

Feromoninnehållande substansers inverkan på hjärtfrekvensen hos tjur

Erik Jergil

**Handledare: Lennart Söderquist
Biträdande handledare: Renée Båge
och Kristina Nordéus
Avdelningen för Reproduktion
Institutionen för Kliniska vetenskaper**

Innehållsförteckning

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Feromoner	3
Syfte	4
Litteraturoversikt	4
Brunstcykeln hos nöt	4
Tjurars parningsbeteende	5
Material och Metoder	6
Insamling av substanser	6
Försöket	7
Resultat	9
Diskussion	11
Konklusion	13
Tack	14
Litteraturförteckning	15
Appendix	17

SAMMANFATTNING

Den ökade mjölkproduktionen per ko, som skett under de senaste 50 åren, har samtidigt följts av en försämrad reproduktion. Kortare och otydligare brunster leder till att det blir svårare för Sveriges bönder att upptäcka kornas brunster. Ett behov av att kunna styra reproduktionen föreligger. Möjligen skulle användandet av feromoner kunna tillgodose detta behov. Dock krävs ett snabbt och enkelt *in vivo*-test för identifiering av feromoninnehållande substanser.

Syftet med den här studien var att undersöka huruvida hjärtfrekvensen hos tjurar går att använda som indikator för snabb identifiering av feromoner i kroppsvätskor.

Två tjurar exponerades för substanserna brunstslem och -urin, lutealfasurin, tjururin samt vatten under tiominutersintervall. Exponeringen gick till på så sätt att varje tjur fick ha en kassett innehållande en tampong, med substansen i fråga, fäst till dess nosring. Mellan varje exponering fick tjurarna ha på sig en tomkassett med enbart en tampong i. Under varje exponering mättes och registrerades respektive tjurs hjärtfrekvens var femte sekund. Under exponeringstiden noterades även, av hela tiden närvarande försökspersonal, tjurarnas beteende avseende flehmen, utskaftning, sekretion samt urinering.

Exponering för brunstslem uppvisade i jämförelse med övriga substanser, som en helhet, en ökad spridning i hjärtfrekvens ($p < 0,05$), som kunde härledas till första exponeringsminuten ($p = 0,001$). Under denna minut var även medelpulsen högre ($p < 0,05$) för brunstslem än för övriga substanser. Dock kunde ingen signifikant skillnad i medelpuls eller spridning (per minut) ses mellan de olika testade substanserna. Den statistiskt signifikanta puls- och spridningsstegring, som sågs under första minuten vid exponering för brunstslem jämfört med exponering för de övriga substanserna, indikerar likväl en tydlig reaktion för brunstslem. Att de båda försökstjurarna får anses sexuellt oerfarna, eftersom de inte träffat några hondjur sedan de blivit köns mogna, har sannolikt påverkat de resultat som erhöles.

Under försökets gång skaftade tjur A ut 11 gånger och tjur B två gånger. Under merparten av dessa utskaftningar sågs enbart en liten del av penisspetsen. Dock uppvisade tjur A under dag 2 en knappt två minuter lång utskaftning där en stor del av penis exponerades, detta skedde under en period med tomkassett. Utskaftningarna under försöket skedde till synes helt slumpmässigt, möjligen något oftare vid exponering med tjururin. Emellertid är antalet gånger utskaftningar kunde noteras så få att ingen definitiv slutsats går att dra av detta beteende.

Flehmenbeteende skedde vid ett tillfälle. Dock var detta endast en tendens till flehmen, där överläppen rynkades och drogs upp i mycket ringa grad. Detta skedde under exponering för substansen lutealfasurin. Möjligen kan nosringen med dess kassett ha interfererat med förmågan eller viljan att visa flehmenbeteende. Detta skulle i så fall delvis förklara varför tjurarna inte uppvisade flehmenbeteende.

Den reaktion på brunstslem som sågs under första minuten tyder på att tjurarna reagerar på feromoninnehållande substanser. Dock sågs ingen signifikant skillnad mellan de olika substanserna, vilket indikerar att hjärtfrekvensen hos tjur inte kan användas som indikator för snabb identifiering av feromoner i potentiellt feromoninnehållande substanser.

SUMMARY

During the last 50 years the production of milk per cow has increased. This has, however, been followed by a decreased reproductive performance. Shorter and more indistinct signs of oestrus make it harder for the Swedish farmers to discover when the cows are in oestrus. There is a need for ways to control reproduction. The use of pheromones could possibly provide means to satisfy this need. However, this requires a fast and simple *in vivo*-method for identification of substances containing pheromones.

The aim of this study was to investigate whether a change in the heart rate of bulls is possible to use as an indicator, a so-called bioassay, for fast identification of pheromones in body fluids.

Two bulls were exposed to the following substances; oestrus mucus and -urine, luteal phase urine, bull urine and water, during intervals of ten minutes. During the exposures each bull had a cassette containing a tampon, with the substance in question, attached to their nose rings. Between every exposure a blank cassette containing only a tampon without substance was attached to the nose rings. During the exposures the heart rates of the bulls were recorded and registered every fifth second. Meanwhile the behaviour of the bulls, with regard to flehmen, erection, secretion and urination, was continuously recorded.

The substance oestrus mucus showed, in comparison with the rest of the substances as a whole, an increased standard deviation in heart rate ($p < 0,05$) that was found during the first minute of exposure ($p = 0,001$). During this minute, also the mean heart rate was higher ($p < 0,05$) than for the other substances. There was however no significant difference in mean heart rate or deviation (per minute) between the tested substances. The statistically significant increase in heart rate- and deviation during the first minute of exposure for oestrus mucus, compared to exposure for the others, however, clearly indicates a reaction for oestrus mucus. The fact that the two bulls were sexually inexperienced since they had not met any females since before onset of puberty, has likely had effect on the results.

During the study, bull A had erection eleven times and bull B twice. During the majority of these erections only a small part of the penis was detectable. However, during the second day bull A showed a nearly 2 minute's long erection where a large part of penis was exposed. This happened during exposure for a blank cassette. The erections during the study tended to happen randomly, but maybe slightly more often when exposed to bull urine. However, the number of occasions where erections was recorded is so small that no definitive conclusion is possible to draw from this behaviour.

Flehmen display occurred only at one occasion. This was however only a tendency for flehmen, where the upper lip was wrinkled and drawn upwards only to a very small extent. This happened during exposure to luteal phase urine. Possibly the nose ring with the cassette could have interfered with the ability or the will to show flehmen. This might thus explain why the bulls did not show flehmen behaviour.

The reaction to oestrus mucus during the first minute indicates that the bulls react to pheromone-containing substances. There were, however, no significant difference between the tested substances which indicate that the heart rate of bulls not can be used as an indicator for fast identification of pheromones in body fluids.

INLEDNING

Den producerade mjölmängden per ko har de senaste 50 åren ökat stadigt på grund av en förbättrad djurhållning, bättre foderstater samt intensiv avel (Lucy, 2001). Trenden går hela tiden mot större besättningar med allt fler kor per besättning. För 20 år sedan var den genomsnittliga besättningsstorleken knappt 20 kor mot dagens genomsnitt på drygt 50 kor (Svensk Mjolk, 2008). Den ökade mjölkproduktionen per ko och de allt större besättningarna har associerats med en nedsatt fruktsamhet (Lucy, 2001; Royal *et al.*, 2002; Berry *et al.*, 2003). Lopez *et al.*, (2003) visade i en studie att högmjolkande kor, trots större follikeldiameter, hade en lägre koncentration östrogen i blodet samt kortare brunster jämfört med kor som mjölkade mindre.

I Sverige används idag nästan uteslutande artificiell insemination i mjölkdjursbesättningar. Detta ställer stora krav på djurägarna vad gäller förmågan att upptäcka brunster. Med kortare brunster ökar risken att missa dessa. Varje missad brunst medför en ekonomisk förlust för djurägaren. I många länder använder man hormoner för att brunstsynkronisera djuren. På så sätt får djurägaren lättare att förutsäga ungefärlig tidpunkt för brunst och därmed lättare att upptäcka den. I Sverige har man dock inom Svensk Mjolk fattat ett policybeslut mot rutinmässig användning av hormoner för reglering av kornas reproduktion. Önskan/behovet av brunstsynkronisering kvarstår dock.

Feromoner

Inom insektsvärlden är det vanligt att de olika könen attraherar varandra med hjälp av doftämnen, så kallade feromoner. Vanligtvis är det honan som avger doftämnet varvid hanar av samma art attraheras (Campbell *et al.*, 2003). Man har visat att hanarna bland annat reagerar med en förändrad hjärtfrekvens när de utsätts för doftämnen från honor av samma art (Angioy *et al.*, 2003).

Man skiljer mellan sk *releaser-* och *primerferomoner*. Releaserferomoner har en omedelbar effekt på mottagardjuret; såsom stimulering av sexuellt beteende, till exempel inducering av ståreflex hos suggor, eller som ovan nämnts en omedelbar förändring i hjärtaktivitet. Primerferomoner å andra sidan påverkar mottagardjuret på längre sikt, till exempel genom stimulering av spermieproduktion eller förändringar i menstruationscykeln hos kvinnor eller brunstcykeln hos djur (Wyatt, 2003).

Hos gris är det känt att närvaron av en galt ändrar saggans reproduktionscykel på så sätt att inträdet i puberteten samt återgången till cyklicitet efter grisning sker tidigare. Den stimulatoriska effekten av närvaron av galt kan förklaras med en stimulatorisk effekt på hypofysens utsöndring av LH. Galten påverkar med doftämnen saggan att utsöndra hormoner och neuropeptider, som reglerar LH-utsöndringen (Kemp, 2005).

Även hos får finns en effekt på hondjurens reproduktionsmönster av närvaron av handjur, den så kallade ”baggeffekten”. En plötslig introduktion av baggar till anöstrala tackor, före den naturliga brunstsäsongen, inducerar en synkroniserad första brunst hos en stor del av tackorna samt ger en tidigare början på brunstsäsongen. Huvudmediatorer för baggeffekten är feromoner från baggars ull och vax men enligt vissa forskare krävs även fysisk kontakt (Korjonen, 1997).

Hos kor av kötttras har man sett att närvaron av tjur kan förkorta den anöstrala postpartumperioden innan brunstens igångsättande (Zalesky *et al.*, 1984; Custer *et al.*, 1990;

Fernandez *et al.*, 1993). Dock fann Shipka (1998) i ett försök, att högproducerande mjölkkor i stället fick en *förlängd* anöstral postpartumperiod vid exponering för tjur.

Flera studier visar att doftämnen från brunstiga kor intresserar tjurar. Sankar *et al.* (2004) testade till exempel i ett försök att gnida in genitalregionen på kor, som var i lutealfas, med olika kroppssubstanser (vaginalslem, saliv, faeces och mjölk) från kor i proöstrus, östrus och diöstrus. Därefter lät man tjurar lukta på dessa kor och registrerade tjurarnas beteende vad gäller flehmen, utskaftning, upphopp samt betäckningsförsök. Man visade i försöket att tjurarna flehmade signifikant mer mot östrusdoftämnen än mot övriga substanser, samt att de flehmade som mest vid exponering av brunstslem. I en annan studie visade tjurar flehmenbeteende mot brunstslem som presenterades på ett fat (Klemm *et al.*, 1987).

I en pilotstudie har Nordéus (2007) tidigare undersökt huruvida kvigor reagerar med ökad hjärtfrekvens vid exponering för potentiellt feromoninnehållande substanser. Nordéus fann dock inte några säkra tecken på att så var fallet. Emellertid sågs en tendens till brunstsynkronisering hos de två försökskvigorna under försökets gång. Detta kan tyda på interaktioner med feromoner mellan de båda kvigorna.

Syfte

Om potenta feromoner kan isoleras och identifieras från antingen han- eller hondjur skulle en ny metod för stimulering och kontroll av brunstcykeln hos kor och kvigor eventuellt kunna utvecklas. Dessutom skulle olfaktoriska redskap för upptäckande av optimal inseminationstid möjligen kunna framställas. Samtidigt krävs ett enkelt *in vivo*-test för snabb identifiering av feromoninnehållande substanser, istället för dagens tidskrävande metoder.

Syftet med denna studie är att undersöka huruvida hjärtfrekvensen hos tjurar går att använda som indikator för snabb identifiering av feromoner i potentiellt feromoninnehållande substanser.

LITTERATURÖVERSIKT

Brunstcykeln hos nöt

Brunstcykelns längd hos kvigor är mellan 18 och 22 dagar och hos kor 18-24 dagar (Noakes *et al.*, 2001). Man delar in brunsten i fyra delar; förbrunst (proöstrus), brunst (östrus), efterbrunst (metöstrus) samt lutealfas (diöstrus).

Förbrunsten kännetecknas av en ökad aktivitet i reproduktionsorganen. Den dominanta follikeln växer till allt mer, samtidigt som den förra brunstcykelns gulkropp minskar i storlek. Körtlar i endometriet visar en ökad sekretorisk aktivitet varvid förbrunstflytningar kan ses hos en del djur (Noakes *et al.*, 2001).

Under brunsten ökar körtlar i uterus, cervix och vagina sin produktion av slem (Noakes *et al.*, 2001). Slemmet blir under brunsten mindre visköst och mer klart och kan ibland ses hänga ut som en sträng från vulva (Hafez 1993). Traditionellt säger man att brunsten hos kor varar i 15 timmar, dock finns det stora individuella variationer, varför brunstens längd kan variera mellan 2 och 30 timmar (Noakes *et al.*, 2001).

Under efterbrunsten sker ovulationen och den ovulerade follikeln luteiniseras till en gulkropp.

Lutealfasen är perioden då gulkroppen är den funktionellt dominerande strukturen i äggstockarna. Gulkroppen avger höga koncentrationer av progesteron. De uterina körtlarna genomgår hypertrofi och hyperplasi, cervix blir trängre och genitalsekretet blir sparsamt och klabbigt (Noakes *et al.*, 2001).

Tjurars parningsbeteende

Handjurs könsdrift (libido) beror på androgena steroidhormoner, som påverkar både parningsvillighet och aggressivt beteende men även upprätthåller det hanliga reproduktionssystemets funktion. Tjurraser med ett mer aggressivt beteende och som snabbare reagerar på kor i östrus tenderar att ha högre koncentrationer av testosteron än mer flegmatiska raser (Noakes *et al.*, 2001).

Hos många arter avger hondjur i östrus feromoner för att attrahera handjur, medan andra arters hondjur uppvisar ett homosexuellt beteende för att attrahera handjuren (Noakes *et al.*, 2001). Hos nötkreatur är det framför allt visuella stimuli som attraherar tjuren (Noakes *et al.*, 2001, Hafez 1993), men även feromoner spelar en stor roll i tjurarnas östrusdetektion (Rivard *et al.*, 1989).

När tjurarna ska undersöka om en ko är brunstig luktar de i perinealregionen på hondjuren. Om kon då är i östrus induceras ett så kallat flehmenbeteende (Figur 1a och 1b), där tjuren höjer huvudet och lyfter överläppen (Noakes *et al.*, 2001).



Figur 1a. Flehmenbeteende uppvisat av kviga. Foto: Renée Båge. 1b. Flehmande bagge. Foto: Lennart Söderquist

I ett försök från 1989 (Rivard *et al.*) presenterades slem och serum från brunstiga kor för ett antal tjurar. Man identifierade då ett mer eller mindre stereotypt beteende där tjurarna svarade på ett likartat sätt på substanserna. Uppdelat i tre olika faser, *attraktion*, *detektion* och *sexuell förberedelse*, reagerade tjurarna, med vissa undantag, enligt följande:

Attraktion: Vänder huvudet mot provet, luktar på avstånd, attraheras, luktar nära provet och saliverar. Härefter urinerade tjurarna ibland.

Detektion: Slickar på provet, manipulering med tungan (med detta menar man att tjurarna trycker med tungan mot hårda gommen och/eller slickar i nosen el dyl), hypersalivering och flehmen. En del av tjurarna råmade också.

Sexuell förberedelse: Utskaftning, sekretion från penis, stångande och upphopp.

Efter att tjuren detekterat brunst hos en ko orienterar han sig så att han står bakom kon och trycker hakan mot kons bakdel. Kor i östrus reagerar på trycket mot bakkdelen genom att stå still (Hafez, 1993), så kallad ståreflex.

Själva parningsakten hos nöt är kort, mindre än fem sekunder. När den delvis utskaftade penis börjar droppa av sekret från de accessoriska könskörtlarna gör tjuren sitt upphopp på kon. När penis penetrerar vagina kontraheras tjurens bukmuskler kraftigt varvid maximal penetration samt ejakulation sker. Kraften från muskelkontraktionen lyfter tjurens bakben från underlaget i ett hopp framåt, vanligen kallat "stöt" (Hafez, 1993).

MATERIAL OCH METODER

Insamling av substanser

Brunstslem och -urin samlades från sinkor installerade på Institutionen för Kliniska Vetenskaper, Avdelningen för Idisslarmedicin och epidemiologi. Förekomst av aktiv gulkropp bekräftades med rektalt ultraljud innan brunst inducerades genom injektion med 2 ml syntetisk prostaglandin $F_{2\alpha}$ -analog (Estrumat[®]vet., 0,25 mg/ml cloprostenol, Schering-Plough AB, Stockholm, Sverige). Brunst bedömdes med ledning av yttre brunstsymptom, samt med hjälp av rektal ultraljudsundersökning (förekomst av follikel 12 mm eller större). Brunstslem samlades med specialgjorda tamponger av gasväv och bomullssnöre (Figur 2), införda med hjälp av spekulum till främre vagina där de fick sitta i minst en timme. Tampongerna med brunstslem placerades i förslutna plastburkar och infrystes, inom cirka en timme efter samling, till -20°C . Samling av brunstslem pågick tills det med ultraljud bedömdes att follikeln ovulerat. Enbart substanser samlade från tidigast två dagar före ovulation fram till ovulation användes i försöket.

Brunsturin (provocerad urinerings) samlades i öppna kärl från två av korna, poolades och fördelades i 10 ml engångssprutor samt frystes till -20°C .



Figur 2. Tampong för insamling av brunstslem. Foto: Kristina Nordéus.

Från fyra kor på Avdelningen för Idisslarmedicin, som genom rektalisering konstaterats ha en aktiv gulkropp, insamlades även lutealfasurin i öppna kärl. Urinproverna poolades två och två och infrystes därefter i volymer om 10 ml i engångssprutor.

Tjururin samlades i öppet kärl från de båda försökstjurarna (se nedan). Urinen poolades och frystes vid -20°C . Innan försöket igångsättande poolades tjururinet med urin insamlat våren 2006 från en 2 år gammal tjur av rasen Charolais. Tjuren tilhörde Karl-Eriks Charolais Avel & Kött och stod uppstallad på Qvallsta säteri. Urinproverna har sedan insamling förvarats i förslutna engångsprutor vid -20°C .

Försöket

Två tjurar av SRB-ras, 17 månader respektive 19 månader gamla, i normalkondition (ca 490 respektive 580 kg) användes vid försöket. Tjurarna kom från Viking Genetics avelsstation i Falkenberg och hade, enligt uppgift, ett gott libido. Dock har tjurarna sedan cirka ett halvt års ålder endast träffat andra handjur.

Tjurarna var installade, uppbundna och utfodrade enligt rekommendationer på Institutionen för Kliniska Vetenskaper, Avdelningen för Reproduktion. De gavs en tillvänjningsperiod, vad gäller stall, stallpersonal, stallrutiner samt försökspersonal, på drygt två veckor innan försökets igångsättande.

Inför försöket utrustades tjurarna med pulsmätare från Polar (Polar heart rate monitors S610 respektive S610i, Polar electro Oy, Kempele, Finland). Pulsmätarnas elektroder var fastsydda i gjordar som spändes runt tjurarnas bröstorg med elektrodernas placering uppe vid manken samt nere vid hjärtat på vänster sida. För att få bättre överledning rakades och fuktades huden med ultraljudsgel under elektroderna (Figur 3).



Figur 3. En av försökstjurarna utrustad med gjord med pulsmätare. Foto: Erik Jergil.

Gjordar med pulsklockor samt tomma kassetter sattes på tjurarna minst en timme innan varje försök. Detta för att minska risken att dessa skulle påverka djurens beteenden och hjärtfrekvenser på grund av eventuell stress med nyintroducerade föremål.

De frysta substanserna (brunstslem, brunst- och lutealfasurin från ko samt tjururin) tinades före försöket under 30 minuter i vattenbad vid 38°C . Därefter förvarades substanserna och vatten i frigitlådor för värmeållning fram till användning. Under försökets gång hanterades

substanserna i stallgången direkt utanför stallet med stängd dörr. Precis före varje exponering placerades tamponger med aktuell substans i kassetter tillverkade av plastburkar med snäpplock (Figur 4a). I respektive burk placerades, förutom aktuell substans, en mycket kraftig magnet (Figur 4b). Under exponeringen fästes dessa burkar med hjälp av magneten till tjurarnas nosringar.



Figur 4a. Tampong placerad i kassetten. 4b. Tampong samt magnet (till höger i burken) placerade i kassett (bild tagen uppifrån). Foto: Lennart Söderquist.

Exponering för substanserna skedde, enligt ett i förväg utarbetat schema (Tabell 1), där tjurarna exponerades för respektive substans under tiominutersperioder. Mellan varje försökssubstans gavs ett pausintervall på tio minuter. Under denna tid exponerades tjurarna för tomkassetter, som endast innehöll en tampong utan substans. Detta gjordes för att tjurarna skulle ha en paus mellan varje substans så att eventuella effekter av föregående substans skulle hinna avta, samt för att den registrerade hjärtfrekvensen vid tomkassetsexponeringarna skulle kunna användas som kontroll. Samma tampong till respektive tjurs tomkassett användes vid varje tomkassetsexponering för varje försöksomgång. Under pausen, efter försöksomgångens slut, byttes tampongerna i tomkassetterna till nya tamponger inför eftermiddagens exponeringar.

Tabell 1. Exponeringsschema för de olika substanserna

Förmiddag		Eftermiddag	
Tid (minuter)	Substans	Tid (minuter)	Substans
0	Tjururin	0	Brunstslem
10	Tomkassett	10	Tomkassett
20	Kourin (lutealfas)	20	Kourin (brunst)
30	Tomkassett	30	Tomkassett
40	vatten	40	Vatten
50	Tomkassett	50	Tomkassett
60	Kourin (brunst)	60	Kourin (lutealfas)
70	Tomkassett	70	Tomkassett
80	Brunstslem	80	Tjururin

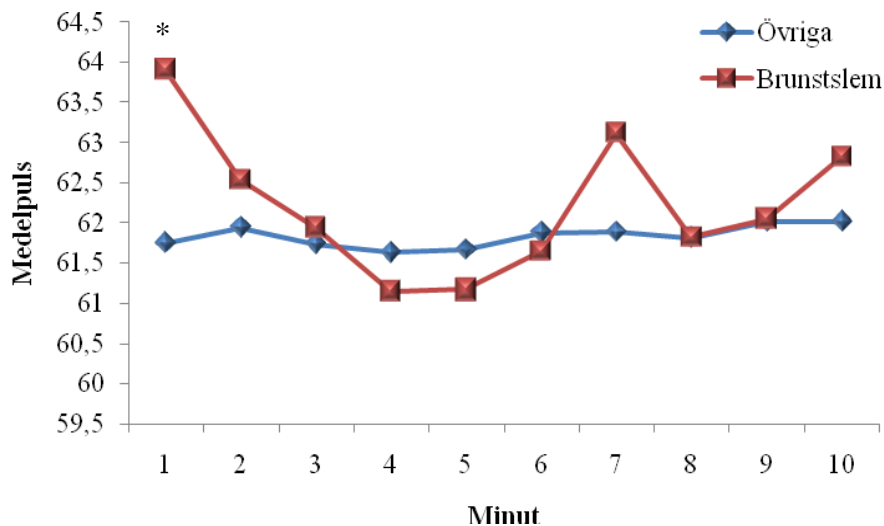
Efter halva omgången (ca 90 minuter) togs en timmes paus, då tjurarna vattnades och utfodrades.

Under hela försöket noterades, av hela tiden närvarande försökspersonal, tjurarnas beteende avseende; flehmen, utskäftning, sekretion samt urinering.

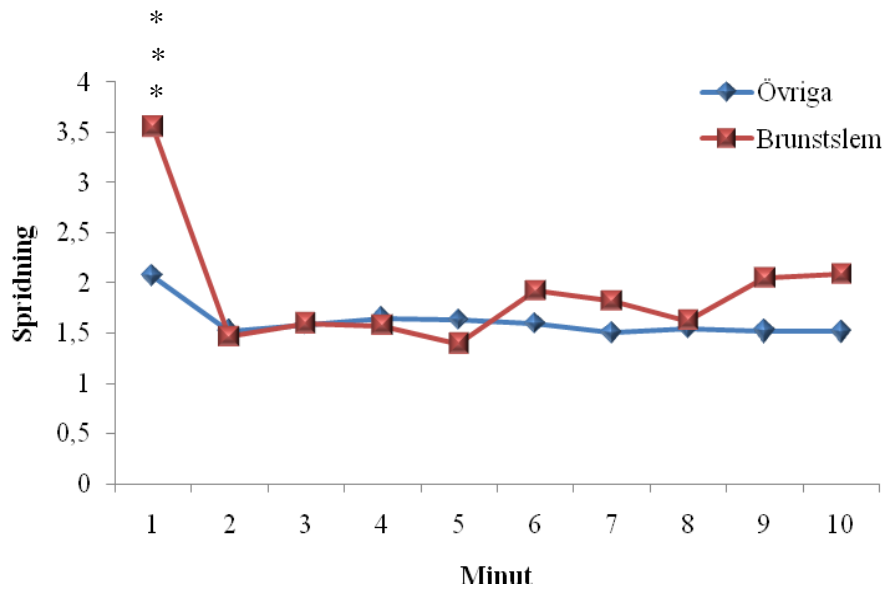
Eftersom det i tidigare studier visat sig att hjärtfrekvensen hos nöt påverkas av huruvida de ligger eller står (Nordéus 2007) tilläts inte tjurarna att lägga sig under försökets gång.

RESULTAT

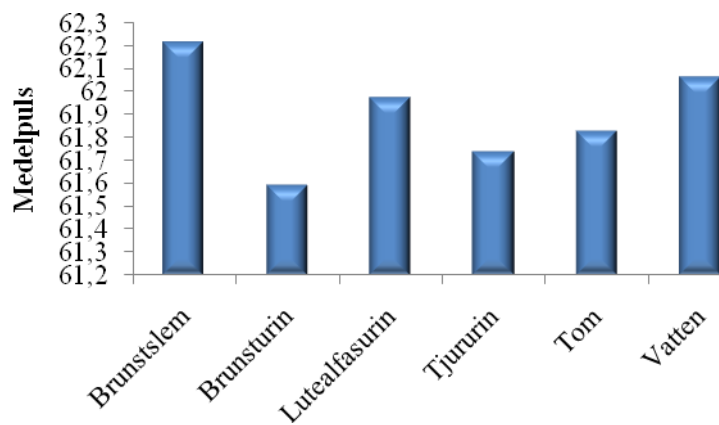
Exponering för brunstslem uppvisade i en jämförelse med de övriga substanserna som en helhet (Figur 6), en ökad spridning i hjärtfrekvens ($p < 0,05$), som kunde härledas till första exponeringsminuten ($p = 0,001$). Under denna första minut var även medelpulsen signifikant högre ($p < 0,05$) för brunstslem än för övriga substanser (Figur 5). Dock kunde ingen signifikant skillnad i medelpuls eller spridning (per minut) ses individuellt mellan de olika testade substanserna (Figur 7 och 8).



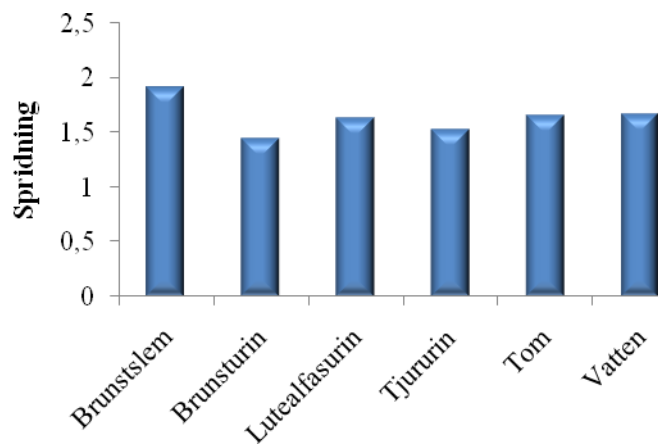
Figur 5. Medelpulsen för varje minut vid exponering för brunstslem respektive övriga substanser.
* $p < 0,05$



Figur 6. Spridningen i hjärtfrekvens för varje minut vid exponering för brunstslem respektive övriga substanser. *** $p=0,001$.



Figur 7. Medelpulsen för respektive substans.



Figur 8. Spridningen för respektive substans.

Spridningen i puls påverkades av tiden från byte av substans ($p < 0,001$) och var, oberoende av substans, större under första minuten, jämfört med resterande 9 minuter. För medelpuls förelåg dock ingen signifikant inverkan av tidsförloppet.

Medelpulsen och spridningen mellan de båda tjurarna skilde sig så till vida att tjur B hade en signifikant högre medelpuls och större spridning jämfört med tjur A ($p < 0,001$). Även tidpunkten på dagen (förmiddag/eftermiddag) hade effekt på tjurarnas puls. Både frekvens och spridning var signifikant lägre under de delar av försöket som utfördes på eftermiddagen ($p < 0,001$ respektive $p < 0,01$).

Både puls och spridning varierade även beroende på dag i försöket ($p < 0,001$). Högst puls observerades för dag 2 (1 oktober), medan högsta spridningen observerades för dag 1 och 2 (29 september respektive 1 oktober).

Tjurarna skaftade ut totalt 13 gånger under försökets gång (Tabell 2). Tjur A stod för 11 av dessa utskaftningar och tjur B för 2. Vid merparten av dessa utskaftningar sågs endast en liten bit av penisspetsen under en kort tid. Dock uppvisade tjur A under dag 2 en knappt 2 minuter lång utskaftning där en stor del av penis exponerades. Utskaftningen skedde under en period med tomkassett (Appendix).

Flehmenbeteende skedde vid ett tillfälle. Dock var detta endast en tendens till flehmen, där överläppen rynkades och drogs upp i mycket ringa grad. Detta skedde under exponering för substansen lutealfasurin (Tabell 2 och Appendix).

Tabell 2. Antal gånger de två tjurarna skaftade ut eller visade flehmenbeteende för de olika exponeringssubstanserna

	Tjur A		Tjur B	
	Utskaftning	Flehmen	Utskaftning	Flehmen
Tomkassett	5	-	1	-
Tjururin	5	-	-	-
Kourin (lutelfas)	-	1	1	-
Vatten	1	-	-	-
Kourin (brunst)	-	-	-	-
Brunstslem	-	-	-	-

DISKUSSION

Syftet med denna studie var att undersöka huruvida hjärtfrekvensen hos tjurar går att använda som indikator för snabb identifiering av feromoner i kroppsvätskor.

Ingen statistiskt signifikant skillnad sågs mellan de testade substansernas påverkan på medelpulsen under de 10 minuter tjurarna exponerades för respektive substans. Man bör dock ha i åtanke att de båda försökstjurarna inte träffat hondjur sedan före inträdet i puberteten och därmed sannolikt inte förknippar de potentiellt feromoninnehållande substanserna med något

sexuellt, som de kanske skulle ha gjort om de också haft sexuell erfarenhet av betäckning av hondjur.

Man har i beteendestudier på andra djurslag sett att reaktionen på feromoner till vissa delar är genetiskt betingad, men att även huruvida djuret i fråga förknippar lukten med tidigare erfarenheter spelar en stor roll. Man har till exempel i ett försök visat att ingen av de hingstar utan sexuell erfarenhet, som ingick i försöket, reagerade sexuellt på en utplacerad *dummy* (attrapp). Av äldre hingstar med sexuell erfarenhet reagerade å andra sidan 78 % av dessa på nämnd *dummy*. Efter att man har sprayat attrappen med urin från ett brunstigt sto, ökade andelen sexuellt oerfarna hingstar som reagerade sexuellt på *dummin* från 0 % till 37 %. Vid exponering för ett sto reagerade 100 % av de erfarna hingstarna sexuellt, medan enbart 78 % av de oerfarna hingstarna reagerade på stoet (Hafez *et al.* 2000).

Vidare diskuterar Martínez-García *et al.* (2008) i en litteraturstudie om samspelet mellan genetiskt betingade reaktioner hos möss på ett feromon och reaktioner på feromonet om mössen har erfarenhet av det. Mössen reagerar på doftämnen från möss av samma eller motsatt kön på ett stereotypt sätt, men reaktionerna moduleras med erfarenhet av luktämnet i fråga.

Vid tidigare försök med feromoninnehållande substanser har tjurar visat flehmenbeteende samt utskäftning (Sankar *et al.* 2004, Klemm 1987, Hradecký 1987). I dessa försök har det rört sig om tjurar med sexuell erfarenhet. Att de två tjurarna i detta försök inte reagerade med flehmenbeteende och utskäftning i betydande grad kan indikera att deras avsaknad av sexuella erfarenheter och brist på kontakt med hondjur sannolikt kan ha påverkat resultatet i försöket.

Det kan inte uteslutas att en psykisk eller fysisk påverkan på tjurarna av annat än de exponerade substanserna kan ha maskerat en eventuell hjärtfrekvensstegring under försökets gång. Till exempel påverkas tjurarnas hjärtfrekvens sannolikt av huruvida de idisslar, är hungriga eller mätta, störs av ljud eller av försökspersonals närvaro o dyl. I största mån försökte vi minimera sådana övriga ovidkommande stimuli under försökets gång, men dessa gick tyvärr inte helt att eliminera.

Den statistiskt signifikanta puls- och spridningsstegring, som sågs under den första minuten vid exponering för brunstslem, jämfört med exponering för de övriga substanserna, indikerar likväl en tydlig reaktion för brunstslem. Att den ökade pulsen och spridningen enbart skedde under första minuten kan bero på att doftämnena är volatila och därmed snabbt mattas av. Det kan också bero på att den ökade pulsen är en snabb omedelbar fysisk reaktion på doften och att tjurarna efter första minuten blir ”mätta” på doftämnet. Möjligen kan detta också indikera att de sexuellt oerfarna tjurarna reagerar på doften, men att de på grund av bristande erfarenhet av hondjur inte kan associera den med någon specifik händelse, varvid reaktionen snabbt avtar.

För alla substanser uppvisades en ökad spridning av pulsen under första minuten. Detta kan vara en reaktion på att djuren stressas något vid kassetbytet. Att medelpulsen inte är högre tyder dock på att stressreaktionen inte är alltför betydande. I tidigare nämnt försök gjort på kvigor av Nordéus (2007) sågs en tydlig hjärtfrekvensstegring under första minuten. Detta tolkades som en effekt av stress på grund av kassetbytet och det antogs att detta skulle kunna dölja en eventuell verklig effekt av substanserna i det försöket. I tjuvförsöket sågs inte en liknande pulsstegring för samtliga substanser under första minuten, som i Nordéus försök. Att då pulsen, enbart vid exponering för brunstslem, var högre under första minuten jämfört med

övriga kan tolkas som att ökningen inte orsakades av stress, utan snarare var en effekt av just substansen i fråga.

Tjur B uppvisade en generellt högre medelpuls och spridning än tjur A. Detta kan bero på en nervösare läggning hos tjur B. Denna nervositet kunde även uppfattas rent subjektivt, då denna tjur redan innan försöket reagerade mer på försökspersonalens närvaro.

Att tjurarnas hjärtfrekvens visade sig vara lägre under eftermiddagen jämfört med förmiddagen kan sannolikt förklaras av bland annat en tillvänjning vid försökspersonalens närvaro. Tjurarna skulle då kunna tänkas uppleva en form av så kallad "novel effect" under förmiddagen (alltså påverkan av nyintroducerat föremål, i detta fall försökspersonalen), som sedan under eftermiddagen avtagit. Man har tidigare sett att nöt tenderar att ha, i motsats till vad de två tjurarna uppvisade, den lägsta hjärtfrekvensen under tidig morgon för att sedan öka och bli som högst under kvällstimmar (Koelsch 1992). Även studier på människa visar på en lägre hjärtfrekvens på förmiddagen än på eftermiddagen. Tidigt på morgonen har människa som lägst hjärtfrekvens för att sedan öka under förmiddagen och nå sin topp någon gång under eftermiddagstimmar och därefter minska under kvällen och natten (Vandewalle *et al.*, 2006). Detta kan möjligen styrka att det rör sig om en "novel effect" snarare än en normal fysiologisk dygnsvariation.

Att medelpuls och spridning varierade beroende på dag i försöket, där högst puls uppvisades för dag 2 och högst spridning för dag 1 och 2, kan för närvarande inte förklaras. Tjurarna utsattes under dessa dagar inte för störningar i större omfattning från omgivningen och tjurarna försökte inte heller lägga sig fler gånger, än under dag 3.

Man har tidigare sett att de flesta däggdjur får erektion i genomsnitt var 90:e minut dygnet runt (Söderquist, personligt meddelande), således skulle varje tjur i genomsnitt ha skaftat ut cirka 6 gånger under försökets sammanlagt 9 timmar. Utskaftningen som noterades under försöket var dock till synes helt slumpmässig och kunde inte korreleras till exponeringen av en viss substans. Möjligen skedde det något oftare vid exponering av tjururin. Vidare var de flesta "utskaftningarna" under försökets gång endast tillfälliga då en mindre del av penis kunde observeras. Emellertid är antalet gånger utskaftningar kunde noteras så litet att ingen definitiv slutsats går att dra av detta beteende.

Vad gäller flehmenbeteende så skedde det endast vid ett tillfälle och var då enbart en eventuell tendens till flehmen. Möjligen kan nosringen med dess kassett ha interfererat med förmågan eller viljan att visa flehmenbeteende. Detta skulle i så fall delvis kunna förklara varför tjurarna inte uppvisade flehmenbeteende.

KONKLUSION

Ingen statistisk signifikant skillnad sågs mellan de testade substansernas påverkan på medelpulsen hos de studerade tjurarna. Detta indikerar, att hjärtfrekvensen hos tjur sannolikt inte är en lämplig indikator för att utvärdera huruvida en potentiellt feromoninnehållande substans är biologisk aktiv eller inte. Dock sågs en statistiskt signifikant stegring första minuten i tjurarnas hjärtfrekvens, vilket tyder på att någon form av reaktion fanns för exponering av brunstslem. Denna undersökning utgör endast en pilotundersökning. Möjligen skulle resultaten ha blivit annorlunda om tjurar med sexuell erfarenhet av kor och dess dofter använts, samt om ett större antal försöksdjur hade använts.

TACK

Jag vill tacka min biträdande handledare Kristina Nordéus för all hjälp med artikelsök, försökets planering och genomförande samt för det engagemang och den entusiasm hon hela tiden uppvisat. Jag vill även tacka min handledare Lennart Söderquist och biträdande handledare Renée Båge för all hjälp före och under försöket samt för hjälp med tolkning av resultat och sammanställning av den skriftliga delen av arbetet.

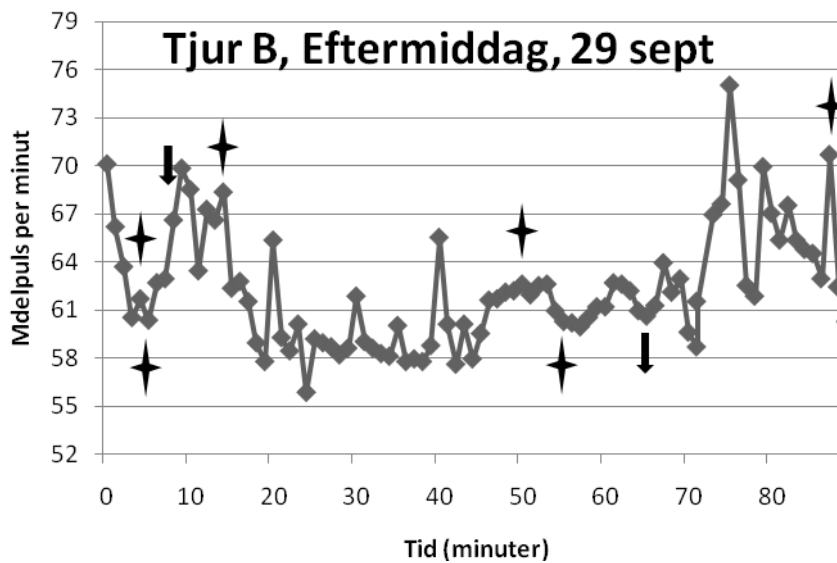
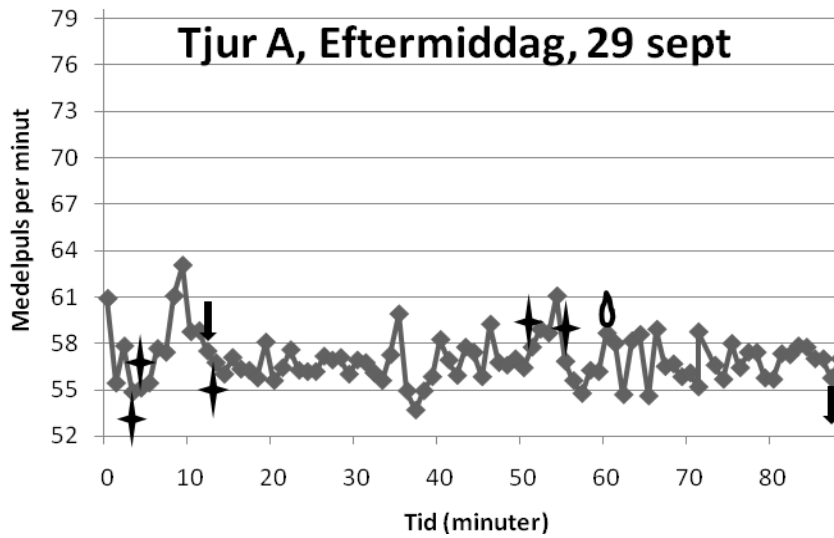
Tack även till Nils Lundeheim för ovärderlig hjälp med statistiken.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Angioy, A. M., Desogus, A., Tomassini, I., Andersson, P., Hansson, B. S. (2003) Extreme sensitivity in an olfactory system. *Chemical senses* 28. 279-284
- Berry, D. P., Buckley, F., Dillon, P., Evans, R. D., Rath, M., Veerkamp, R. F. (2003) Genetic Relationships among Body Condition Score, Body Weight, Milk Yield, and Fertility in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 86:2193–2204
- Campell, N. A., Reece, J. B., Mitchell, L. G., Taylor, M. R. (2003) *BIOLOGY Concepts & Connections*, 4th ed. Benjamin Cummings. 284-285
- Custer, E. E., Berardinelli, J. G., Short, R. E. Wehrman, M., Adair, R. (1990) Postpartum interval to estrus and patterns of LH and progesterone in first-calf suckled beef cows exposed to mature bulls. *Journal of Animal Science.* 68:1370-1377
- Fernandez, D., Berardinelli, J. G., Short, R. A., Adair, R. (1993) The time required for the presence of bulls to alter the interval from parturition to resumption of ovarian activity and reproductive performance in first-calf suckled beef cows. *Theriogenology.* 39:411-419
- Hafez, E. S. E., (1993) *Reproduction in Farm Animals*, 6th ed. Lea & Febiger. pp 320
- Hafez, E. S. E., Hafez, B., (2000) *Reproduction in Farm Animals*, 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. pp 298
- Hradecký P., (1987) Possible induction by estrus cows of pheromone production in penmates. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 15, No 3 (1989) 1067-1075
- Kemp, B., Soede, N. M., Langendijk, P. (2005) Effects of boar contact and housing conditions on estrus expression in sows. *Theriogenology* 63:643-656
- Klemm, W. R., Hawkins, G. N., De Los Santos, E. (1987) Identification of compounds in bovine cervico-vaginal mucus extracts that evoke male sexual behaviour. *Chemical senses*, Vol. 12, no.1, 77-87
- Koelsch, R. K. (1992) Applications of activity, milk progesterone, and heart rate sensors for dairy reproduction management. Cornell University.
- Korjonen, L. (1997) Baggeffekten vid initiering och synkronisering av brunst hos tacka. Fördjupningsarbete. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för obstetrik och Gynekologi.
- Lopez, H., Satter, L. D., Wiltbank M.C. (2003) Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 81 (2004) 209–223
- Lucy, M. C. (2001) Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End?. *Journal of Dairy Science.* 84:1277–1293
- Martínez-García, F., Martínez-Ricos, J., Agustín-Pavón, C., Martínez-Hernández, J., Novejarque, A., Lanuza, E. (2008) Refining the dual olfactory hypothesis: Pheromone reward and odour experience. *Behavioural Brain Research*, doi:10.1016/j.bbr.2008.10.002
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. (2001) *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 8th ed. B. W. Saunders. 3-28, 691
- Nordéus, K. (2007) Feromoninnehållande substansers effekt på hjärtfrekvensen hos kvigor i östrus eller diöstrus. *EEF (Examensarbete 2007:1, ISSN 1652-8697)*. Uppsala: Sveriges Lantbruksuniversitet
- Rivard, G., Klemm, W. R. (1989) Two body fluids containing bovine estrous pheromone(s). *Chemical senses*, Vol. 14 , no2, 273-279.

- Royal, M. D., Pryce, J. E., Woolliams, J. A., Flint, A. P. F. (2002) The Genetic Relationship between Commencement of Luteal Activity and Calving Interval, Body Condition Score, Production, and Linear Type Traits in Holstein-Friesian Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*. 85:3071-3080
- Sankar, R., Archunan, G. (2004) Flehmen response in bull: role of vaginal mucus and other body fluids of bovine with special reference to estrus. *Behavioural Processes* 67: 81-86
- Shipka, M. P., Ellis, L. C. (1998) Effects of bull exposure on postpartum ovarian activity of dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 54 (1999) 237–244
- Svensk Mjök. Genomsnittligt antal kor per besättning. [online] Tillgänglig: http://www.svenskmjolk.se/templates/News___89.aspx [2008-10-27]
- Vandewalle, G., Middleton, B., Rajaratnam, S. M. W., Stone, B. M., Thorleifsdottir, B., Arendt, J., Derk-Jandijk (2006) Robust circadian rhythm in heart rate and its variability: influence of exogenous melatonin and photoperiod. *J. Sleep Res.* (2007) 16, 148–155
- Wyatt, D. T. (2003) *Pheromones and Animal Behaviour – Communication by smell and taste*. Cambridge: University Press. ISBN 0 521 48526 6
- Zalesky, D. D., Day, M. L. Garcia-Winder, K., Imakawa, R. J., Kittok, M. J., D'Occhio, Kinder, J. E. (1984) Following Parturition in Beef Cows Influence of Exposure to Bulls on Resumption of Estrous Cycles. *Journal of Animal Science*. 59:1135-1139

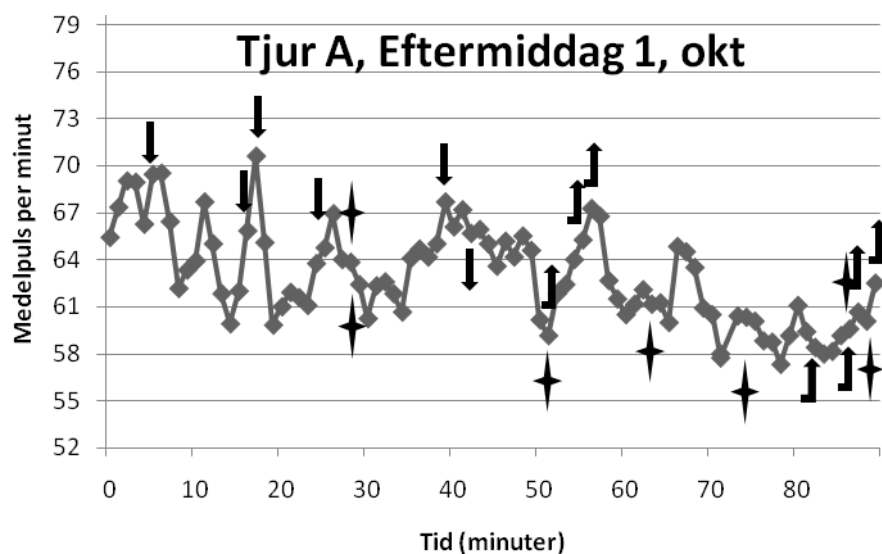
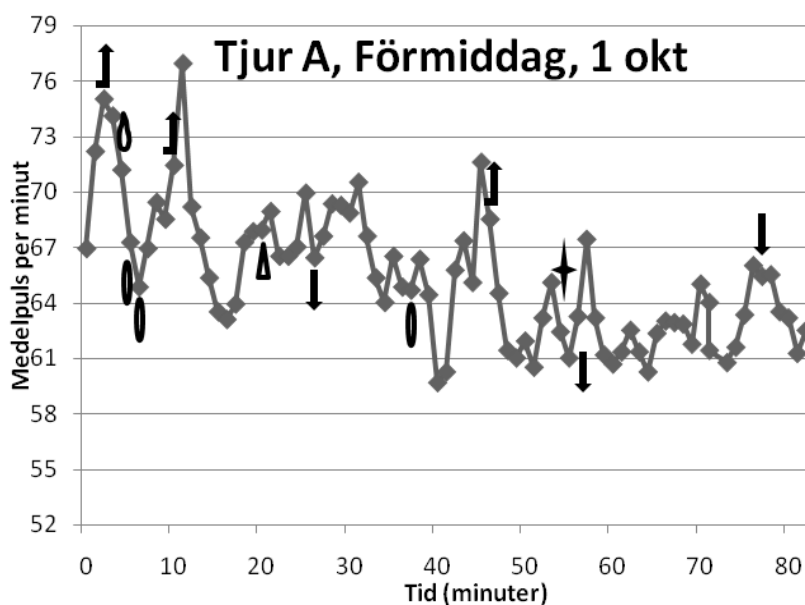
APPENDIX



Förmiddag; 0-9 Tjururin, 10-19 *Tomkassett*, 20-29 Kourin (lutealfas), 30-39 *Tomkassett*, 40-49 Vatten, 50-59 *Tomkassett*, 60-69 Kourin (brunst), 70-79 *Tomkassett*, 80-89 Brunstslem

Eftermiddag; 0-9 Brunstslem, 10-19 *Tomkassett*, 20-29 Kourin (brunst), 30-39 *Tomkassett*, 40-49 Vatten, 50-59 *Tomkassett*, 60-69 Kourin (lutealfas), 70-79 *Tomkassett*, 80-89 Tjururin

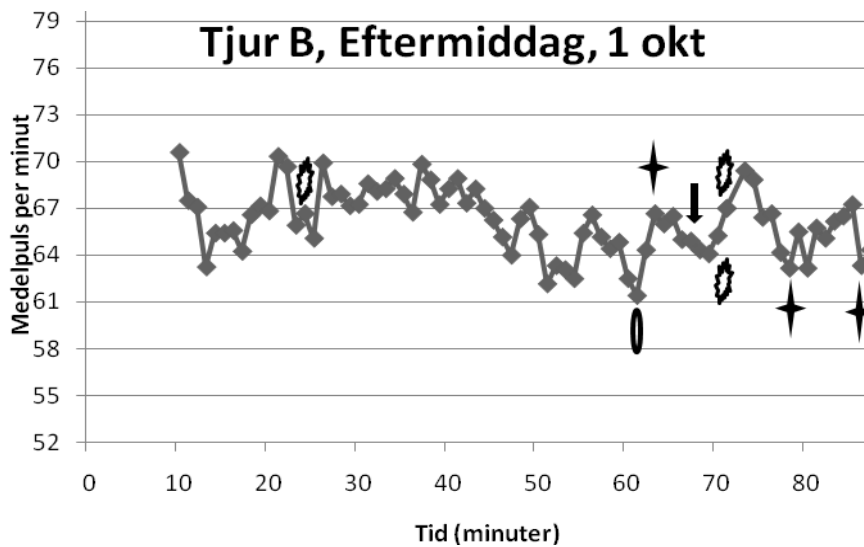
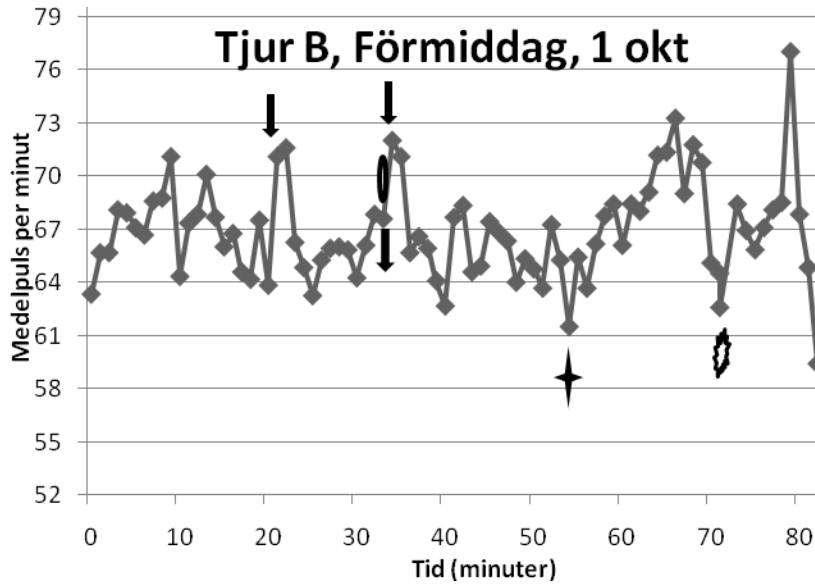
U Urinering; J Utskaftning; 0 Stångas med inredning; Δ Flehmen/tendens till flehmen; ↓ Försök att lägga sig ner; † Störning; 0 Kassett lossnat från nosringen



Förmiddag; 0-9 Tjururin, 10-19 *Tomkassett*, 20-29 Kourin (lutealfas), 30-39 *Tomkassett*, 40-49 Vatten, 50-59 *Tomkassett*, 60-69 Kourin (brunst), 70-79 *Tomkassett*, 80-89 Brunstslem

Eftermiddag; 0-9 Brunstslem, 10-19 *Tomkassett*, 20-29 Kourin (brunst), 30-39 *Tomkassett*, 40-49 Vatten, 50-59 *Tomkassett*, 60-69 Kourin (lutealfas), 70-79 *Tomkassett*, 80-89 Tjururin

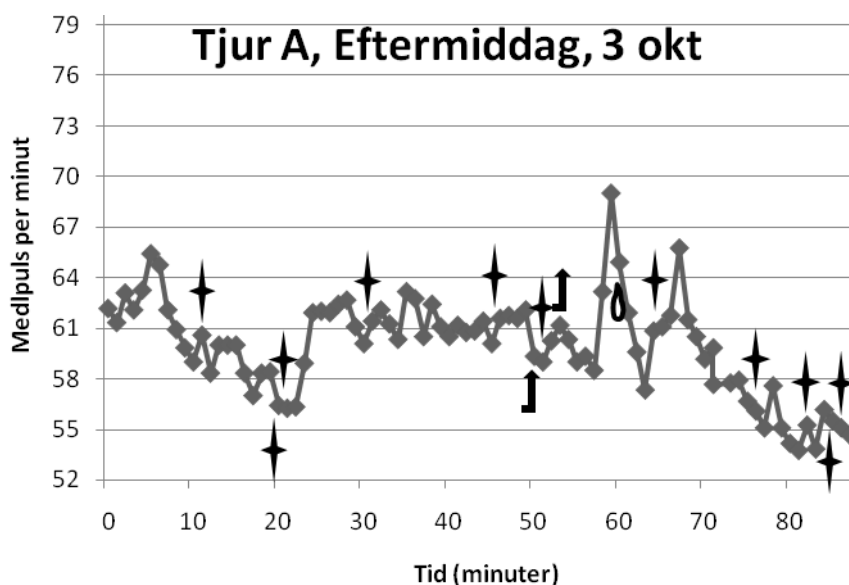
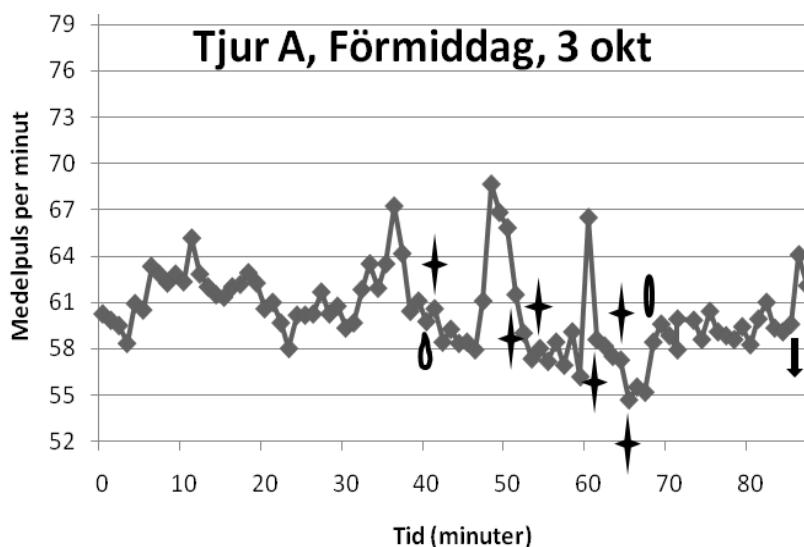
○ Urinering; ↑ Utskaftning; ○ Stängas med inredning; △ Flehmen/tendens till flehmen; ↓ Försök att lägga sig ner; + Störning; ○ Kasset lossnat från nosringen



Förmiddag; 0-9 Tjururin, 10-19 Tomkassett, 20-29 Kourin (lutealfas), 30-39 Tomkassett, 40-49 Vatten, 50-59 Tomkassett, 60-69 Kourin (brunst), 70-79 Tomkassett, 80-89 Brunstslem

Eftermiddag; 0-9 Brunstslem, 10-19 Tomkassett, 20-29 Kourin (brunst), 30-39 Tomkassett, 40-49 Vatten, 50-59 Tomkassett, 60-69 Kourin (lutealfas), 70-79 Tomkassett, 80-89 Tjururin

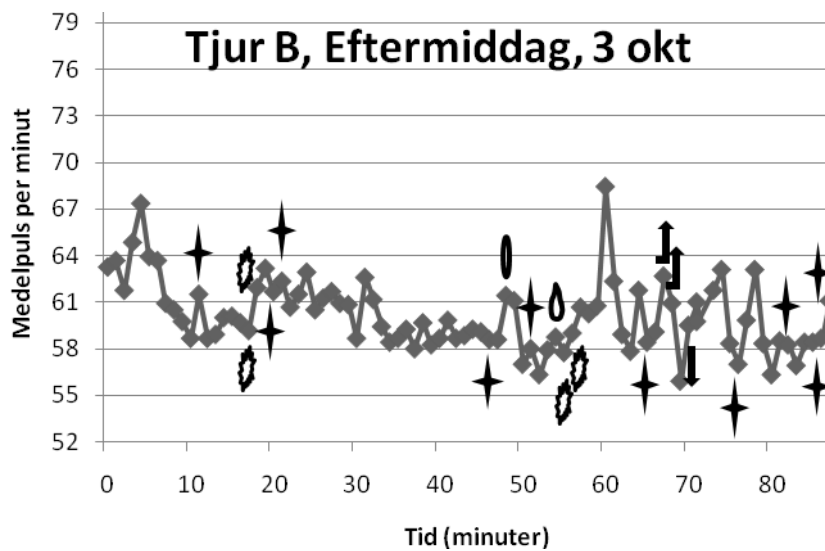
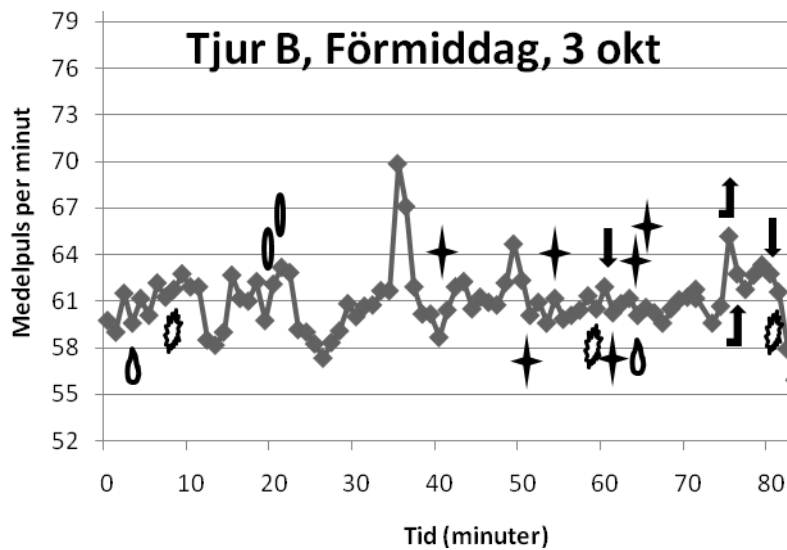
⊖ Urinering; ↓ Utskaftning; 0 Stängas med inredning; Δ Flehmen/tendens till flehmen; ↓ Försök att lägga sig ner; + Störning; ⊖ Kassett lossnat från nosringen



Förmiddag; 0-9 Tjururin, 10-19 Tomkassett, 20-29 Kourin (lutealfas), 30-39 Tomkassett, 40-49 Vatten, 50-59 Tomkassett, 60-69 Kourin (brunst), 70-79 Tomkassett, 80-89 Brunstslem

Eftermiddag; 0-9 Brunstslem, 10-19 Tomkassett, 20-29 Kourin (brunst), 30-39 Tomkassett, 40-49 Vatten, 50-59 Tomkassett, 60-69 Kourin (lutealfas), 70-79 Tomkassett, 80-89 Tjururin

♂ Urinering; ↑ Utskaftning; 0 Stängas med inredning; Δ Flehmen/tendens till flehmen; ↓ Försök att lägga sig ner; + Störning; ⓪ Kassett lossnat från nosringen



Förmiddag; 0-9 Tjururin, 10-19 *Tomkassett*, 20-29 Kourin (lutealfas), 30-39 *Tomkassett*, 40-49 Vatten, 50-59 *Tomkassett*, 60-69 Kourin (brunst), 70-79 *Tomkassett*, 80-89 Brunstslem

Eftermiddag; 0-9 Brunstslem, 10-19 *Tomkassett*, 20-29 Kourin (brunst), 30-39 *Tomkassett*, 40-49 Vatten, 50-59 *Tomkassett*, 60-69 Kourin (lutealfas), 70-79 *Tomkassett*, 80-89 Tjururin

U Urinering; J Utskaftning; O Stängas med inredning; Δ Flehmen/tendens till flehmen; ↓ Försök att lägga sig ner; + Störning; Ø Kasset lossnat från nosringen