*** - visoko statistično značilno (p<0,0001); ** - statistično značilno (p<0,001); * - statistično značilno (p<0,05); NS – ni statistično značilno; L- linija; G – zaporedno gnezdo; LG – interakcija med linijo in zaporednim gnezdrom; ŽM –živorojeni mladiči; MM – mrtvorojeni mladiči; OM – odstavljeni mladiči; mG – masa gnezda (živorjenih mladičev); mM – masa živorojenega mladiča; mOM – masa odstavljenega mladiča;

Med linijama so statistično značilne razlike samo za dve lastnosti: maso rojenega mladiča (mM) in za maso odstavljenega mladiča (mOM), le te pa so visoko statistično značilne. Vpliv zaporednega gnezda za število MM ni bil statistično značilen oz. med zaporednimi gnezdi številu MM ni bilo statistično značilnih razlik. Za lastnost masa rojenega mladiča (mM) so med zaporednimi gnezdi visoko statistično značilne razlike. Prav tako so statistično značilne razlike med zaporednimi gnezdi prisotne pri lastnostih: živorojeni mladiči, odstavljeni mladiči, masa rojenega gnezda in masa odstavljenega mladiča. Testiranje intrakcije med vplivoma linija in zaporedno gnezdo v modelu, je pokazala statistično značilne razlike pri številu ŽM, MM, OM in mOM. Za interakcijo pri lastnostih masa gnezda (mG) in masa rojenega mladiča (mM) ni bilo statistično značilnih razlik.

Preglednica 28: p-vrednosti za vpliv linije na določene lastnosti

Lastnost	p - vrednost	R ²
DB	0,6112	0,004
DPK	**0,0071	0,098
DMK1	0,3251	0,018
DMK2	**0,0040	0,287
DMK3	*0,0187	0,701
DMK	0,5050	0,005
TP	***<0,0001	0,764
SP	0,7108	0,001
SPUK	0,5253	0,005
TK	***<0,0001	0,720

*** - visoko statistično značilno ($p < 0,0001$); ** - statistično značilno ($p < 0,001$); * - statistično značilno ($p < 0,05$); DB – doba brejosti; DPK – doba od paritve do prve kotitve; DMK – povprečna doba med kotitvama; TP – paritvena telesna masa samice; SP – starost ob paritvi; SPUK – starost samice ob prvi kopulaciji; TK – teža ob kopulaciji

V modelu 2 smo testirali vpliv linije na določene lastnosti, katerih rezultati so prikazani v preglednici 28. Med linijama ni statistično značilnih razlik v trajanju DB, dolžini DMK₁, dolžini povprečne DMK, SPUK (starost ob prvi uspešni kopulaciji) in SP (starost ob paritvi).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V raziskavi, ki smo jo opravili za pripravo diplomske naloge, smo na dva načina opravili analizo pomembnejših parametrov plodnosti pri laboratorijskih linijah miši FLI in FHI. Analizirali smo podatke, zbrane iz štirih zaporednih generacij v reji obeh linij v koloniji na Oddelku za zootehniko in opravili poskus z monogamnim parjenjem parov obeh linij. Preverili smo, kakšna je učinkovitost razmnoževanja miši pri paritvah po v koloniji uporabljenih postopkih z učinkovitostjo kontroliranega monogamnega parjenja in hipotezo, po kateri naj bi bile med linijama FLI (fat) in FHI (lean) razlike v plodnosti samic statistično značilne.

5.1.1 Primerjava evidenčnih podatkov o plodnosti linije FHI in FLI

V Preglednici 29 so predstavljeni osnovni in za primerjavo med linijama zanimivi podatki o plodnosti miši, pridobljeni iz evidence v koloniji in podatki pridobljeni v poskusu.

Preglednica 29: Primerjava podatkov o lastnostih plodnosti med linijama FLI in FHI pridobljenih z analizo in v poskusu

LASTNOST	ANALIZA		POSKUS	
	FLI - fat	FHI - lean	FLI - fat	FHI - lean
SPUK (dni)	86	84	70 ^a	68 ^a
SPK (dni)	108	105	90	88
SZK (dni)	140	178	125	136
OBDODBE MED PARITVIJO IN KOTITVIJO	59	65	24 ^a	26 ^b
DMK1	34	47	37 ^a	40 ^a
DMK2	40	46	44 ^a	32 ^b
DMK3	42	35	24 ^a	30 ^b
ŠTEVILO GNEZD NA SAMICO	1,70	2,02	1,95	2,31
ŠTEVILO OM NA PARITEV	6,91	7,61	6,30	8,78
ŠTEVILO OM NA SAMICO	4,10	3,76	3,23	3,80
ŠTEVILO OM NA GNEZDO	4,72	4,32	3,76 ^a	4,12 ^a
DELEŽ ♀ BREZ GNEZDA PO PARITVI (%)	6,0	4,3	10,0	5,3
DELEŽ ♀ - LE ENO GNEZDO PO PARITVI (%)	47,8	28,3	17,5	18,4
DELEŽ ♀ - DVE GNEZDI PO PARITVI (%)	23,9	34,8	47,5	31,6
DELEŽ ♀ - TRI GNEZDA PO PARITVI (%)	14,9	26,1	17,5	28,9
DELEŽ ♀ - ŠTIRI GNEZDA PO PARITVI (%)	7,4	6,5	7,5	15,8
ŠT. OM NA ŠT. KOTITEV V PRVEM GN.	3,81	4,32	2,40 ^a	4,70 ^b
ŠT. OM NA ŠT. KOTITEV V DRUGEM GN.	2,04	2,48	5,30 ^a	4,10 ^b
ŠT. OM NA ŠT. KOTITEV V TRETJEM GN.	0,85	0,69	3,10 ^a	3,00 ^a
ŠT. OM NA ŠT. KOTITEV V ČETRTEM GN.	0,21	0,11	3,00 ^a	3,30 ^a
DELEŽ (%) OD PRIČAKOVANIH GNEZD	42,5	50,5	48,8	57,9

SPUK – starost ob prvi uspešni kopulaciji; SPK – starost ob prvi kotitvi; SZK – starost ob zadnji kotitvi; DMK1 – doba od prve do druge kotitve; DMK2 – doba od druge do tretje kotitve; DMK3 – doba od tretje do četrte kotitve; OM – odstavljeni mladiči; ♀ - samica; GN – gnezdo; ŠT – število; *aa* - ni statistično značilne razlike med linijama; *ab* - statistično značilna razlika med linijama

Na starost ob prvi kotitvi (SPK) lahko vpliva: linija (Rugh, 1990), nastop spolne zrelosti in s tem večja možnost uspešne kopulacije, sistem paritev (Silver, 1995) ter trajanje brejosti in s tem povezano število zarodkov v maternici (Gabrovšek, 1998). Manjša kot je starost ob prvi kotitvi bolj je to primerno za vzrejo. Samice lahko začnemo prej izkoriščati za določeno število potomcev in tako so stroški vzreje manjši. S tem pa je povezana tudi starost ob zadnji kotitvi. Slednja je najkrajša, če se samice parijo v poprodnem estrusu in imajo tako dobe med kotitvami (DMK) krajše (Bogovič, 1981). Samice iz evidenčnih podatkov so ob prvi kotitvi za vse generacije skupaj pri liniji FHI stare povprečno 105 dni pri liniji FLI pa 108. Med linijama torej ni razlik. Če upoštevamo v poskusu ugotovljeno povprečno trajanje brejosti 20 dni, je pri liniji FLI prišlo do prve uspešne kopulacije pri starosti samic 86 dni in pri samicah linije FHI pri starosti 84 dni. Nekatere paritve so bile pri tem opravljene že neposredno po odstavitvi mladičev (v povprečju 21 dan starosti). V

poskusu smo paritve pri obeh linijah opravili pri povprečni starosti samic 60 dni. Samice so bile po tem ob prvi kotitvi stare 90 dni pri liniji FLI in 88 dni pri liniji FHI, do prve uspešne kopulacije je prišlo pri starosti 70 dni (FLI) oziroma 68 dni (FHI). V tej lastnosti ni razlik med linijama. Do prve uspešne kopulacije pa je prišlo pri monogamnem parjenju v poskusu v povprečju 16 dni prej, kot pri paritvah nastavljenih neposredno po odstavitvi mladičev. Večina samic inbridiranih linij doseže spolno zrelost pozno pri starosti med 6-8 tednov, medtem ko samice genetsko heterogenih linij dosežejo spolno zrelost lahko že pri 4 tednih starosti (Silver, 1995). Podatki prikazujejo, da sta liniji pozno zreli, saj je spolna zrelost pri samicah nastopila šele po 60. dnevu starosti. Rezultati pa dokazujejo, da je v postopku razmnoževanja boljše paritve opravljati okoli 60. dne starosti samic kot takoj po odstavitvi mladičev.

Do večjih razlik med linijama je prišlo v starosti ob zadnji kotitvi (SZK), kjer so bile po evidenčnih podatkih samice linije FLI stare 140 dni in samice linije FHI 178 dni. V poskusu je bila starost samic ob zadnji kotitvi pri liniji FLI 125 dni in pri liniji FHI 136 dni. Razlik med evidenčnimi podatki in podatki iz poskusa nismo uspeli razložiti.

Obdobja med kotitvami (DMK) so v zbranih podatkih iz reje trajala v povprečju med 34 in 47 dni in v poskusu med 24 in 44 dni. Sklepamo, da je samo po tretji kotitvi (DMK₄) v poskusu prišlo do večjega deleža uspešnih oploditev v poporodnem estrusu (prvi estrus po kotitvi), po vseh drugih kotitvah pa oploditve v prvem estrusu po kotitvi ni bilo. Tudi ta podatek opisuje, da je plodnost samic pri proučevanih inbridiranih linijah slabša, kot plodnost samic heterozigotnih linij. Pri slednjih (npr. linija NMRI) so ugotovili 80 % uspešnost poporodnega estrusa pri samicah z majhnim gnezdrom in 100 % uspešnost paritev pri samicah z večjim številom mladičev (Bogovič, 1981).

Izračunali smo, da so samice linije FLI v štirih generacijah skotile v proučevanem obdobju v povprečju 1,70 gnezd in samice linije FHI 2,02 gnezdi. Tudi v poskusu so samice linije FLI skotile manj gnezd (1,95) kot samice linije FHI (2,31). Delež samic, ki po paritvi niso skotile nobenega gnezda je bil v obeh primerih večji pri paritvah v liniji FLI (6,0 % za podatke iz reje in 10,0 % za podatke poskusa) kot pri paritvah v liniji FHI (4,3 % in 5,3 %). Delež samic z enim samim gnezdrom je bil v podatkih iz reje 47,8 % za linijo FLI in 28,3 % za linijo FHI. V poskusu so bili podatki bolj ugodni, med linijama ni bilo večje

razlike (17,5 % za FLI in 18,4 % za FHI). Delež samic z dvema gnezdi je bil pri liniji FLI v analizi manjši (23,9 %) kot v isti liniji v poskusu (47,5 %). Pri liniji FHI so bile vrednosti primerljive (34,8 % in 31,6 %). Značilno je, da je bil odstotek samic s tremi gnezdi v podatkih iz reje in v poskusu pri liniji FHI (26,1 % in 28,9 %) večji kot pri liniji FLI (14,9 % in 17,5 %). Štiri gnezda je skotilo največ samic (15,8 %) linije FHI v poskusu. Pri drugih skupinah so podatki primerljivi (7,4 % in 7,5 % za linijo FLI in 6,5 % za linijo FHI v podatkih iz reje). Ko smo izračunali deleže kotitev od pričakovanih kotitev smo ugotovili, da je bil ta delež tako v podatkih iz reje kot v poskusu manjši (42,5 % in 48,8 %) pri liniji FLI kot pri liniji FHI (50,5 % in 57,9 %). Obe vrednosti pa sta ugodnejši v poskusu kot pri podatkih iz reje. Ti podatki dokazujejo, da je bila plodnost miši v poskusu, v primerjavi z plodnostjo pri podatkih iz reje, boljša in da je bila v obeh primerih plodnost samic linije FHI boljša kot plodnost samic linije FLI.

Po drugi strani pa je bilo povprečno število odstavljenih mladičev po samici na paritev v podatkih iz reje pri liniji FLI večje (4,10) kot pri liniji FHI (3,76). V poskusu pa je to število (3,23) pri liniji FLI, v primerjavi z linijo FHI, manjše. Za linijo FHI je število v podatkih iz reje primerljivo z številom v poskusu (3,80). Skupni učinek vseh paritev, izražen v številu odstavljenih mladičev na samico je bil tako v podatkih iz reje (6,91 in 7,61) kot v poskusu (6,30 in 8,78) ugodnejši pri liniji FHI kot pri liniji FLI. Največ mladičev na samico je bilo odstavljenih pri liniji FHI v poskusu. Tudi ta podatek dokazuje boljšo plodnost pri liniji FHI (lean).

Po podatkih iz strokovne literature velikost gnezda pri miših narašča nekje do tretjega gnezda, doseže vrh in se ustavi, nato proti koncu življenjskega reprodukcijskega ciklusa postopoma pada (Wittingham in Wood, 1983). V povprečju je bilo pri podatkih iz reje za linijo FHI odstavljenih 4,3 mladičev / odstavljeno gnezdo in pri liniji FLI 4,7 odstavljenih mladičev / odstavljeno gnezdo in se torej število med linijama statistično ne razlikuje. Velikost gnezda pri liniji FHI z zaporednim gnezdom pada, pri FLI pa narašča do drugega gnezda in nato pada. Vendar pa je število OM na odstavljeno gnezdo pri podatkih iz reje večje kot pri podatkih iz poskusa. Za takšen rezultat je možna razlaga, da je prišlo pri vpisovanju novih gnezd do napake. Pri podatkih iz reje so bile značilne poligamne paritve, kjer sta lahko imeli dve samici gnezdo na isti dan, mi pa smo ga evidentirali kot eno samo.

Iz podatkov v preglednici 29 je razvidno, da je bilo povprečno število odstavljenih mladičev na rojeno gnezdo v analizi podatkov iz reje v tretjem in četrtem gnezdu (0,85 in 0,11 za linijo FLI in 0,69 in 0,11 za linijo FHI)) pri obeh linijah značilno manjše, kot v prvih dveh gnezdih (3,81 in 2,04 za linijo FLI in 4,32 in 2,48 za linijo FHI). V poskusu te razlike niso bile tako velike, še v četrtem gnezdu je bilo v povprečju odstavljenih 3,00 mladičev pri liniji FLI in 3,30 mladičev pri liniji FHI. Ker pa delež samic, ki so skotile tri gnezda posebej pri liniji FLI močno upade (na 14,9 % v analizi in na 17,5 % v poskusu) in čeprav so bile pri liniji FHI vrednosti ugodnejše (26,1 % v analizi in 28,9 % v poskusu) lahko zaključimo, da je v reji ugodneje, če monogamne paritve opravimo pri starosti samic 60 dni in zaključimo z razmnoževanjem po drugi kotitvi samic, ki v generaciji kotijo. To bi bilo primerno, ker paritev na ta način, v primerjavi s paritvami neposredno po odstavitvi mladičev, zmanjša v povprečju starost ob prvi kotitvi za 20 dni in s tem zmanjšamo čas izkoriščanja posamezne samice v razmnoževanju. Tako lahko v reji povečamo učinkovitost razmnoževanja. Z monogamnim parjenjem bo možno bolj zanesljivo vzdrževati homozigotnost v linijah. Podatki o plodnosti samic in o mladičih pa bodo bolj zanesljivi.

5.1.2 Primerjava podatkov o plodnosti linije FHI in FLI iz poskusa

V poskusu smo sledili več podatkov kot v analizi podatkov iz reje in opravljali dodatne analize plodnosti. Izmerjeni podatki in izračunane povprečne vrednosti so za primerjavo med linijama predstavljene v preglednici 30.

Preglednica 30: Podatki pridobljeni v poskusu

	FLI	FHI
STAROST OB PARITVI (dni)	61,1 ^a	61,8 ^a
STAROST OB PRVI KOPULACIJI (dni)	70,3 ^a	68,4 ^a
TELESNA MASA OB PRVI KOPULACIJI (g)	26,7 ^a	20,5 ^b
VAGINALNI ČEP - RECIDIVA ALI REPLUG (%)	43,5	5,8
TRAJANJE BREJOSTI (dni)	20,0 ^a	20,2 ^a
ŠTEVILO GNEZD NA PARITEV	1,95	2,30
ŠTEVILO ŽIVOROJENIH MLADIČEV NA PARITEV	6,7	9,1
ŠTEVILO ŽIVOROJENIH MLADIČEV NA GNEZDO	3,4 ^a	3,9 ^a
ŠTEVILO (%) MRTVOROJENIH MLADIČEV NA GNEZDO	0,6 ^a (14,6)	0,5 ^a (11,3)
ŠTEVILO ODSTAVLJENIH MLADIČEV NA GNEZDO	3,2 ^a	3,8 ^a
ŠTEVILO ODSTAVLJENIH MLADIČEV PO SAMICI	6,3	8,8
DELEŽ IZGUB MLADIČEV DO ODSTAVITVE (%)	6,0	3,5
POVPREČNA MASA GNEZDA – ŽM (g)	8,83 ^a	8,52 ^a
POVPREČNA ROJSTNA MASA MLADIČA (g)	1,94 ^a	1,87 ^b
POVPREČNA TELESNA MASA ♀ OB ODSTAVITVI (g)	10,47 ^a	9,19 ^b
POVPREČNA TELESNA MASA ♂ OBODSTAVITVI (g)	10,76 ^a	9,52 ^b

ŽM – živorojeni mladiči; ♀ - samica; ♂ - samec; aa - ni statistično značilnih razlik med linijama; ab - statistično značilne razlike med linijama

Paritve smo pri obeh linijah opravili, ko so bile samice v povprečju stare 60 dni. Do uspešne kopulacije je prišlo pri liniji FLI v povprečju 9,2 dni po paritvi in pri liniji FHI v povprečju 6,4 dni po paritvi. To razliko razlaga pojav recidive (ang. replug) vaginalnega čepa, ki smo jo pri liniji FLI ugotovili pri 43,5 % samic in pri liniji FHI pri 5,8 % samic. Sklepamo, da je bila uspešnost prve kopulacije pri liniji FHI boljša kot pri liniji FLI. Povprečna telesna masa ob prvi kopulaciji samic (pojav vaginalnega čepa) linije FLI (26,7 g) je bila statistično značilno večja od telesne mase samic ob prvi kopulaciji linije FHI (20,5 g). To je povezano z genetskimi lastnostmi (fat in lean) linij, ki smo ju proučevali.

Dobo brejosti (DB) smo v poskusu spremljali od uspešne kopulacije do prve kotitve. V povprečju traja brejost 19-21 dni kot to navajajo številni avtorji (Rugh, 1990; Silver, 1995; Inglis, 1980). Cargill in sod. (2000) so s poskusom ugotovili, da je pri selekcionirani liniji HG (*high growth*) z manjšim številom mladičev povprečna doba brejosti daljša (20,3 dni), kot pri samicah C57BL/6J iz kontrolne skupine z večjim številom mladičev (doba brejosti 19,5 dni). V našem poskusu je brejost po prvi uspešni kopulaciji pri liniji FLI trajala v povprečju 20,0 dni in pri liniji FHI 20,2 dni. Statistično značilnih razlik med linijama torej

ni bilo. V naslednjih obdobjih trajanja brejosti nismo ugotavljali oziroma nismo spremljali pojava vaginalnih čepov. Samice linije FHI in FLI v povprečni DB ne odstopajo od standardnih linij miši (Cargill in sod., 2000; Bogovič, 1981; Gabrovšek, 1998; Silver, 1995; Rugh, 1990).

Iz podatkov, predstavljenih v preglednici 29 sklepamo, da je le po tretji kotitvi pri liniji FLI ($DMK_4 = 24$ dni) prišlo do oploditve vseh treh (3) samic, ki so štirikrat kotile, v estrusu po kotitvi (poporodni estrus). Verjetno je, da je pri določenem deležu samic linije FHI tudi po prvi in drugi kotitvi ($DMK_3 = 32$ dni; $DMK_4 = 30$ dni) ter pri samicah linije FLI po prvi kotitvi ($DMK_2 = 37$ dni) prišlo do uspešne kopulacije v estrusu po kotitvi. DMK , ki traja 40 dni in več (linija FLI, DMK_3 in linija FHI, DMK_2) dokazuje, da v estrusu po kotitvi ni prišlo do uspešne oploditve. »Uspešne« navajamo zato, ker je tudi pri drugih samicah lahko prišlo do kopulacije in oploditev ni bila uspešna, ali pa je bila oploditev uspešna in so plodovi v brejosti odmrli. Te rezultate bi lahko razložili, če bi tudi po drugi in naslednjih kotitvah spremljali pojav vaginalnega čepa.

Samice so pri liniji FLI tekom poskusa skotile v povprečju 1,95 gnezd na paritev in samice linije FHI 2,30 gnezd. Na paritev smo v celotnem trajanju poskusa pri liniji FLI ugotovili 6,7 živorojenih mladičev in pri liniji FHI 9,1 živorojenega mladiča. Na gnezdo je bilo v povprečju živorojenih 3,4 (FLI) oziroma 3,9 mladičev (FHI) in med linijama ni bilo statistično značilnih razlik. Mrtvorojenih mladičev na gnezdo je bilo pri liniji FLI nekoliko več (14,6 %) kot pri liniji FHI (11,3 %). Na gnezdo smo odstavili pri liniji FLI v povprečju 3,2 mladiča in pri liniji FHI 3,8 mladičev. Skupno smo odstavili po samici pri liniji FLI v povprečju 6,3 mladiča in pri liniji FHI 8,8 mladiča.

Od kotitve do odstavitve so možne tudi izgube mladičev. Le te niso povezane z večjim številom mladičev v gnezdu, ampak z manjšo rojstno maso gnezda. Rugh (1990) navaja, da so bolj, kot izgube do odstavitve, značilne izgube v prenatalnem času. Pri poskusu smo ugotovili, da je izgub do odstavitve v povprečju zelo malo. Od rojstva do odstavitve smo pri liniji FLI ugotovili 6,0 % izgub mladičev in pri liniji FHI 3,5 %. Več kot je izgubljenih mladičev v reji, večje število gnezd moramo pridobiti od posamezne samice. Eisen in Durrant (1980) sta ugotovila, da so pri samicah selekcioniranih na večjo telesno maso in manjše gnezdo (L^-W^+) izgube večje, kot pri samicah selekcioniranih na manjšo telesno

maso in večje gnezdo (L^+W^-). V primerjavi z raziskavo Fowler in Edwards (1960), kjer je imela selekcionirana linija na velikost, pri velikih miših 12,9 % izgub, pri majhnih miših pa 11,1 % izgub, so bile v našem poskusu izgube manjše. Majhne izgube so rezultat pozitivnih maternalnih lastnosti. Samice linije FHI in FLI so torej kljub manjšim gnezdrom in z relativno majhnim številom zaporednim gnezd dobre matere in ne zavračajo mladičev.

Povprečna masa gnezda (živorojenih mladičev) je bila pri liniji FLI 8,83 g in povprečna masa živorojenega mladiča 1,94 g ter pri liniji FHI 8,52 g in 1,8 g. Razlike v masi gnezd med linijama niso bile statistično značilne, medtem ko so razlike v masi živorojenega mladiča le statistično značilne ($p=0,01$). Razlike v masi gnezda so bolj statistično značilne znotraj linije med zaporednimi gnezdmi. S povečevanjem števila mladičev v gnezdu se povečuje masa gnezda. Bogovič (1981) je v poskusu ugotovila, da imajo samice z manjšim številom mladičev v gnezdu ob kotitvah le te težje (povprečno 1,85 g) kot samice z večjim številom mladičev (povprečno 1,58 g). Te razlike so bile statistično značilne. Masa mladiča ob rojstvu naj bi vplivala na odstavitveno maso posameznega mladiča. Mladiči v večjem gnezdu imajo manjšo rojstno maso in potem tudi manjšo odstavitveno maso (Epstein, 1978). Odstavitvena masa mladičev v našem poskusu se z zaporednim gnezdrom ne zmanjšuje, kot je to ugotovila Bogovič (1981) v svojem poskusu. Večje kot je število odstavljenih mladičev, manjša je masa odstavljenega mladiča ($p=0,0083$). Ob odstavitvi so bili samci pri liniji FLI težki v povprečju 10,67 g in samice 10,47 g ter pri liniji FHI 9,52 g oziroma 9,19 g. Znotraj linije med spoloma ni bilo statistično značilnih razlik. Razlike so bile visoko statistično značilne med linijama skupaj in ločeno po spolu, pri tem so mladiči linije FLI za približno 1,2 g težji od mladičev linije FHI. Izrazito statistično značilne razlike so tudi v telesni masi samic ob prvi kopulaciji med linijama (26,7 g pri liniji FLI in 20,5 g pri liniji FHI). Do teh razlik je prišlo tekom razvoja in rasti mladičev po odstavitvi.

Posamezne parametre plodnosti standardiziranih inbridiranih linij so opisali različni avtorji in raziskovalni centri. Oploditveno sposobnost kot enega od pomembnejših parametrov opišemo z odstotkom uspešnih paritev. Neinbridirane linije dosežejo tudi do 100 % uspešnost (Silver, 1995), med tem pa je uspešnost pri inbridiranih linijah od najbolj uspešne CBA/CaJ z 97,4 % uspešnost oploditve, do najslabše plodne linije 129P1/ReJ z 31,6 % uspešnost oploditve (Mouse phenome ..., 2007). Samice linije FLI iz našega poskusa so dosegle 90,0 % uspešnost oploditve, iz linije FHI pa 94,7 % uspešnost. Poleg oploditvene

sposobnosti je pomembna tudi velikost gnezda in število gnezd na samico. Povprečna velikost gnezda nekaterih linij je v razponu od 4,2 mladičev na gnezdo pri liniji CBA/J (Mouse phenome ..., 2007) do 9,5 mladičev na gnezdo pri FVB/N (Silver, 1995). Število gnezd na samico inbridiranih linij je v razponu od 2,0 gnezd pri liniji C57BR/CdJ do 4,4 gnezd pri liniji DBA/1J (Mouse phenome ..., 2007). Liniji FHI in FLI tako sodita med inbridirane linije z slabšo plodnostjo, s povprečno 2,0 -2,3 gnezd na samico in povprečno 3,2 odstavljenih mladičev na gnezdo pri liniji FLI ter 3,8 odstavljenih mladičev na gnezdo pri liniji FHI. Liniji sta glede na zgornje parametre podpovprečno plodni, kljub dobri oploditveni sposobnosti, ki je nad povprečjem standardnih linij (Mouse phenome..., 2007).

Starost ob prvi kopulaciji nam pove starost samice, ko je pripravljena za paritev in jo lahko začnemo izkoriščati za pridobitev potomcev. Med različnimi linijami se starost ob kopulaciji razlikuje. Samice neinbridiranih linij so v povprečju stare ob prvi paritvi štiri tedne, medtem pa so samice inbridiranih linij sposobne za paritev pri starosti 6-8 tednov (Silver, 1995). V našem poskusu so bile samice stare v povprečju 10 tednov.

Samice, ki so sicer že spolno zrele niso pa še zrele za paritev, lahko samec posili, taka paritev pa potem ni uspešna (Silver, 1995). Dokaz so tudi rezultati poskusa, kjer smo uspešnost paritev primerjali s podatki o prvi uspešni kopulaciji. Znak uspešne kopulacije je pri samici prisoten vaginalni čep. Odstotek samic, kjer po uspešni kopulaciji ni bilo opaziti ponovnih čepov, je bil pri liniji FHI 57,9 % in pri liniji FLI 20,0 %. Neuspešne paritve smo v našem poskusu dokazali z odkritjem zaporednih čepov (recidiv ali ang. replug). Pri liniji FHI je takih samic 5,8 %, pri liniji FLI pa 43,5 % samic. Če se je vaginalni čep ponovil več kot en dan kasneje smo ga označili kot ponovni čep in sklepali, da je prišla samica v reciklažo (ang. recycle). Ta pa je bil pogostejši pri liniji FHI (41,2 %), medtem ko je bil pri liniji FLI 38,5 %. Posledično ima to vpliv na višjo starost ob uspešni kopulaciji. Slednje so v raziskavi spremljali tudi Cargill in sod. (2000) in ugotovili, da je pojav zaporednega čepa bolj pogost pri selekcionirani liniji HG ali *high growth* (22 % samic), kot pri kontrolni liniji C57BL/6J (14 % samic). Prav tako je bil za isto linijo bolj pogost pojav ponovnega čepa (8 % HG in 2 % C57BL/6J). Spremljanje pojava vaginalnega čepa torej ni najbolj zanesljiv način ugotavljanja uspešnosti paritev. Za poskus pa so bile izbrane samice FHI primerne za paritev, medtem ko bi lahko samice FLI parili še nekoliko kasneje.

Doba med kotitvami (DMK) je čas med dvema zaporednima gnezdoma. Dolžina te dobe vpliva na število gnezd v življenjskem reprodukcijskem obdobju samice. Dolžina DMK je zaželjena čim krajša, saj ima tako lahko samica v svojem reprodukcijskem obdobju večje število mladičev. Samice se lahko ponovno pariyo v času poporodnega estrusa, takrat je DMK dolga najmanj kot povprečna dolžina brejosti (20 dni), lahko pa tudi več. Če pride do paritve v poporodnem estrusu, se lahko implantacija zarodkov odloži in s tem posledično podaljša naslednjo brejost (Bindon, 1969; cit. po Whittingham in Wood, 1983). Na DMK torej vpliva število že prisotnih sesajočih mladičev kot tudi mladičev, ki so še v maternici (Inglis, 1980). Tudi Gabrovšek (1998) navaja, da laktacija značilno podaljša brejost. V tem poskusu so se nekatere samice obrežile takoj po kotitvi, posledično je bila v povprečju brejost daljša za 7-9 dni. Iz rezultatov našega poskusa je razvidno, da pri linijah FHI in FLI večinoma ni prišlo do uspešne paritve v času poporodnega estrusa, saj je bila povprečna DMK pri liniji FHI 35,8 dni, pri liniji FLI pa 37,7 dni. Če je DMK daljša (od 38 do 42 dni), je prišlo do ponovne paritve šele po odstavitvi sesajočih mladičev. Pri nekaterih samicah je prišlo do ponovne paritve v času poporodnega estrusa. Pri liniji FHI je bilo takih samic največ v času po drugi kotitvi, pri liniji FLI pa je bilo teh samic največ takoj po prvi kotitvi – za ta obdobja je bil največji odstotek samic, ki so se uspešno parile v času poporodnega estrusa pri liniji FHI 26,3 % in pri liniji FLI 40 %. Doba med kotitvami je bila pri podatkih iz reje v povprečju za linijo FHI značilno daljša (42,7 dni), za linijo FLI pa primerljiva (38,7 dni). Možno je, da na zmanjšanje odstotka uspešnih paritev po porodu vpliva sistem poligamnih paritev. Slednji negativno vpliva na uspešnost paritev, kadar so samice in samci stalno skupaj v kletki (Inglis, 1980).

Vsi predstavljeni podatki dokazujejo, da je plodnost miši v liniji FLI (fat) slabša od plodnosti miši v liniji FHI (lean).

5.1.3 Primerjava podatkov o plodnosti linije FLI z drugimi modeli debelih miši

Model živali s povečano kapaciteto za telesno rast ima pogosto koreliran učinek na povečano zamaščenost. S selekcijo na hitro povečanje poodstavitvene mase pri liniji miši M16 so ustvarili poligeni model za študijo genetike rasti, debelosti in diabetesa tipa 2. Linija M16 je nastala s selekcijo genetsko heterogene linije ICR, pri čemer je bil selekcijski kriterij odbira najtežjih živali znotraj gnezda pri starosti 3 do 6 tednov. V

primerjavi z monogenimi modeli za debelost ima M16 približno enak odstotek maščob. Če ga primerjamo s poligenimi modeli se odstotek maščob močno poveča (Allan in sod., 2004). Monogena modela (db/db, ob/ob) imata značilno pomanjkanje hormona leptina zaradi mutacije v genu za leptin (ob) ali njegovem receptorju (db). Leptin vpliva na reprodukcijo skozi številne regulacijske mehanizme: nastop pubertete, nadzor izločanja gonadotropinov, implantacija, brejost (Mouse genome ..., 2007). Ewart-Toland in sod. (1998) so v svojem poskusu želeli ugotoviti ali se lahko na podlagi križanja miši z drugačnim genotipskim ozadjem, doseže kljub debelosti, dobro plodnost pri miših db/db. Rezultati poskusa so pokazali, da je prisotnost leptina še vedno izredno pomembna za začetek reprodukcijskega ciklusa. Pomanjkanje leptina se lahko nadomesti s tretiranjem živali s tem hormonom, ki ga izloča maščobno tkivo. Sterilnost samcev pa so uspeli izničiti z drugačnim genotipskim ozadjem (dobra plodnost).

Značilnost modela za debelost »lethal yellow« (Ay/a) miši je, da se odpornost na leptin razvije s starostjo (Brannian in sod., 2005). Homozigoti (Ay/Ay) poginejo tekom razvoja. Heterozigoti (Ay/a) pa, kot že omenjeno, se odebelijo, ko so živali starejše. Hkrati se jim zmanjša plodnost, kljub restriktivni dieti (Diggins in sod., 2001).

Če primerjamo zgoraj opisane modele miši, z našo linijo FLI, ima slednja dobro plodnost, kljub povišani telesni masi. Tako je lahko primeren model za proučevanje vpliva debelosti na različne mehanizme v organizmu, saj za relativno normalno reprodukcijo niso potrebne intervencije kot tretiranje z določenimi hormoni, kot je to na primer pri nekaterih mutacijah, ki povzročajo debelost.

5.1.4 Zaključki in priporočila

V reji se lahko odločamo za različne sisteme paritev: monogamne, trojne, poligamne paritve in paritve z rotirajočim samcem. V koloniji, kjer je bila opravljena ta diploma so prisotni vsi sistemi paritev, poskus pa se je izvedel z monogamnimi paritvami. Po pregledu podatkov iz reje, smo ugotovili, da so bile poligamne paritve, kljub prisotnim monogamnimi in trojnimi, pogoste v vseh generacijah. V poligamni reji brejih samic ne izolirajo v drugo kletko, ampak ostajajo vse samice skupaj. Slabost tega je, da težko določimo datum paritve posamezne samice, uspešnost paritev, kolikšna je doba med zaporednima kotitvama in kateri samici pripada določeno gnezdo, še posebej kadar imata

dve samici gnezdo na isti dan (Otis in Foster, 1983; Inglis, 1980). Različne sisteme paritev podrobneje opisuje Inglis (1980) in poudarja, da je z vidika vodenja evidenc najbolj praktičen sistem monogamnih paritev. Tudi naši podatki iz poskusa kažejo, da je vodenje evidence monogamnih paritev lažje in bolj natančno. V koloniji pa bi lahko poskusili nastaviti paritve z rotirajočim samcem, kar bi posledično pomenilo manjše število kletk, delo z evidencami pa ne bi bilo zahtevno, saj so kapacitete kolonije v manjših razsežnostih. Pri tem bi imeli tudi boljši pregled nad plodnostjo oz. sterilnostjo samcev.

Glede na slabe rezultate pri spremljanju vaginalnih čepov, bi bilo priporočljivo preveriti ali so za pogostost pojava zaporednih čepov krivi drugačni vzroki, npr. čep se lahko obdrži oz. ohrani več dni zapored. Po paritvi oz. kopulaciji se samca odstrani iz kletke in v nadaljevanju vsak dan spremlja pri samici ali se čep ohrani ali ne. Tako bi lahko dobili rezultate ali je prišlo v našem poskusu do ponovne kopulacije takoj po prvi kopulaciji. To bi lahko pomenilo daljšo dobo od paritve do uspešne kopulacije in s tem višjo starost ob prvem gnezdu.

Paritve bi bilo smiselno obdržati pri liniji FHI do največ tretjega zaporednega gnezda. Tu je bila pogostost paritev v poporodnem estrusu največja, povprečno število mladičev na samico pa se do tretjega gnezda ne zmanjša veliko. Pri liniji FLI je smiselno obdržati paritve do drugega zaporednega gnezda. Pogostost paritev v poporodnem estrusu je tu največja, hkrati pa je tu največje število odstavljenih mladičev na samico. V obdobju poskusa smo v povprečju za vsa zaporedna gnezda skupaj dobili pri liniji FHI 8,78 mladičev / samico in pri liniji FLI 6,30 mladičev / samico. Pri tem je bilo število gnezd za obe liniji približno enako, za linijo FHI 2,31 gnezd / samico in za linijo FLI 1,95 gnezd / samico.

Poznavanje plodnosti samic je posebej pomembno, kadar načrtujemo nov poskus in želimo imeti v nekem časovnem terminu določeno število enako starih živali s katerimi bi poskus izvedli. Na podlagi rezultatov poskusa smo izračunali okvirno število živali v paritvah, s katerimi bi potem dobili število živali za poskus. Za primer smo vzeli, da v poskusu potrebujemo 50 samcev pri starosti 10 tednov. Najboljša odločitev za tak primer bi bile trojne paritve. S tem bi zmanjšali število potrebnih samcev in posledično tudi število kletk. V trojnih partvah (dve samici na enega samca) bi morali po uspešni kopulaciji breji samici

ločiti oz. izolirati v posebno kletko. V povprečju dobimo v prvi kotitvi na samico 4 mladiče (preglednica 12). Ker se v praksi razmerje med spoloma rahlo nagiba k samcem, smo vzeli povprečno 2,5 odstavljenih samcev na samico. Tako bi potrebovali za končno število (50 samcev) pri starosti 10-ih tednov, 20 samic in 10 samcev, torej skupaj deset paritev. Od nastavljenih paritev do odstavljenih samcev bi potrebovali povprečno 6 tednov ali približno mesec in pol. Za naš poskus smo porabili približno šest mesecev (od začetka paritev do zaključka spremljanja paritev). Če upoštevamo, da je starost samic ob paritvi deset tednov in vzrejamo samce do starosti 10 tednov, bi skupaj za pripravo živali za omenjeni hipotetičen poskus potrebovali 23 tednov ali približno šest mesecev.

5.2 SKLEPI

- Liniji FHI in FLI sta v primerjavi z navedbami iz strokovne literature za druge inbridirane linije miši podpovprečno plodni, kljub dobri oploditveni sposobnosti (90,0 % pri liniji FLI in 94,7 % pri liniji FHI), ki je nad povprečjem standardnih linij.
- Primerna starost samic ob paritvi za linijo FHI in FLI je pri 10-ih tednih ali več. To uvršča liniji med linije, ki pozno dosegajo spolno zrelost oziroma med poznozrele linije. Starost samic ob prvi kopulaciji (spolni zrelosti) se med linijama statistično ni razlikovala. Samice linije FLI so imele ob prvi kopulaciji telesno maso 26,7 g in samice linije FHI 20,5 g. Razlika je bila visoko statistično značilna.
- Do večjih razlik med linijama je prišlo v starosti ob zadnji kotitvi (SZK), kjer so bile po evidenčnih podatkih samice linije FLI stare 140 dni in samice linije FHI 178 dni. V poskusu je bila starost samic ob zadnji kotitvi pri liniji FLI 125 dni in pri liniji FHI 136 dni.
- Samice linije FLI so, v štirih generacijah proučevanega obdobja, skotile v povprečju 1,70 gnezd in samice linije FHI 2,02 gnezdi. Tudi v poskusu so samice linije FLI skotile manj gnezd (1,95) kot samice linije FHI (2,31). Delež samic, ki po paritvi niso skotile nobenega gnezda je bil v obeh primerih večji pri paritvah v liniji FLI (6,0 % in 10,0 %) kot pri paritvah v liniji FHI (4,3 % in 5,3 %). Pri podatkih iz reje je bilo z enim samim gnezdом pri liniji FHI 47,8 % samic in pri liniji FLI 28,3 % samic. V poskusu so bili podatki bolj ugodni, med linijama ni bilo večje razlike (17,5 % in 18,4 %). Delež samic z dvema gnezdi je bil pri podatkih iz reje za linijo FLI manjši (23,9 %) kot za isto linijo v poskusu (47,5 %). Pri liniji FHI so bile vrednosti primerljive (34,8 % in 31,6 %). Značilno je, da je bil odstotek samic s tremi gnezdi v podatkih iz reje in v poskusu pri liniji FHI (26,1 % in 28,9 %) višji kot pri liniji FLI (14,9 % in 17,5 %). Štiri gnezda v poskusu je skotilo največ samic (15,8 %) linije FHI. Pri drugih skupinah so podatki primerljivi (7,4 % in 7,5 % za linijo FLI in 6,5 % za linijo FHI v reji). Po izračunu deleža kotitev od pričakovanih kotitev smo ugotovili, da je bil slednji tako pri podatkih iz reje kot v poskusu za linijo FLI manjši (42,5 % in 48,8 %) kot za linijo FHI (50,5 % in 57,9 %). Obe

vrednosti pa sta ugodnejši v poskusu kot pri podatkih iz reje. To dokazuje, da je bila plodnost miši v poskusu boljša, kot v analizi podatkov iz reje in da je bila v obeh primerih plodnost samic linije FHI boljša kot plodnost samic linije FLI.

- Po drugi strani pa je bilo povprečno število odstavljenih mladičev po samici na paritev v analizi pri liniji FLI večje (4,10) kot pri liniji FHI (3,76). V poskusu pri liniji FLI je to število manjše (3,23) v primerjavi z linijo FHI. Za linijo FHI je število v analizi primerljivo z številom v poskusu (3,80). Skupni učinek vseh paritev, izražen v številu odstavljenih mladičev na samico je bil tako v analizi (6,91 in 7,61) kot v poskusu (6,30 in 8,78) ugodnejši pri liniji FHI kot pri liniji FLI. Največ mladičev na samico je bilo odstavljenih pri liniji FHI v poskusu. Tudi ta podatek dokazuje boljšo plodnost pri liniji FHI (lean).
- Povprečno število odstavljenih mladičev na rojeno gnezdo je bilo v analizi podatkov iz reje v tretjem in četrtem gnezdu (0,85 in 0,11 za linijo FLI in 0,69 in 0,11 za linijo FHI)) pri obeh linijah značilno manjše, kot v prvih dveh gnezdih (3,81 in 2,04 za linijo FLI in 4,32 in 2,48 za linijo FHI). V poskusu te razlike niso bile tako velike, še v četrtem gnezdu je bilo v povprečju odstavljenih 3,00 mladičev pri liniji FLI in 3,30 mladičev pri liniji FHI. Ker pa se delež samic, ki so skotile tri gnezda posebej pri liniji FLI močno zmanjša (na 14,9 % v analizi in na 17,5 % v poskusu) in čeprav so bile pri liniji FHI vrednosti ugodnejše (26,1 % v analizi in 28,9 % v poskusu) lahko zaključimo, da je v reji ugodneje, če monogamne paritve opravimo pri starosti samic 60 dni in zaključimo z razmnoževanjem po drugi kotitvi samic, ki v generaciji kotijo.
- Brejost po prvi uspešni kopulaciji je pri liniji FLI trajala v povprečju 20,0 dni in pri liniji FHI 20,2 dni. Če je doba med kotitvama daljša (od 38 do 42 dni), je prišlo do ponovne paritve šele po odstavitvi sesajočih mladičev. Pri večini samic tako iz analize podatkov reje kot tudi iz poskusa v povprečju ni prišlo do uspešne kopulacije v času poporodnega estrusa.
- Samice so pri liniji FLI tekom poskusa skotile v povprečju 1,95 gnezd na paritev in samice linije FHI 2,30 gnezd. Na paritev smo v celotnem trajanju poskusa pri liniji FLI ugotovili 6,7 živorojenih mladičev in pri liniji FHI 9,1 živorojenega mladiča.

Na gnezdo je bilo v povprečju živorojenih 3,4 (FLI) oziroma 3,9 mladičev (FHI). Mrtvorojenih mladičev na gnezdo je bilo pri liniji FLI nekoliko več (14,6 %) kot pri liniji FHI (11,3 %). Na gnezdo smo odstavili pri liniji FLI v povprečju 3,2 mladiča in pri liniji FHI 3,8 mladičev. Skupno smo odstavili po samici pri liniji FLI v povprečju 6,3 mladiče in pri liniji FHI 8,8 mladičev. Od rojstva do odstavitve smo pri liniji FLI ugotovili 6,0 % izgub mladičev in pri liniji FHI 3,5 %.

- Povprečna masa gnezda (živorojenih mladičev) je bila pri liniji FLI 8,83 g in povprečna masa živorojenega mladiča 1,94 g ter pri liniji FHI 8,52 g in 1,80 g. Razlike v masi gnezd med linijama niso bile statistično značilne, med tem pa so statistično značilne razlike v masi živorojenega mladiča. Ob odstavitvi so bili samci pri liniji FLI težki v povprečju 10,67 g in samice 10,47 g ter pri liniji FHI 9,52 g oziroma 9,19 g. Med linijama so v masi odstavljenih mladičev razlike statistično značilne. Izrazito statistično značilne razlike v telesni masi med linijama pa so tudi pri samicah ob prvi kopulaciji (26,7 g pri liniji FLI in 20,5 g pri liniji FHI). Do teh razlik je prišlo tekom razvoja in rasti mladičev po odstavitvi.
- Vsi v raziskavi pridobljeni rezultati dokazujejo, da je plodnost miši v liniji FLI (fat) slabša od plodnosti miši v liniji FHI (lean). Ugotovili smo, da so monogamne paritve pri obeh linijah ob starosti miši po 60. dnevu za razmnoževanje uspešnejše kot poligamne paritve, ki so jih do sedaj izvajali že po odstavitvi mladičev. Pri tem je najbolje, da razmnoževanje v eni generaciji pri liniji FLI zaključimo že po drugem gnezdu posamezne samice in razmnoževanje pri liniji FHI po tretjem gnezdu posamezne samice.
- Linija FLI je lahko primeren model za proučevanje vpliva debelosti na različne mehanizme v organizmu.
- Na podlagi rezultatov poskusa smo izračunali okvirno število živali v paritvah, s katerimi bi potem dobili potrebno število živali za izvedbo poskusa.

6 POVZETEK

Za opis lastnosti določene linije laboratorijskih miši je potrebno navesti podatke o plodnosti samic in samcev. Znotraj genetsko heterogene ali homogene linije so v lastnostih plodnosti lahko velike razlike še posebej, če so linije selekcionirane na različne lastnosti. Genetsko heterogene linije miši imajo visoko reprodukcijsko sposobnost s kratkimi generacijskimi intervali in zgodnjo spolno zrelost, med tem pa se pri inbridiranih zaradi depresije inbridinga ta plodnost zmanjšuje. Znano je tudi, da ekstrema kot prekomerna ali pomanjkljiva zamaščenost lahko negativno vplivata na lastnosti plodnosti pri živalih in ljudeh. Liniji, ki sta predmet te diplome (liniji FLI in FHI) izhajata iz dvosmernega selekcijskega poskusa iz osnovne populacije, ki je nastala s križanjem dveh inbridiranih linij in ene genetsko heterogene linije. Po 53-ih generacijah parjenja te linije se je delež maščob v telesu pri 14 tednov starih samic v liniji F (FLI) povečal od 10 % na 23 % in pri liniji L (FHI) zmanjšal iz 10 % na 4% (Bünger in Hill, 1999).

Delovna hipoteza poskusa je bila, da med linijama FLI in FHI v plodnostnih parametrih obstajajo statistično značilne razlike. Preveriti smo želeli, ali rutinske metode v razmnoževanju miši v obstoječi reji obeh linij miši zagotavljajo primerno izkoriščanje reprodukcijskih lastnosti miši v poskusih in pripravi živali za nadaljnje poskuse. Pri poskusih pogosto potrebujemo veliko število živali, ki so kar se da enake starosti, zato je za načrtovanje poskusov še posebej pomembno poznavanje lastnosti plodnosti pri poskusnih živalih.

Iz dostopnih podatkov v reji obravnavanih linij kolonije na Oddelku za zootehniko smo v diplomski nalogi opravili analizo plodnosti laboratorijskih miši štirih generacij obeh linij in sistematično predstavili urejene podatke. V eni generaciji obeh linij smo v posebnem poskusu z istočasnim parjenjem v monogamni reji spremljali nekatere lastnosti plodnosti. Za te lastnosti smo v programu SAS (Statistical analysis system) s proceduro GLM (General Linear Model) testirali razlike med linijama, zaporednimi gnezdi in interakcijo med tema dvema vplivoma. Podatke iz reje smo primerjali s podatki iz poskusa. V koloniji, kjer je bila opravljena ta diploma so prisotni vsi sistemi paritev, poskus pa se je izvedel z monogamnimi paritvami. V poskusu smo spremljali za linijo FLI 40 paritev in za linijo

FHI 38 paritev v eni generaciji. V analizi podatkov iz reje pa smo upoštevali podatke v 34-ih paritvah za linijo FLI in v 36-ih paritvah za linijo FHI v štirih generacijah.

Liniji FHI in FLI sta v primerjavi z navedbami iz strokovne literature za druge inbridirane linije miši podpovprečno plodni, kljub dobri oploditveni sposobnosti ob kopulacijah po paritvi (90,0 % pri liniji FLI in 94,7 % pri liniji FHI), ki je nad povprečjem standardnih linij.

Primerna starost samic ob paritvi za linijo FHI je pri 9-ih tednih, za linijo FLI pa pri 10-ih tednih ali več. To uvršča liniji med linije, ki pozno dosegajo spolno zrelost, med poznozrele linije. Starost samic ob prvi kopulaciji (spolni zrelosti) se med linijama statistično ni razlikovala. Samice linije FLI so imele ob prvi kopulaciji telesno maso 26,7 g in samice linije FHI 20,5 g. Razlika je bila visoko statistično zanjilna.

Do večjih razlik med linijama je prišlo v starosti ob zadnji kotitvi (SZK), kjer so bile po podatkih iz reje samice linije FLI stare 140 dni in samice linije FHI 178 dni. V poskusu je bila starost samic ob zadnji kotitvi pri liniji FLI 125 dni in pri liniji FHI 136 dni.

Samice linije FLI so v štirih generacijah skotile v proučevanem obdobju v povprečju 1,70 gnezda in samice linije FHI 2,02 gnezdi. Tudi v poskusu so samice linije FLI skotile manj gnezda (1,95) kot samice linije FHI (2,31). Delež samic, ki po paritvi niso skotile nobenega gnezda je bil v obeh primerih večji pri paritvah v liniji FLI (6,0 % in 10,0 %) kot pri paritvah v liniji FHI (4,3 % in 5,3 %). Samo eno gnezdo je imelo po podatkih iz reje 47,8 % samic linije FLI in 28,3 % samic linije FHI. V poskusu so bili podatki bolj ugodni, med linijama ni bilo večje razlike (17,5 % in 18,4 %). Delež samic z dvema gnezdi je bil pri liniji FLI v podatkih iz reje manjši (23,9 %) kot v isti liniji v poskusu (47,5 %). Pri liniji FHI so bile vrednosti primerljive (34,8 % in 31,6 %). Značilno je, da je imelo v podatkih iz reje in v poskusu po tri gnezda več samic linije FHI (21,6 % in 28,9 %) kot samic linije FLI (14,9 % in 17,5 %). Štiri gnezda je v poskusu skotilo največ samic (15,8 %) linije FHI. Pri drugih skupinah so podatki primerljivi (7,4 % in 7,5 % za linijo FLI in 6,5 % za linijo FHI v reji). Po izračunu deleža kotitev od pričakovanih kotitev smo ugotovili, da je bil slednji tako pri podatkih iz reje kot tudi v poskusu (42,5 % in 48,8 %) za linijo FLI manjši kot za linijo FHI (50,5 % in 57,9 %). Obe vrednosti pa sta ugodnejši v poskusu kot pri podatkih iz reje. To dokazuje, da je bila plodnost miši v poskusu boljša, kot v analizi

podatkov iz reje in da je bila v obeh primerih plodnost samic linije FHI boljša kot plodnost samic linije FLI.

Povprečno število odstavljenih mladičev po samici na paritev je bilo v analizi pri liniji FLI večje (4,10) kot pri liniji FHI (3,76) in v poskusu pri liniji FLI manjše (3,23) kot v analizi. Pri liniji FHI je bilo število v poskusu (3,80) primerljivo z številom v analizi. Skupni učinek vseh paritev, izražen v številu odstavljenih mladičev na samico je bil tako v analizi (7,61 in 6,91) kot v poskusu (8,78 in 6,30) ugodnejši pri liniji FHI kot pri liniji FLI. Največ mladičev na samico je bilo odstavljenih pri liniji FHI v poskusu. Tudi ta podatek dokazuje boljšo plodnost pri liniji FHI (lean).

Povprečno število odstavljenih mladičev na rojeno gnezdo je bilo v analizi podatkov iz reje v tretjem in četrtem gnezdu (0,85 in 0,11 za linijo FLI in 0,69 in 0,11 za linijo FHI) pri obeh linijah značilno manjše, kot v prvih dveh gnezduh (3,81 in 2,04 za linijo FLI in 4,32 in 2,48 za linijo FHI). V poskusu te razlike niso bile tako velike, še v četrtem gnezdu je bilo v povprečju odstavljenih 3,00 mladičev pri liniji FLI in 3,30 mladičev pri liniji FHI. Ker pa delež samic, ki so skotile tri gnezda posebej pri liniji FLI močno upade (na 14,9 % v analizi in na 17,5 % v poskusu). Čeprav so bile pri liniji FHI vrednosti ugodnejše (26,1 % v analizi in 28,9 % v poskusu) lahko zaključimo, da je v reji ugodnejše, če monogamne paritve opravimo pri starosti samic 60 dni in zaključimo z razmnoževanjem po drugi kotitvi samic, ki v generaciji kotijo.

Brejost po prvi uspešni kopulaciji je pri liniji FLI trajala v povprečju 20,0 dni in pri liniji FHI 20,2 dni. Če je doba med kotitvama daljša (od 38 do 42 dni), je prišlo do ponovne paritve šele po odstavitvi sesajočih mladičev. Pri večini samic tako v analizi podatkov iz reje kot v poskusu ni prišlo do uspešne kopulacije v času poporodnega estrusa.

Samice so pri liniji FLI tekom poskusa skotile v povprečju 1,95 gnezd na paritev in samice linije FHI 2,30 gnezd. Na paritev smo v celotnem trajanju poskusa pri liniji FLI ugotovili 6,7 živorojenih mladičev in pri liniji FHI 9,1 živorojenega mladiča. Na gnezdo je bilo v povprečju živorojenih 3,4 (FLI) oziroma 3,9 mladičev (FHI). Mrtvorojenih mladičev na gnezdo je bilo pri liniji FLI nekoliko več (14,6 %) kot pri liniji FHI (11,3 %). Na gnezdo smo odstavili pri liniji FLI v povprečju 3,2 mladiča in pri liniji FHI 3,8 mladičev. Skupno smo odstavili po samici pri liniji FLI v povprečju 6,3 mladiče in pri liniji FHI 8,8

mladičev. Od rojstva do odstavitve smo pri liniji FLI ugotovili 6,0 % izgub mladičev in pri liniji FHI 3,5 %.

Povprečna masa gnezda (živorojenih mladičev) je bila pri liniji FLI 8,83 g in povprečna masa živorojenega mladiča 1,94 g ter pri liniji FHI 8,52 g in 1,87 g. Med linijama v masi gnezda ni statistično značilnih razlik, so pa statistično značilne razlike med linijama v masi živorojenega mladiča. Ob odstavitvi so bili samci pri liniji FLI težki v povprečju 10,67 g in samice 10,47 g ter pri liniji FHI 9,52 g oziroma 9,19 g. Mase mladičev se ob odstavitvi med linijama statistično razlikujejo. Izrazite statistično značilne razlike med linijama so tudi v telesni masi samic ob prvi kopulaciji (26,7 g pri liniji FLI in 20,5 g pri liniji FHI). Do teh razlik je prišlo tekom razvoja in rasti mladičev po odstavitvi.

Vsi predstavljeni podatki dokazujejo, da je plodnost miši v liniji FLI (fat) slabša od plodnosti miši v liniji FHI (lean). Ugotovili smo, da so monogamne paritve pri obeh linijah ob starosti miši po 60. dnevu za razmnoževanje uspešnejše kot poligamne paritve, ki so jih do sedaj izvajali že po odstavitvi mladičev. Pri tem je najbolje, da razmnoževanje v eni generaciji pri liniji FLI zaključimo že po drugem gnezd in razmnoževanje v liniji FHI po tretjem gnezd.

Rezultati analize plodnostnih parametrov linije FHI in FLI bodo uporabni v nadaljnjih raziskavah, kjer bo potrebno načrtovati večje ali manjše število živali za izvedbo določenega poskusa. Zaradi relativno dobre plodnosti linije FLI v primerjavi z drugimi modeli miši za debelost, je slednja tudi s tega vidika primerna za proučevanje genetskih in okoljskih vplivov na pojav debelosti.

7 VIRI

- Allan M.F., Eisen E.J., Pomp D. 2004. The M16 mouse: An outbred animal model of earlyonset polygenic obesity and diabetes. *Obesity research*, 12, 9: 1397-1407
<http://www.obesityresearch.org/cgi/reprint/12/9/1397> (20. avg. 2007)
- Altman P.L., Dittmer Katz D. 1979. Inbred and genetically defined strains of laboratory animals, Part 1: Mouse and rat. Altman P.L., Dittmer Katz D. (eds.). Maryland, Federation of American Societies for Experimental Biology: 418 str
- Bogovič K. 1981. Spremembe v telesni teži pri laboratrijskih miškah v odvisnosti od reprodukcijskega ciklusa. Diplomsko naloga. Domžale, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, VTOZD za živilnoredjo: 50 str.
- Bradford G.E. 1969. Genetic control of ovulation rate and embryo survival in mice. I. Response to selection. *Genetics*, 61, 4: 905-921
<http://www.genetics.org/cgi/reprint/61/4/905> (25. feb. 2007)
- Bradford G.E. 1971. Growth and reproduction in mice selected for rapid body weight gain. *Genetics*, 69: 499-512
- Brannian J.D., Furman G.M., Diggins M. 2005. Declining fertility in the lethal yellow mouse is related to progressive hyperleptinemia and leptin resistance. *Reproduction nutrition development*, 45, 2: 143-150
<http://www.edpsciences.org/articles/rnd/pdf/2005/02/r5201.pdf?access=ok> (20.avg.2007)
- Bünger L., Hill W.G. 1999. Inbred lines of mice derived from long-term divergent selection on fat content and body weight. *Mammalian genome*, 10: 645-648
- Bünger L., Lewis R.M., Rothschild M.F., Blasco A., Renne U., Simm G. 2005. Relationships between quantitative and reproductive fitness traits in animals. *Philosophical transactions of the Royal Society B*, 360: 1489-1502
- Bünger L., Renne U., Dietl G. 1992. Selection for body weight at 4 days in laboratory micewith and without litter size standardization – Direct response and correlated effects on litter size. *Archives of animal breeding*, 35, 3: 305-319
- Cargill S.L., Medrano J.F., Famula T.R., Anderson G.B. 2000. Effects of high growth (hg) mutation on reproduction in high growth (HG) female mice. *Growth, development and aging*, 64: 21-31
- Cecim M., Kerr J., Bartke A. 1995. Effects of Bovine Growth Hormone (bGH) Transgene Expression or bGH Treatment on Reproductive Functions in female mice. *Biology of reproduction*, 52: 1144-1148
- Crispens C.G. 1975. Handbook on the Laboratory mouse. Illinois, USA, Bannerstone House: 267 str.

- Crispens C.G. Jr. 1979. Reproduction and growth characteristics: mouse. V: Inbreed and genetically defined strains of laboratory animals. Altman P.H., Katz D.D. (eds.). Maryland, Biological handbooks: 45-47
- Cook M.J. 1983. Anatomy. V: The mouse in biomedical research, Volume III: Normative biology, immunology and husbandry. Foster H.L., Small J.D., Fox J.G. (eds.). New York, Academic Press: 101-120
- Diggins M, Cederburg M., Dierke T., Granholm N.H. 2001. Obesity and fertility in the lethal yellow mouse – Does the mutant gene directly affect fertility? Poceedings of the South Dakota Academy of Science, 80: 413 (abstarct)
- Dorsch M.M. 2004. Assisted Reproduction and Cryopreservation V: The Laboratory Mouse. Hedrich H. J., Petrusz P. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 436–448
- Drickamer L.C. 1984. Acceleration of puberty in female mice by a chemosignal from pregnant and lactating females: circadian rhythm effects. Biology of reproduction, 31, 1: 104-108
<http://www.biolreprod.org/cgi/reprint/31/1/104> (20. avg. 2007)
- Duke University and medical center. 2007. Sexing mice. Animal care and use program, Guidelines and suggestions.
http://vet.med.duhs.duke.edu/gudelines_for_sexing_mice.htm (29. okt. 2006)
- Eisen E.J., Durrant B.S. 1980. Genetic and maternal environmental factors influencing litter size and reproductive efficiency in mice. Journal of animal science, 50,3: 428-441
- Engelen van M.A.J., Nielsen M.K., de Riberio A.E.L. 1995. Differences in pup birth weight, pup variability within litters and dam weight of mice selected for alternative criteria to increase litter size. Journal of aminal science, 73: 1948-1953
- Epstein H.T. 1978. The effect of litter size on weight gain in mice. Journal of nutrition, 108: 120-123
<http://jn.nutrition.org/cgi/reprint/108/1/120.pdf> (12. feb. 2007)
- Ewart-Toland A., Mounzih K., Qiu J., Chehab F.F. 1998. Effect of the genetic background on the reproduction of leptin-deficient obese mice. Endocrinology, 140, 2: 732-738
<http://endo.endojournals.org/cgi/reprint/140/2/732> (20. avg. 2007)
- Festing M.F.W. 1976. Effect of marginal malnutrition on the breeding performance of inbred and F1- hybrid mice – A diallel study. V: The laboratory Animal in the Study of Reproduction. 6-th Symposium of the International Committee on Laboratory animals, Thessaloniki, 9 -11 jul. 1975. Antikatzides T., Erichsen S., Spiegel A. (eds.) Gustav Fischer Verlag, New York, Stuttgart: 99-113
- Fowler R.E., Edwards R.G. 1960. The fertility of mice selected for large or small body size. Genetical Research, 1: 393-407

- Gabrovšek M. 1998. Maternalni vpliv na reprodukcijske lastnosti pri laboratorijskih miškah. Diplomsko naloga. Domžale, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 45 str.
- Hardy P. 2004. Gnotobiology and breeding techniques. V: The laboratory mouse. Hedrich H.J., Petrusz P. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 421-433
- Horvat S., Bunger L., Falconer V.M., Mackay P., Bulfield G., Keightley P.D. 2000. Mapping of obesity QTLs in a cross between mouse divergently selected on fat content. *Mammalian genome*, 11, 1: 2-7
- Inglis J.K. 1980. Introduction to Laboratory Animal Science and Technology. Reproduction, Breeding and Heredity. 1st edition. Oxford, Pergamon Press: 156-233
- Jemiolo B., Novotny M. 1993. Long-term effect of urinary chemosignal on reproductive fitness in female mice. *Biology of reproduction*, 48, 4: 96-929
<http://www.biolreprod.org/cgi/reprint/48/4/926> (20. avg. 2007)
- Johnson M.S., Thomson S.C., Speakman J.R. 2001a. Limits to sustained energy intake: I. Lactation in the laboratory mouse *Mus Musculus*. *The journal of experimental biology*, 204, 11: 1925-1935
<http://jeb.biologists.org/cgi/reprint/204/11/1925> (11. sept. 2006)
- Johnson M.S., Thompson S.C., Speakman J.R. 2001b. Limits to sustained energy intake: III. Effects of concurrent pregnancy and lactation in *Mus musculus*. *Journal of experimental biology* 204, 11: 1947-1956
<http://jeb.biologists.org/cgi/reprint/204/11/1947> (14. mar. 2007)
- Land R.B., Falconer D.S. 1969. Genetic studies of ovulation rate in the mouse. *Genetical Research*, 13: 25-46
- Ločniškar F. 1999. Katalog znanj: splošna živinoreja, biološke osnove, genetika z enciklopedičnim opisom pojmov in gesli v slovenščini, angleščini in nemščini. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 250 str.
<http://www.bfro.uni-lj.si/zoo/publikacije/katalogznanj/> (29. avg. 2007)
- Mouse genome informatics-MGI. 2007. Gene symbols and names.
<http://www.informatics.jax.org> (24. avg. 2007)
- Mouse phenome database-MPD. 2007. Reproduction. By subject area.
<http://phenome.jax.org/pub-cgi/phenome/mpdcgi?rtn=docs/home> (24. avg. 2007)
- Nelson R.E., Robison O.W. 1976a. Effect of postnatal litter size on reproduction of female mice. *Journal of animal science*, 42, 4: 824-830
- Orešnik A. 1977. Plodnost laboratorijskih mišk pri obremenitvi z vzporedno laktacijo in ob različni koncentraciji hranljivih snovi v krmi. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo (Živinoreja), 29: 177-193

- Orešnik A. 1979. Značaj standardizacije ishrane za rast i razvoj laboratorijskih životinja. *Veterinaria*, 28, 3: 405-414
- Orešnik A. 1992. Splošna živinoreja. Izbrana poglavja iz reprodukcije domačih živali (sesalcev). *Zapiski predavanj. Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živinorejo*: 96 str.
- Otis A.P., Foster H.L. 1983. Management and design of breeding facilities. V: *The mouse in biomedical research. Volume III: Normative biology, immunology and husbandry.* Foster H.L., Small J.D., Fox. J.G. (eds). New York, Academic Press: 18-34
- Perše M., Rozman D. 2006. Značilnosti in pravila poimenovanja inbridiranih miši. *Veterinarske novice*, 32: 23-29
- Prevoršek Z. 2005. Razvoj kongenih linij za natančnejše kartiranje kvantitativnega lokusa za nalaganje maščevja na kromosomu 15 pri miših. *Diplomsko delo. Domžale, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko*: 78 str.
- Rosenfeld C.H., Grimm K.M., Livingston K.A., Brokman A.M., Lamberson W.E., Roberts R.M. 2003. Striking variation in the sex ratio of pups born to mice according to whether maternal diet is high in fat or carbohydrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 8: 4628-4632
<http://www.pnas.org/cgi/reprint/100/8/4628> (20. avg. 2007)
- Rugh R. 1990. *The Mouse. Its Reproduction and development.* 2nd edition. New York, USA, Oxford University Press: 429 str.
- SAS. 1999-2001. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA
- Sharp G.L., Hill W.G., Robertson A. 1984. Effect of selection on growth, body composition and food intake in mice. Responses in selected traits. *Genetical Research*, 43, 1: 75-92
- Silver L.M. 1995. *Mouse genetics: concepts and application. Reproduction and breeding.* USA, Oxford University Press: 62-75
- Speakman J.R. 2007. The energy cost of reproduction in small rodents. *Acta Theriologica Sinica*, 27, 1: 1-13
<http://www.mammal.cn/chinese/downloadpdf.asp?id=970> (2. apr. 2007)
- Spearow J.L., Bradford G.E. 1983. Genetic variation in spontaneous ovulation rate and LH receptor induction in mice. *Journal of reproduction and fertility*, 69: 59-537
- Suckow M.A., Danneman P., Brayton C. 2001. *Laboratory animal pocket reference series. The laboratory mouse.* New York, USA, CRC Press: 168 str.

- Vanderberg J.G., Huggett C.L. 1994. Mother's prior intruterine position affects the sex ratio of her offspring in house mice. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America. Population biology*, 91, 3: 11055-11059
<http://www.pnas.org/cgi/reprint/91/23/11055> (28. jun. 2007)
- Whittingham D.G., Wood M.J. 1983. *Reproductive Physiology. V: The mouse in biomedical research. Volume III: Normative biology, immunology and husbandry.* Foster H.L., Small J.D., Fox J.G. (eds.). New York, Academic Press: 137-164

ZAHVALA

Diplomska naloga je nastajala ob pomoči številnih nasvetov.

Zahvaljujem se najprej mentorju prof. dr. Andreju Orešniku, ki mi je s strokovnimi nasveti in praktičnimi pogledi svetoval pri oblikovanju in izdelavi naloge.

Izredna hvala gre tudi somentorju prof. dr. Simonu Horvatu za pomoč pri zastavitvi poskusa, za usmerjanje s strokovnimi nasveti pri izdelavi naloge in za temeljit pregled vsebine.

Hvala doc. dr. Tatjani Pirman za recenzuro naloge in nasvete za izboljšavo teksta.

Hvala sodelavcem: mlademu raziskovalcu Matjažu Simončiču in asis. dr. Heleni Motaln za pomoč pri izvedbi poskusa ter mladi raziskovalki Zali Prevoršek za spodbudo in praktične nasvete. Hvala tudi tehničnima sodelavkama Vidi Štuhec in Simoni Salmič, ki sta mi priskočili na pomoč na delovnem mestu.

Hvala staršema za duhovno in denarno podporo v kriznih trenutkih ter sestri in bratoma za spodbudne besede.

Hvala vsem, ki ste kakorkoli z nasveti, spodbudo ali zabavnimi trenutki, sodelovali pri nastajanju naloge.

Nazadnje pa hvala mojemu Iztoku, ki me je vedno spodbujal, mi pomagal in bil potrpežljiv zaradi mojih številnih ur sedenja za strokovnim gradivom in računalnikom.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Ana ZANJKOVIČ

**PLODNOST LABORATORIJSKIH MIŠI PRI
SELEKCIONIRANIH LINIJAH ODBRANIH NA
VEČJI OZIROMA MANJŠI DELEŽ TELESNIH
MAŠČOB**

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007