

**Wir bedanken uns bei unseren Sponsoren für die
finanzielle Unterstützung unserer Tagung**

Goldsponsor 2012



Silbersponsor



Bronzesponsoren

Walter Wörrlein
Medizintechnik



Weitere Sponsoren



Sponsorenadressen

Bodinco B.V.

Hofdijkstraat 2, 1814 EC Alkmaar
The Netherlands

Ceva Tiergesundheit GmbH

Kanzlerstr. 4, 40472 Düsseldorf

Consarctic GmbH

Postfach 1133, 63821 Schöllkrippen

IMV Technologies

Rue Clemenceau, Postfach 61300
L'Aigle, France

MSD Tiergesundheit

Intervet Deutschland GmbH
Feldstraße 1a, 85716 Unterschleißheim

Pfizer GmbH

Pfizerstr.1, 76139 Karlsruhe

RBW e.V.

Ölkoferstr. 41, 88518 Herbertingen

Vetoquinol

Parkstr. 10, 88212 Ravensburg

Walter Wörrlein Medizintechnik

Breitstr.8, 91522 Ansbach

Programm

Donnerstag, 14. Juni 2012

09:30 - 11:30 **Praktikerseminar** - Embryonenspülung u. Embryonenübertragung

12:00 **Willkommen** - Gulaschsuppe mit Brötchen

13:00 **Begrüßung** - H. Mathiak, RBW; H. Koll; U. Küchenmeister

13:05 R. Bühler, Bäuerliche Erzeugergemeinschaft Schwäbisch Hall
**25 Jahre ländliche Regionalentwicklung in Hohenlohe -
Autochthone Rassen und ihre Potentiale für Bäuerliche
Betriebe**

Sektion I Moderation: H. Hauschulte, A. Zürcher

13:20 **Genomische Selektion in der Rinderzucht** 11
Rolle des Embryotransfers
K. Roschlau, MASTERRIND GmbH, ET-Station Nüchel

14:15 **Diskussion**

14:30 - 15:15 **Probleme in der Hornloszucht bei Holstein-Friesian;** 15
Was kann ET zur Lösung beitragen?
W. Wemheuer

Langzeitkonservierung von Spermien und Embryonen: 18
Geburt eines Kalbes nach 22 Jahren Kryokonservierung
J. Detterer, S. Meinecke-Tillmann

ET in Polen – ein Erfahrungsbericht 19
H-P. Nohner, A. Kehrle, C. Leiding

15:15 – 16:00 **Kaffeepause / Industrieausstellung**

Donnerstag, 14. Juni 2012

Sektion II Moderation: S. Meinecke-Tillmann, M. Hölker

- 16:00 – 17:00 **Einfluss der In-vitro-Reifungsbedingungen auf die Expression der Progesteronrezeptor-Isoformen boviner Oozyten** 23
F. Poppicht, N. Burmester, N. Hambruch, H. Stinshoff, A. Hanstedt, S. Wilkening, C. Wrenzycki
- Konjugierte Linolsäuren beeinflussen die Qualität in vitro produzierter boviner Embryonen** 26
H. Stinshoff, S. Wilkening, A. Hanstedt, C. Wrenzycki
- Korrelation zwischen dem Geneexpressionsprofil einer bovinen 2-Zellblastomere und dem Entwicklungspotential der korrespondierenden Schwesterblastomere** 28
E. Held, D. Salilew Wondim, D. Testfaye, K. Schellander, M. Hölker
- Qualitätsbeurteilung von in vitro produzierten Rinderembryonen mittels Lebendbeobachtung** 30
A. Beck, M. Reichenbach, H-D. Reichenbach, F. Habermann, G. Arnold, E. Wolf
- ab 19:00 **Abendveranstaltung**

Freitag, 15. Juni 2012

Sektion III Moderation: C. Wrenzycki, K. Roschlau

- 9:00 **Was gibt es Neues nach 35 Jahren IVF beim Menschen?** 33
J.-S. Krüssel, Universitäres interdisziplinäres Kinderwunschzentrum
Düsseldorf
- 9:45 **Diskussion**
- 10:00 – 10:30 **Auswirkungen zweier Vitrifikationsverfahren auf die
morphologische und molekulare Qualität in vitro
produzierter boviner Embryonen** 34
K. Beuing, H. Stinshoff, S. Wilkening, C. Wrenzycki
- Einfluss der Umgebung auf die präimplantative
Entwicklung von Rinderembryonen** 36
M. Hölker, E. Held, A. Gad, D. Salilew Wondim, D. Testfaye,
K. Schellander
- 10:30 **Podiumsdiskussion zur inhaltlichen Gestaltung der
Homepage AET-d**
- 10:45 – 11:30 **Kaffeepause / Industrieausstellung**

Sektion IV Moderation: F. Becker, J. Detterer

- 11:30 – 12:30 **Die relative Häufigkeit von 2- und 3-Wellen-Zyklen.
Ein unkonventioneller, aber beachtenswerter
Fertilitätsparameter in Rinderherden** 38
J. Schneebeil
- Beziehungen zwischen der Gelbkörperentwicklung nach
Follikelaspersion und Qualitätsmerkmalen von
Brunstfollikeln bei Milchkühen** 39
A. Vernunft, J. M. Weitzel, T. Viergutz
- Nutzung einer laparoskopisch intrauterinen
terminorientierten Einmalbesamung beim Schwein zur
Erzeugung gering-divers entwickelter Embryonen** 41
K-P. Brüssow, H. Torner, J. Rátky
- ‘Environmental improvement’ – Strategien zur
Verbesserung der Haltungsbedingungen bei Zuchtbullen** 43
B. Hoyer, J. Detterer, H. Hackbarth, S. Meinecke-Tillmann
- 12:45 **Schlusswort und Verabschiedung**

Zusammenfassungen der Vorträge

Sektion I

Genomische Selektion in der Rinderzucht – Rolle des Embryotransfers

Knut Roschlau, MASTERRIND GmbH, ET-Station Nüchel

Im „Zeitalter“ der genomischen Selektion wird Zucht mit jungen Tieren betrieben – jungen, genomisch getesteten Bullenmüttern, von denen mittels des Embryotransfers (ET) möglichst viele Nachkommen erzeugt werden, und ebensolchen Besamungsbullen. Dadurch wird das Generationsintervall drastisch reduziert und in der Folge der jährlich erreichbare züchterische Fortschritt mehr als verdoppelt. Die Beschleunigung des Zuchtfortschrittes kommt am Ende über die Besamung allen Milchproduzenten zugute: Das Zuchtziel, im Stall robuste, langlebige und fruchtbare Kühe zu haben, die viel Milch mit den gewünschten Inhaltsstoffen geben, kann schneller erreicht werden.

Die klassischen Zuchtstrategien erwiesen sich als äußerst erfolgreich. Es ist vor allem dem breiten Einsatz von leistungsgeprüften (töchtergeprüften) Besamungsbullen zu verdanken, dass in den vergangenen 60 Jahren in Deutschland die mittlere Milchleistung von 2500 kg auf fast 10000 kg je Kuh und Jahr gesteigert werden konnte.

Aufgrund des damaligen Wissensstandes beinhalteten konventionelle Zuchtprogramme allerdings mehrere Schwachstellen. Solange ältere Kühe als Bullenmütter eingesetzt wurden, gab es zwar (relativ) viele Informationen über den genetischen Wert dieser Tiere – allerdings war das Generationsintervall sehr groß, was sich negativ auf den möglichen Zuchtfortschritt auswirkte. Schon vor mehr als 10 Jahren gingen deshalb weltweit viele Besamungsstationen dazu über, junge Rinder, von denen lediglich Pedigree-Informationen vorlagen, als potenzielle Bullenmütter zu verwenden. Später stellte sich allerdings regelmäßig heraus, dass nur 20 – 25% dieser Tiere tatsächlich die Bedingungen als Bullenmütter erfüllten.

Pedigree-Zuchtwerte sagen nur sehr eingeschränkt etwas über den tatsächlichen Zuchtwert aus – Theorie und Praxis zeigen, dass der tatsächliche Zuchtwert eines Individuums um bis zu 10 Punkten nach oben bzw. nach unten von dem aus den Elterndaten erwarteten Wert abweichen können.

Vor dem gleichen Dilemma standen die Besamungsstationen, wenn sie aus einem Pool von Bullenkälbern (Vollgeschwistern), die aus einer Anpaarung über den ET erzeugt worden waren, eines für den Testeinsatz zur späteren Verwendung als Besamungsbulle aussuchen mussten. Oft wurden „Nieten“ aufgezogen und aufwendig getestet, während die züchterisch besten Bullen schon als Kalb geschlachtet wurden.

Diese Situation hat sich mit der Möglichkeit der Schätzung von **genomischen Zuchtwerten (gZW)** grundlegend geändert. Der genomische Zuchtwert eines Tieres steht

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion I

schon im Moment seiner Entstehung – also mit der Befruchtung einer Eizelle – fest und kann deshalb sehr früh geschätzt werden.

Um zu verstehen, wie genomische Zuchtwerte ermittelt werden, ist es zunächst notwendig, etwas Grundsätzliches über den Aufbau des Erbmaterials zu wissen. Hauptbestandteile des Erbmaterials – der DNA – sind vier verschiedene Nukleotide (Bausteine), die einfach mit den vier Buchstaben A, T, G und C bezeichnet werden können und die, wie in einem Kode, in unterschiedlicher Weise aneinander gereiht sind. Dieser Kode wurde für das Rind vor einigen Jahren entschlüsselt.

In einem Spermium bzw. in einer Eizelle ist jeweils die Hälfte des Erbmateriales – bestehend aus 3 Milliarden Bausteinen(!) - enthalten. Im Moment der Befruchtung fügen sich diese beiden Hälften dann wieder zur Gesamtheit des Erbmateriales (Genom), dann 6 Milliarden Nukleotide, zusammen.

Durch die Entschlüsselung des genetischen Kodes beim Rind ist die genaue Abfolge der 3 Milliarden Bausteine des (halben) Erbmaterials bekannt – allerdings gibt es bei jedem einzelnen Rind viele kleine Abweichungen von diesem Standardkode. Genau diese winzigen Abweichungen sind es, die jedes Rind einzigartig machen und die letztlich die Basis für die Ermittlung des genomischen Zuchtwertes sind. Solche Abweichungen (Polymorphismen) betreffen immer nur einen Baustein (Nukleotid) – sie werden deshalb auch „single nucleotide polymorphism“ oder SNP (gesprochen: Snip) genannt. Im Genom des Rindes gibt es viele Millionen solcher Abweichungen. Wie solche SNPs aussehen, ist in Abbildung 1 dargestellt.

Abb. 1: Darstellung von SNPs (single nucleotide polymorphism) in einem Abschnitt des Erbmaterials des Rindes (Abweichungen rot dargestellt)

....AATTGCCCGAAATGCATTTTGTTCACGGGT.... „Standardrind“
....AATT**T**CCCGAT**A**TGCAC**T**TTTGTTC**T**CGGGT.... Rind 1
 SNP SNP SNP SNP

Um bei einem Tier den genomischen Zuchtwert zu bestimmen, wird zunächst eine Blut- oder Gewebeprobe genommen, aus der das Erbmaterial isoliert wird. Danach wird versucht, in diesem Erbmaterial eine möglichst große Zahl an SNPs zu ermitteln. Um das zu ermöglichen, wurde von der amerikanischen Firma Illumina ein Chip entwickelt, mit dessen Hilfe Veränderungen im Erbmaterial in 54.000 gleichmäßig über die gesamte DNA verteilten Bereichen erfasst werden. Zum Schluss wird das Muster der gefundenen Abweichungen in einen Computer eingelesen. Das Muster dieser Abweichungen (SNPs) hat zunächst keinerlei direkten Bezug zu irgendwelchen Leistungseigenschaften des zu analysierenden Tieres.

Um eine solche Beziehung herzustellen, sind im Vorfeld SNP-Muster von mehreren tausend Tieren (meist Bullen) zu erstellen, die schon einen klassischen Zuchtwert anhand der Leistungen ihrer Töchter erhalten haben (Referenzgruppe). Über komplizierte Rechenmodelle

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion I

können dann Zusammenhänge zwischen bestimmten SNP-Mustern und konkreten Merkmalen und Leistungen hergestellt werden.

Erst der Abgleich des konkreten SNP-Musters des zu untersuchenden Tieres mit den Daten der Referenzgruppe ermöglicht es, einen genomischen Zuchtwert zu schätzen. Je größer dabei die Referenzgruppe ist, umso sicherer sind die geschätzten genomischen Zuchtwerte. Allerdings müssen die Referenzgruppen in regelmäßigen Abständen ergänzt werden, da einmal gefundene Beziehungen zwischen SNP-Mustern und Leistungsdaten nach einigen Generationen verloren gehen können.

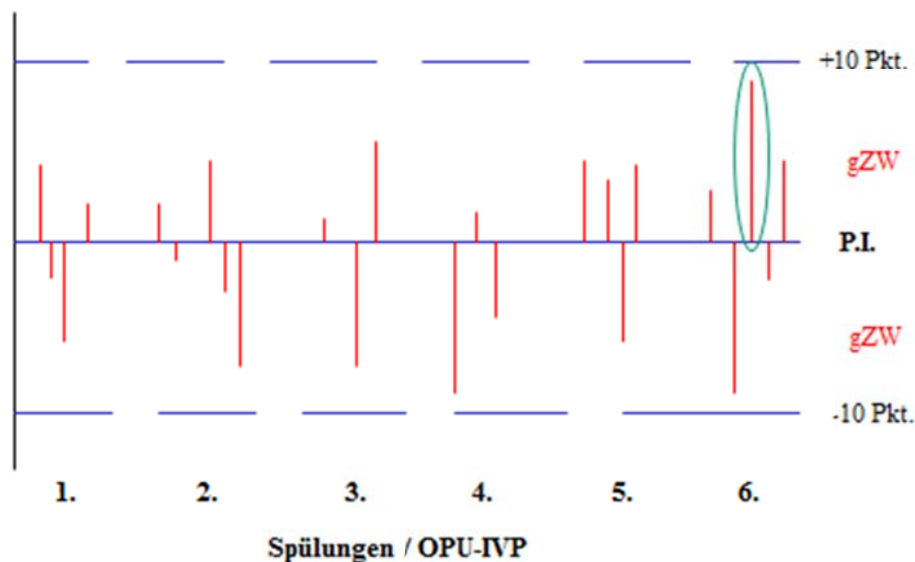
Die Sicherheit der auf diese Weise ermittelten genomischen Zuchtwerte ist für verschiedene Merkmalskomplexe sehr unterschiedlich und erreicht für Produktionsmerkmale (Milchmenge, Inhaltsstoffe u.a.) in Addition zu den vorher bekannten Pedigree-Zuchtwerten (ermittelt aus Daten der Eltern) mehr als 70%. Das entspricht fast einer Verdopplung der Sicherheit im Vergleich mit den Pedigree-Zuchtwerten. Bei den Typmerkmalen ist der Zuwachs durch die genomischen Daten geringer – in der Summe erreicht die Sicherheit bis zu 60%. Bei funktionalen Merkmalen hat die genomische Analyse den geringsten Effekt. Je nach Merkmal – Kalbeverlauf, Fruchtbarkeit u.a. – liegen die Sicherheiten zwischen 25 und 50 % - aber auch das ist eine deutliche Steigerung gegenüber den Sicherheiten im „vorgenomischen“ Zeitalter. Generell entspricht die Sicherheit eines genomischen Zuchtwertes der Sicherheit eines klassisch geprüften Bullen mit 40 – 60 Töchtern.

Die Einführung der genomischen Selektion in die Rinderzucht hat erhebliche Konsequenzen für den **Embryotransfer**. Auf Grund der großen Variabilität in den Zuchtwerten von Vollgeschwistern ist es zwingend notwendig, von ausgewählten (genomisch getesteten) Eltern möglichst viele Nachkommen zu erzeugen: **Je größer die Anzahl von Vollgeschwistern ist, umso breiter ist die Basis für die genomische Selektion und umso höher ist die Chance, das Individuum mit dem höchstmöglichen genomischen Zuchtwert zu finden!** Realisiert werden kann das nur durch einen verstärkten Einsatz von Embryotransfer (Spülungen bzw. OPU/IVP). In Abbildung 2 ist ein Beispiel für eine Situation dargestellt, wie sie in der Praxis auftreten kann.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion I

Abb. 2:

Beispiel: 24 Kälber aus 6 Spülungen bzw. OPU/IVP-Sitzungen – erst in der 6. Spülung/Sitzung wird das Kalb mit dem höchsten gZW erzeugt



In dem Beispiel ist zu sehen, dass erst aus der sechsten Spülung/OPU-Sitzung das Kalb mit dem annähernd höchstmöglichen Zuchtwert entsteht. Aus diesem Grund wurde von den Gremien der NORD-OST-GENETIK beschlossen, dass von jeder Anpaarung im Rahmen des Jungrinder-Zuchtprogramms nicht mehr 12, wie im „vorgenomischen Zeitalter“ vorgesehen, sondern 20 – 60 Embryonen erzeugt werden sollen. In der Folge steigen damit aber auch die Kosten für den Landwirt, zum anderen werden deutlich mehr Empfängertiere benötigt, um das Mehr an Embryonen zu übertragen. Da die Zahl der verfügbaren Rezipienten immer schon ein Engpass im System ist, soll in Zukunft die Selektion anhand der genomischen Zuchtwerte schon auf der Ebene der Embryonen vorgenommen werden, um die Zahl der nötigen Transfers drastisch zu reduzieren.

Während in einer Blut- oder Gewebeprobe, die genommen wird, um ein Tier genomisch zu untersuchen, ausreichend DNA enthalten ist, können von einem Embryo, der am Tag 7 seiner Entwicklung aus etwas mehr als 100 Zellen besteht, nur einige (etwa 10) Zellen entnommen werden. Die DNA aus diesen wenigen Zellen muss zunächst in einem molekular-genetischen Verfahren millionenfach vermehrt (amplifiziert) werden, bevor die notwendige SNP-Analyse vorgenommen werden kann. Da das Ergebnis der Zuchtwertschätzung erst nach Tagen oder Wochen vorliegt, werden die Embryonen nach der Biopsie zunächst eingefroren. Während die weiblichen Kälber aus hervorragenden Anpaarungen für den Züchter alle interessant sind, werden später nur die männlichen Embryonen mit den höchsten Zuchtwerten aufgetaut und übertragen.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass die Bedeutung des Embryotransfers mit der Einführung der genomischen Selektion in die Rinderzucht dramatisch wächst.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion I

Probleme in der Hornloszucht bei Holstein-Friesian; Was Kann ET zur Lösung beitragen?

Wilhelm Wemheuer

Tierärztliches Institut; Fakultät für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen

Gesellschaftspolitische Relevanz

Die Bedeutung der Zucht auf Hornlosigkeit bei Holstein Friesian nimmt zu, seit der Tierschutz die betäubungslose Enthornung der Zuchtkälber unter 6 Wochen unter die Lupe genommen hat. Vorreiter sind die Bio-Verbände, welche die Enthornung nur noch mit schwer zu erhaltener Ausnahmegenehmigung oder gar nicht mehr (Demeter) gestatten. In Niedersachsen gibt es einen 48 Punkte-Plan von Landwirtschaftsminister Lindemann zum Tierschutz in Nutztierbeständen. Ziel ist es unter anderem die Enthornung von Kälbern schmerzfrei zu gestalten. Eine Kommission von Ministerialen und Tierärzten arbeitet daran. Schneller war das Ministerium in NRW mit der Düsseldorfer Erklärung vom 9. Mai 2012. Insgesamt 16 unterzeichnende Institutionen, vom Ministerium über den Zuchtverband, Landwirtschaftskammern, Tierärztekammern, Bioverbände, Tierschutzorganisationen usw. beabsichtigen ebenfalls die Enthornung für das Kalb schmerzfrei zu gestalten. Sie gehen aber weiter und stellen als sinnvolle Alternative die Anpaarung genetisch hornloser Bullen heraus. Dazu soll der Zuchtverband RUW „**schnellstmöglich**“ seine Angebotspalette an passenden Vererbern erweitern, um eine flächendeckende Versorgung sicherzustellen.

Probleme

Die Betonung auf schnellstmöglich zeigt, dass es auf diesem Weg im Wesentlichen drei Probleme gibt, die gelöst werden müssen.

a. Gentest

Hornlosigkeit wird dominant vererbt, so dass für die Überprüfung der genetischen Anlage der Hornlosigkeit (Phänotyp = Genotyp) zunächst mal keinen Test benötigt wird. Allerdings kann man nicht erkennen, ob die Anlage für Hornlosigkeit heterozygot oder homozygot vorhanden ist. Da der heterozygote Bulle auf einer gehörnten Rinderrasse nur 50% hornlose Kälber hinterläßt, der homozygote aber 100%, ist diese Unterscheidung beim Ankauf eines hornlosen Bullen von einer Besamungsstation von höchster Relevanz. Während interessante heterozygote Bullen für die Verbreitung des Hornlos-Alleles benötigt werden, kann nur der Homozygote zur Vermeidung der Enthornung flächendeckend eingesetzt werden. Für diese Unterscheidung hat der DHV den Markertest der Firma GeneControl- München zugelassen. Eine Sicherheit von 95% wird garantiert. Ein Gentest steht noch nicht zur Verfügung, aber auch damit ist in naher Zukunft zu rechnen. Ärgerlich bei der phänotypischen Bestimmung der Hornlosigkeit ist das häufige Auftreten von Wackelhörnern in der HF-Zucht. Auch hier

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion I

kann nur der GeneControl-Test über den tatsächlichen Status: Gehörnt=pp, hornlos heterozygot = Pp, hornlos homozygot =PP, entscheiden. Somit ist dieses Problem weitestgehend gelöst.

b. Inzucht

In der HF-Zucht geht die Hornlosanlage der aktuellen Bullen auf drei Kühe zurück. Dies sind die amerikanischen Kühe: Princess Fayne Houwtje geb. 1960, Stammutter von 80 % der aktuellen Bullen, Shabrock Linda Quepie Tup, geb. 1969, Stammutter von 16 % sowie Gardner Promis Tidy, geb.1965, Stammutter von 4%. Die aktuellen Bullen sind im Schnitt etwa 10 Generationen von diesen Kühen entfernt, so dass sie außer dem Rinderchromosom 1, auf dem das Horn-Gen liegt, statistisch kein Chromosom mehr von den Ursprungskühen haben können. Tatsächlich sind es aber 2 Bullen aus der Houwtje Linie, Lawn-Boy-P und Mitey-P, sowie deren Mütter bzw. Großmütter und die Kuh Bellwood Ossie (Quepie-Linie), die in jedem Pedigree vorkommen. Auf der Homepage der Universität Göttingen haben die Agrarstudenten der Milch-AG drei ständig aktualisierte Tabellen für die besten HF-Hornlosbullen der Welt angelegt. Die jeweils besten 30 nach dem usamerikanischen TPI-Zuchtwert, die jeweils besten 15 schwarzbunten-HF nach deutschem RZG und die jeweils besten 15 rotbunten-HF ebenfalls nach RZG. Von diesen 60 Bullen sind 20 Lawn-Boy-Söhne, 15 haben Lawn-Boy als Muttervater, 10 sind Mitey-P-Söhne, 7 weitere sind Söhne aus Mitey-P's Mutter oder Großmutter, 8 weitere gehen in 3-5 Generationen auf Bellwood Ossie zurück. Neben diesen 3 Hauptlinien gibt es nur noch eine Handvoll Kuhfamilien, deren Söhne mittlere Zuchtwerte haben. Das reicht für die Umzüchtung einer ganzen Population auf keinen Fall. Dieses Problem lässt sich nur über die Verbreitung des Hornlosalleles in alle guten Kuhfamilien unter Verkürzung des Generationsintervalles lösen.

c. Genetischer Abstand zur Standardzucht.

Ein weiteres Problem der bisherigen Hornloszucht ist der genetische Abstand zur gehörnten Zucht. Nehmen wir die besten 7 Bullen (TPI = 2550 P.), die in der USA genomisch getestet wurden und vergleichen sie mit den 7 besten Hornlosbullen (TPI = 2100 P.), dann fehlen den Hornlosbullen 450 TPI-Punkte. Das ist der Unterschied zwischen einem Spitzenbullen und einem noch einsetzbarem Bullen. Die 7 besten genomisch getesteten schwarzbunten Bullen nach deutschem RZG erreichen durchschnittlich einen Wert von 156, die 7 besten hornlosen einen von 129. Etwas besser sieht es bei den rotbunten-HF aus. Die gehörnten Bullen haben einen RZG von 145, die hornlosen einen von 138. Das heißt, die Hornloszucht liegt hinter der rotbunten HF-Zucht. Auch dieses Problem muss über eine Aufholjagd in wenigen Generationen gelöst werden.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion I

Schlüsseltechnologie genomische Selektion und ET

Durch die genomische Selektion kann der Zuchtwert eines hornlosen weiblichen Kalbes mit größerer Sicherheit gegenüber der vorherigen Zuchtwertschätzung bereits nach der Geburt festgestellt werden. Ein ET ist über OPU und IVF frühestens ab 8 Monaten möglich. Plus 9 Monate Tragezeit ergibt das bei durchschnittlichen Resultaten ein Generationsintervall von 2 Jahren. Ein Zuchtprogramm zur Lösung der Probleme müsste im ersten Schritt alle guten Kuhfamilien eines Zuchtgebietes mit einem passenden Hornlosbullen anpaaren. Die daraus fallenden hornlosen Kuhkälber werden genomisch getestet. Das jeweils Beste wird intensiv über ET mit den besten gehörnten Bullen (eine Frage der Zuchtphilosophie) angepaart. Auch davon werden 2-3 hornlose Töchter wiederum genomisch getestet und die jeweils Beste sofort wieder über ET genutzt. Nach 4 Generationen ET sind von den ursprünglich 30 hereingenommenen Chromosomen des Startbullen nur noch 2 übrig. Bei geschickter Bullenwahl ergibt das schon nach wenigen Generationen hornlose Färsen mit Blutalternativen und Spitzenzuchtwerten. Hornloszucht ist gesellschaftspolitisch gewollt. Wir müssen uns daher bemühen, die Gesellschaft an den entstehenden Kosten zu beteiligen.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion I

Langzeitkonservierung von Spermien und Embryonen: Geburt eines Kalbes nach 22 Jahren Kryokonservierung

J Detterer¹; S Meinecke-Tillmann²

¹*Besamungs- und ET-Station Georgsheil, Südbrookmerland*

²*Institut für Reproduktionsbiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover*

Nach den wegweisenden Arbeiten von Rostand (1946) und Polge et al. (1949) zur Gefrierung von Spermien und den ersten Erfolgen auf dem Gebiet der Langzeitlagerung von Präimplantationsstadien bei Mäusen (Whittingham et al. 1972), wurde vor fast 40 Jahren in Cambridge das erste Kalb aus einem kryokonservierten Embryo geboren ("Frostie": Wilmut und Rowson 1973). Die damals angewandten Verfahren wurden weiter entwickelt und ermöglichten die wirtschaftliche Nutzung im Rahmen der künstlichen Samenübertragung und des Embryotransfers in der Rinderzucht. Eine Langzeitlagerung von Spermien und Embryonen in kryokonserviertem Zustand bei -196 °C spielt daneben für die Erhaltung von Genreserven bei kleinen Populationen eine wichtige Rolle.

Zellschädigungen sollen dabei in erster Linie während des Einfrier- und des Auftauvorgangs durch physikalische Effekte wie Eiskristallbildung, Dehydratation oder sogenannte Lösungseffekte entstehen. Bei einer korrekten Einlagerung soll das Gefriergut dagegen nur noch durch physikalische Faktoren wie kosmische und terrestrische Hintergrundstrahlung beeinflusst werden. Kalkulationen haben ergeben, dass Embryonen erst nach Tausenden von Jahren Lagerung geschädigt würden (z.B. Mazur 1984). Daneben ist auch an eine Übertragung von Erregern im Stickstoffbehälter zu denken, welche jedoch nur ein geringes Risiko darstellt.

Aus der Praxis gibt es bei verschiedenen Spezies widersprüchliche Angaben hinsichtlich einer möglichen Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit nach Transfer langzeitgelagerter Spermien und Embryonen. Insbesondere beim Menschen wurde aber wiederholt auf die Geburt gesunder Nachkommen nach einer Langzeitlagerung von Spermien und Embryonen hingewiesen (Fallberichte).

Im Gebiet des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter (VOSt) wurden in den letzten Jahren Kälber von Bullen der Rasse Deutsches Schwarzbuntes Niederungsgrind (DSN) geboren, bei denen die verwendeten Samenportionen bis 27 Jahre kryokonserviert worden waren. Im Februar 2012 wurde im VOSt-Gebiet ein Bullenkalb aus einem Embryo geboren, der seit 1989 kryokonserviert worden war.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion I

ET in Polen – ein Erfahrungsbericht

Hans-Peter Nohner¹, Aline Kehrle¹, Claus Leiding¹

¹Besamungsverein Neustadt a.d.Aisch e.V.

EINLEITUNG

Die Besamungsstation Tulce bei Posen (Poznan) importierte HF-Embryonen aus dem Ausland, um möglichst schnell an der internationalen Top Genetik teilhaben zu können.

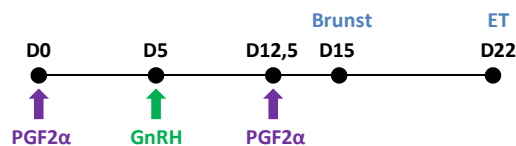
Nachdem erste Transfers ziemlich erfolglos verliefen, kontaktierten mich die Verantwortlichen zwecks Durchführung der Übertragung. Der Besamungsverein Neustadt unterhält seit 1990 Kontakte zur polnischen Besamungsstation Tulce.

MATERIAL UND METHODEN

Empfängertiere Synchronization und Embryonen

Als Empfängertiere dienten ausschließlich 15-19 Monate alte HF-Färsen. Die Synchronisation und Brunstbeobachtung übernahm Herr Dr. Josef Jazdzewski, der frühere Leiter der Rinderzucht im staatlichen Betrieb Pawlowice.

Wir wendeten folgendes Synchronisationsschema an:



335 von 425 Embryonen wurden mit Ethylenglycol(EG), sowie 90 Embryonen in Glycerin eingefroren.

Die in Glycerin eingefrorenen Embryonen wurden in 3 Schritten ausverdünnt.

Von den 335 in Ethylenglycol eingefrorenen Embryonen wurden 191 direkt übertragen (DT).

Bei 144 Embryonen wurde eine mikroskopische Kontrolle durchgeführt und nach Umsetzen in frische Kulturmedien erfolgte der Transfer.

Spendertiere, Superovulation und Spülung

Es handelte sich überwiegend um Jungrinder und Kühe aus importierten Embryonen. Alle Spender wurden mit PRID-Spiralen vorsynchronisiert und am 10. Tag nach der Brunst mit Pluset superovuliert.

So konnten an 7 Tagen insgesamt 53 Spülungen durchgeführt und 305 Embryonen frisch übertragen werden. 141 Embryonen wurden eingefroren.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion I

ERGEBNISSE

Embryo Transfers

Von 2003 bis 2010, bis zum Beginn der Privatisierung der Besamungsstation, wurden in 6 großen Betrieben 425 tiefgefrorene Embryonen aus Embryoimport übertragen, sowie von 2008 bis 2010 in drei dieser Betriebe 53 Spülungen und 305 Frischtransfers durchgeführt (Abb. 1).

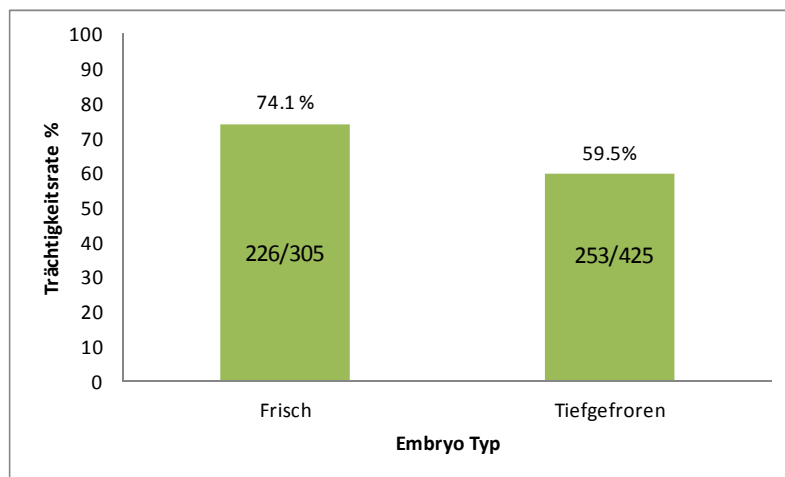


Abb. 1 – Trächtigkeitsrate nach Embryo Typ ($p < 0,0001$).

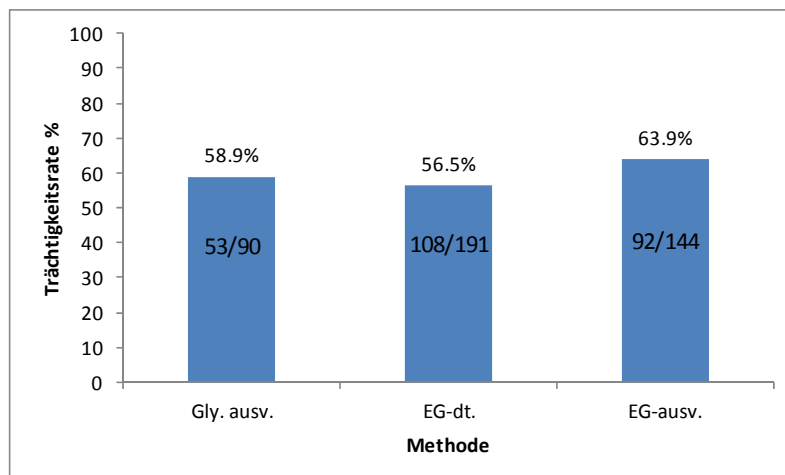


Abb. 2 – Trächtigkeitsrate nach Auftaumethode ($p = 0,3950$).

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion I

Spülungen

Tabelle 1 - Spül- und Trächtigkeitsergebnisse nach Betrieben – Poznan-PL-2008-2010.

| Betrieb | Anzahl Spülungen | Embryonen | | | Frisch Transfers | TU Zahl | % |
|---------------|------------------|------------|------------|-------------|------------------|------------|-------------|
| | | gesamt | tauglich | pro-Spülung | | | |
| W | 40 | 495 | 346 | 8,6 | 205 | 149 | 72,7 |
| Z | 8 | 88 | 70 | 8,7 | 70 | 57 | 81,4 |
| G | 5 | 49 | 30 | 6 | 30 | 20 | 66,6 |
| gesamt | 53 | 632 | 446 | 8,4 | 305 | 226 | 74,1 |

Zusammenfassend kann man festhalten, dass im Ausland über einen längeren Zeitraum gute Ergebnisse möglich sind, wenn sich ein absolut zuverlässiger und kompetenter Ansprechpartner vor Ort befindet.

Sektion II

Einfluss der In-vitro-Reifungsbedingungen auf die Expression der Progesteronrezeptor-Isoformen boviner Oozyten

Friederike Poppicht¹, Nina Burmester¹, Nina Hambruch², Hanna Stinshoff^{1*}, Ana Hanstedt^{1,3},
Sandra Wilkening¹, Christine Wrenzycki^{1,3,*}

¹ *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover;*

² *Anatomisches Institut, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover;*

³ *Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover;*

**Gegenwärtige Adresse: Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz, Justus-Liebig-Universität, Gießen*

Progesteron (P4) spielt eine zentrale Rolle bei der weiblichen Reproduktion. Im Ovar beeinflusst Progesteron das Follikelwachstum, die Ovulation und die Gelbkörperbildung. Seine Wirkungsweise wird durch Bindung an spezifische extrazelluläre oder nukleare Rezeptoren (nPR) vermittelt.

Die angewendeten Kulturbedingungen während der In-vitro-Maturation (IVM), wie beispielsweise die Sauerstoffkonzentration, bedingen maßgeblich die Entwicklungs-kompetenz boviner Oozyten. Die verwendeten Reifungsmedien werden zum Schutz vor Evaporation mit Mineral- oder Paraffinöl überschichtet. P4 diffundiert aufgrund seines lipophilen Charakters in das Öl.

In der vorliegenden Studie wurde das Proteinexpressionsmuster des nPR (Isoformen A, B und C) in Kumulus-Oozyten-Komplexen (KOK), deren Reifung unter 5% bzw. 20% O₂ und mit oder ohne Ölüberschichtung erfolgte, mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert.

Kumuluszellen (CC) und Oozyten (OO) wurden separat voneinander in folgende Gruppen unterteilt:

- | | |
|--|---|
| [1] CC von unreifen OO (n=120) | [6] Gereifte OO (20% O ₂ - Öl, n=243) |
| [2] Ungereife OO (n=245) | [7] CC von gereiften OO (5% O ₂ + Öl, n=118) |
| [3] CC von gereiften OO (20% O ₂ + Öl, n=120) | [8] Gereifte OO (5% O ₂ + Öl, n=239) |
| [4] Gereifte OO (20% O ₂ + Öl, n=240) | [9] CC von gereiften OO (5% O ₂ - Öl, n=122) |
| [5] CC von gereiften OO (20% O ₂ - Öl, n=121) | [10] Gereifte OO (5% O ₂ - Öl, n=240) |

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion II

Die Maturationsraten waren in den einzelnen Gruppen ähnlich (83-87%).

In den CC der Gruppe 5% ölfrei war eine signifikant höhere relative Proteinmenge der Isoform A als in den CC der Gruppen 5% Öl, 20% ölfrei und unreif (Abb. 1) nachweisbar. Die CC der Gruppe 5% mit Öl wiesen tendenziell weniger relative Proteinmenge der Isoform A auf als die der Gruppe 20% mit Öl. Der Proteingehalt der Isoform B war in CC, die unter 20% O₂ mit Öl gereift wurden im Vergleich zu CC der anderen Gruppen, signifikant erhöht.

Eine signifikante Erhöhung in der relativen Proteinmenge der Isoform C konnte in den CC der Gruppe 20% mit Öl im Vergleich zu denen in den Gruppen 5% mit Öl, 20% ölfrei und unreif festgestellt werden. Die Proteinmengen der Isoformen B und C wurde signifikant durch die O₂-Konzentration beeinflusst. Zusätzlich konnte ein signifikanter Einfluss der Ölüber-schichtung auf die relative Proteinmenge der Isoform B nachgewiesen werden.

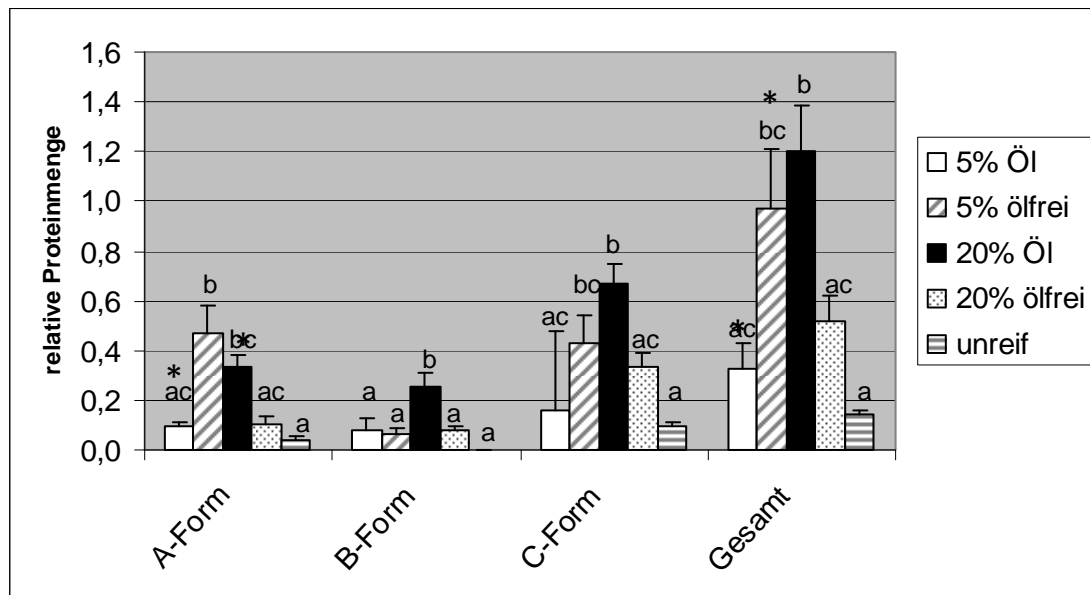


Abbildung 1: Relative Proteinmenge der Isoformen A, B und C des nPR in Kumuluszellen der verschiedenen Gruppen [* = Tendenz (P = 0,08), a:b:c (P = < 0,05) gelten nur innerhalb der unterschiedlichen Isoformen]

In den Oozyten konnte nur die Isoform B des nPR detektiert werden. In den Oozyten der Gruppe 20% mit Öl konnte signifikant mehr Protein detektiert werden als in denen der Gruppen 5% mit Öl, 5% ölfrei und unreif (Abb. 2). Außerdem wurde ein signifikanter Einfluss zwischen der Expression der Isoform B des nPR und der Ölüberschichtung des Reifungsmediums sowie der O₂-Konzentration während der Reifung ermittelt.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion II

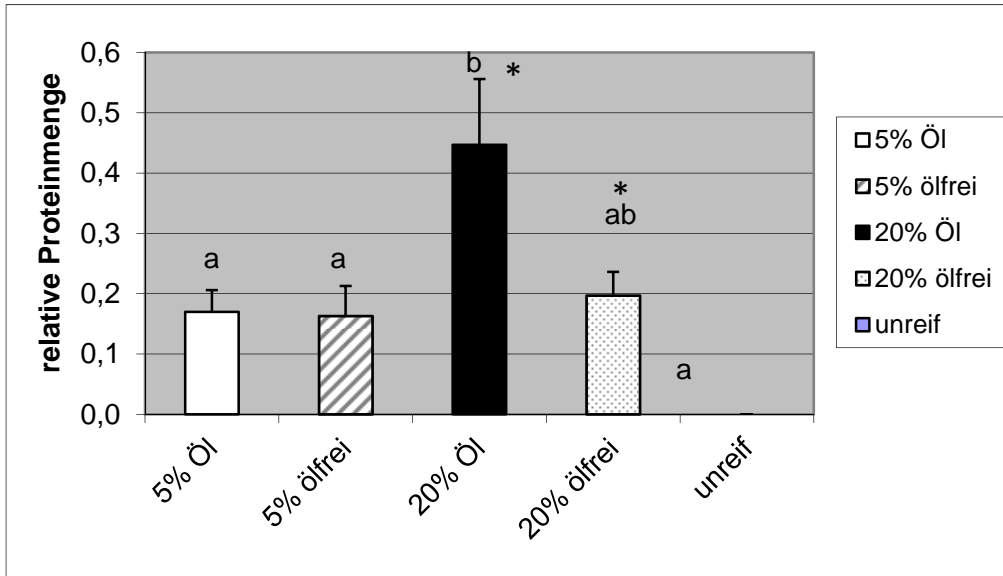


Abbildung 2: Relative Proteinmenge der Isoform B des nPR in Oozyten der verschiedenen Gruppen
[* = Tendenz ($P = 0,08$), [a:b ($P < 0,05$)]

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der nPR an der Maturation boviner Oozyten beteiligt ist und dass dessen Expression von den Reifungsbedingungen abhängig ist.

Für die finanzielle Unterstützung des Projektes wird dem Förderverein Biotechnologieforschung (FBF) e.V. gedankt.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion II

Konjugierte Linolsäuren beeinflussen die Qualität in vitro produzierter boviner Embryonen

H. Stinshoff^{1*}, S. Wilkening¹, A. Hanstedt^{1,2}, C. Wrenzycki^{1,2*}

¹Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover

²Reproduktionsmedizinische Einheit der Klinik, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover

*Gegenwärtige Adresse: Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit angeschlossener Tierärztlicher Ambulanz, Justus-Liebig Universität, Gießen

Fertilitätsprobleme bei Hochleistungsmilchkühen resultieren häufig aus der Energiemangelsituation während der peripartalen Periode. Die orale Supplementation von Fetten, insbesondere von konjugierten Linolsäuren (CLA), soll hier Abhilfe schaffen. Der direkte Einfluss der CLA auf die frühembryonale Entwicklung ist noch nicht hinreichend untersucht worden. Die beiden konjugierten Linolsäuren, die hierbei aufgrund ihrer milchfett-reduzierenden Eigenschaften im Fokus des Interesses stehen, sind das t10c12- und das c9t11-Isomer. Das Ziel der gegenwärtigen Studie war es, die Effekte von c9t11- und t10c12-CLA auf die frühembryonale Entwicklung im In-vitro-Modell zu untersuchen.

Insgesamt wurden 2089 Eizellen auf sieben Gruppen verteilt eingesetzt (I: n=476, ohne Supplementation; II: n= 205, 14 mmol L⁻¹ DMSO (Äquivalent zu 2,5µl), III: n= 252, 28 mmol L⁻¹ DMSO (Äquivalent zu 5µl); IV: n=300, 50 µmol L⁻¹ t10c12 CLA in 2,5µl DMSO; V: n=291, 100 µmol L⁻¹ t10c12 CLA in 5µl DMSO; VI: n=311, 50 µmol L⁻¹ c9t11 CLA in 2.5µl DMSO; VII: n=263, 100 µmol L⁻¹ c9t11 CLA in 5µl DMSO).

Die Ermittlung der Teilungs- und Entwicklungsraten erfolgte unter Berücksichtigung des angewandten öl-freien Kultursystems ausschließlich an Tag 8. Expandierte Tag 8-Blastozysten wurden einzeln für die spätere mRNA-Analyse bei -80°C tiefgefroren. In der RT-qPCR waren Transkripte des Fett- und des IGF1-Stoffwechsels Gegenstand der Untersuchungen (FASN, ACAA1, ACAA2, CPT2, SCD1, IGFBP2 und IGFBP4).

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion II

Die Teilungsraten waren weder durch den Zusatz der CLA in jeglicher Konzentration noch durch den Zusatz der Trägersubstanz beeinflusst. Im Gegensatz dazu konnten in der Gruppe II signifikant höhere Entwicklungsraten als in den Gruppen III bis VII, sowie tendenziell höhere Raten als in der Gruppe I ermittelt werden. In den Embryonen der Gruppen I, III, V und VII unterschieden sich die relativen Transkriptmengen der untersuchten Gene nicht. Die Transkriptmenge von FASN, ACAA1, CPT2 und IGFBP2 war in Embryonen der Gruppe II im Vergleich zu denen der Gruppen IV und VI signifikant erhöht. SCD1 und IGFBP4 wurden in Blastozysten, die mit 14 mM DMSO (Gruppe II) supplementiert waren, signifikant höher exprimiert als in solchen, deren Kulturmedium mit 50 μmol c9t11-CLA (Gruppe VI) ergänzt wurde.

Die relative Transkriptmenge von ACAA2 und IGF1R unterschied sich nicht zwischen den Embryonen aller Gruppen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl CLA als auch DMSO die morphologische Entwicklung als auch die molekulare Qualität beeinflussen. Die Unterschiede, die sich in den Blastozysten durch die Zugabe der Trägersubstanz hervorrufen ließen, konnten teilweise durch den Zusatz von c9t11-CLA ($50\mu\text{mol l}^{-1}$) oder t10c12-CLA ($50\mu\text{mol l}^{-1}$) kompensiert werden.

Die Autoren danken der DFG (PAK 286/1; Wr/54/1-1) für die finanzielle Unterstützung sowie Doris Müller und Katharina Knauer für ihre Unterstützung im Labor.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion II

Korrelation zwischen dem Geneexpressionsprofil einer bovinen 2-Zellblastomere und dem Entwicklungspotential der korrespondierenden Schwesterblastomere.

Eva Held, Dessie Salilew Wondim, Dawit Testfaye, Karl Schellander, Michael Hölker

Institut für Tierwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung, Universität Bonn

Seit einigen Jahren hat sich die Methode der Genexpressionsanalyse mittels MicroArrays als fester Bestandteil zur Ermittlung entwicklungsrelevanter Kandidatengene etabliert. So konnte gezeigt werden, dass bestimmte Phänotypen mit der Expremierung bestimmter Gene korrelieren. Allerdings sind Genexpressionsanalysen invasiv, was eine weitere Entwicklung der analysierten Eizellen und Embryonen verhindert und deshalb nur eine indirekte Korrelation von Entwicklungspotential und Expressionsprofilen ermöglicht. Um dieses Problem zu umgehen, biopsierten wir in der Vergangenheit Blastozysten, transferrierten eine Hälfte auf Empfängertiere und werteten andere Hälfte molekulargenetisch aus. So konnten Kandidatengene ermittelt werden, die mit der Initiation von Trächtigkeiten auf der einen Seite und mit Resorption und Trächtigkeitsverlusten auf der anderen Seite korrelierten.

In der vorliegenden Studie wurde diese Methode auf 2-Zell Embryonen übertragen. Hierzu wurde die Zona Pellucida entfernt und die beiden Schwesterblastomeren getrennt. Eine Blastomere wurde individuell in einen Well-in-Well Kultursystem weiterkultiviert während die Schwesterblastomere eingefroren wurde. An Tag 3 und Tag 7 wurden Teilungs- und Blastozystenraten gezählt und die eingefrorenen Blastomeren nach der Entwicklung ihrer korrespondierenden Schwesterblastomeren in drei Gruppen zu je 15 Blastomeren gepoolt: I Blastomeren die sich nach der Trennung nicht weiter teilten (2CB), II Blastomeren, die vor der Genomaktivierung stehen blieben (8CB) und III Blastomeren, die sich zur Blastozyste entwickelten (BL) (Abbildung 1). Das Geneexpressionsprofil wurde mit dem EmbryoGENE MicroArray analysiert (fold change ≥ 1.5 , $P \leq 0.05$, $FDR \leq 0.1$). Insgesamt wurden 771 bzw. 190 Gene zwischen der entwicklungs kompetenten Gruppe (BL) und den inkompetenten Gruppen (2CB bzw. 8CB) differentiell reguliert. Nach Analyse mittels DAVID und IPA Software zeigte sich, dass molekulare Funktionen und Stoffwechselwege, wie antioxidative Aktivität, oxidative Phosphorylierung und die oxidative Stressantwort am stärksten betroffen waren. Innerhalb dieser

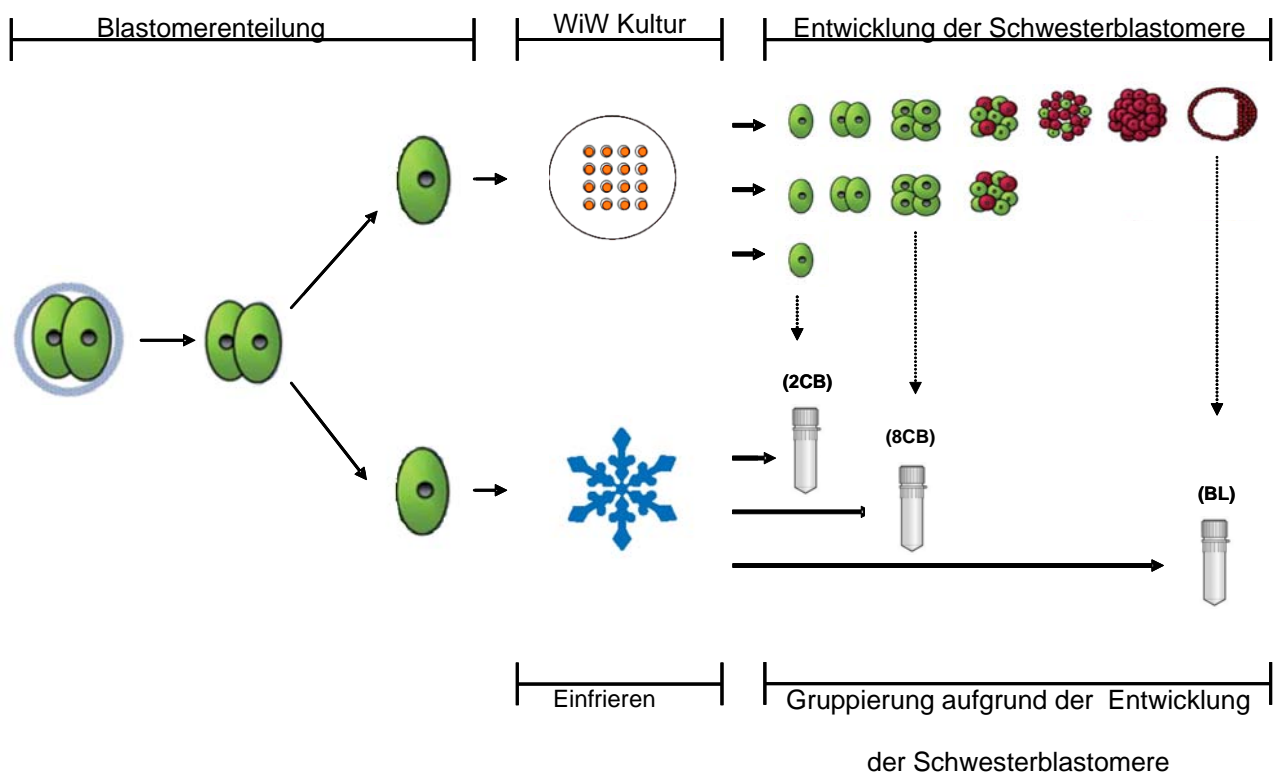
39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion II

funktionellen Gruppen, selektierten wir einige Gene (*NDUFS1*, *MAPK14*, *CAT*, *PRDX1* und *PRDX6*), die als mögliche Kandidatengene für die spätere Entwicklung zur Blastozyste fungieren könnten. Zur weiteren Verifizierung dieser Kandidatengene, quantifizierten wir deren Regulation in frühen und späten 2-Zellern, einem anerkannten Modell für Entwicklungskompetenz.

Darüber hinaus wurde mit Hilfe der ROS- Färbung die Akkumulation von freien Radikalen in früh-, spät- und ungeteilten Embryonen ermittelt. Hier zeigte sich, dass in früh geteilten Embryonen nur sehr geringe Mengen an freien Radikalen zu finden sind, hingegen fanden wir in spät- und ungeteilten Embryonen massive Anreicherungen an freien Radikalen, entsprechend der vorangegangenen Genexpressionstudien.

In dieser Studie konnten wir somit zeigen, dass bereits im 2- Zell Rinderembryo ein Genexpressionsmuster vorliegt, welches mit dem späteren Entwicklungspotential korreliert.

Abbildung 1: Versuchsaufbau



39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion II

Qualitätsbeurteilung von *in vitro* produzierten Rinderembryonen mittels Lebendbeobachtung

A Beck¹, M Reichenbach², H D Reichenbach³, F Habermann⁴, G Arnold⁵, E Wolf^{1,2}

¹*Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, LMU München;* ²*Bayerisches Forschungszentrum für Fortpflanzungsbiologie (BFZF) e.V.;* ³*Institut für Tierzucht, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Grub;* ⁴*Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie, LMU München;* ⁵*LAFUGA, Genzentrum, LMU München*

Die Lebendbeobachtung von Embryonen *in vitro* bietet eine einfache und sichere Methode, das Entwicklungspotential eines Embryos schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt zu bestimmen. Dies ist besonders von Vorteil, wenn nur wenige Eizellen eines Tieres verfügbar sind. Um die Trächtigkeitsrate zu optimieren, muss zu einem frühen Zeitpunkt der beste Embryo ausgewählt werden. Um Parameter zur Qualitätsbeurteilung fest zu legen, wurde ein Kamerasystem zur Lebendbeobachtung getestet.

Das in diesem Versuch verwendete Beobachtungssystem (Primo Vision, Cryo Innovation) besteht aus einer Kontrolleinheit mit eigener Software und einem Bildschirm, die sich außerhalb des Brutschranks befinden. Einer Kameraeinheit innerhalb des Brutschranks ermöglicht eine durchgehende Beobachtung des Embryos ohne die Entwicklung durch äußere Umwelteinflüsse zu stören.

Zur individuellen Identifikation der einzelnen Embryonen wurden spezielle Well-of-Well (WOW)-Schälchen (Cryo Innovation) verwendet, die eine optimale Kultur einzelner Embryonen erlauben. Für die *in vitro* Produktion der Embryonen wurden Eizellen aus Ovarien aus dem Schlachthof gewonnen. Nach 23-stündiger Maturation und 18-stündiger Fertilisation wurden die Embryonen in die WOW-Schälchen eingesetzt. Die Entwicklung jedes einzelnen Embryos wurde 7 Tage lang dokumentiert, wobei alle 5 Minuten Bilder in mehreren Ebenen aufgezeichnet wurden. Bei der Auswertung von Zeitraffervideos wurde ein besonderes Augenmerk auf den Zeitpunkt der ersten und zweiten Zellteilung gelegt. Als weiteres Merkmal zur Qualitätsbestimmung dienten morphologische Auffälligkeiten die während den Teilungen beobachtet werden konnten.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion II

Bei der Auswertung der Daten von 90 Embryonen zeigte sich folgendes: Für den Zeitpunkt der ersten Zellteilung ergab sich ein weites Zeitfenster (22 hpi bis 47 hpi).

Es zeigte sich jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) zwischen der Teilungszeit der Embryonen, die das Blastocystenstadium erreichten und denen, die in einem früheren Stadium arretierten. Bei Embryonen, die sich bis zur Blastocyste entwickelten, fand die erste Zellteilung deutlich früher statt. Der Zeitpunkt der zweiten Zellteilung hatte keinen Einfluss auf die Entwicklungskapazität.

Bei der morphologischen Beurteilung der Teilungen konnten vier Auffälligkeiten beobachtet werden: Keine Teilung, ungleichmäßige Teilung, Fragmentierung, direkte Teilung vom 1- zum 3- oder 4- Zeller.

Anhand dieser Daten werden in Zukunft Embryonen mit hoher oder geringer Entwicklungskapazität ausgewählt und weiteren Analysen unterzogen um die Fehlerquellen während der frühen Embryogenese weiter aufzudecken.

Tabelle 1: Zeitpunkt der ersten Zellteilung

| Zeitpunkt 1. Teilung | n | Blastocysten | |
|----------------------|----|--------------|---------|
| | | Anzahl | Rate |
| 24-28 h | 23 | 14 | 60,87 % |
| 28-32 h | 51 | 15 | 29,41 % |
| > 32 h | 16 | 2 | 12,50 % |
| Total | 90 | 31 | 34,44 % |

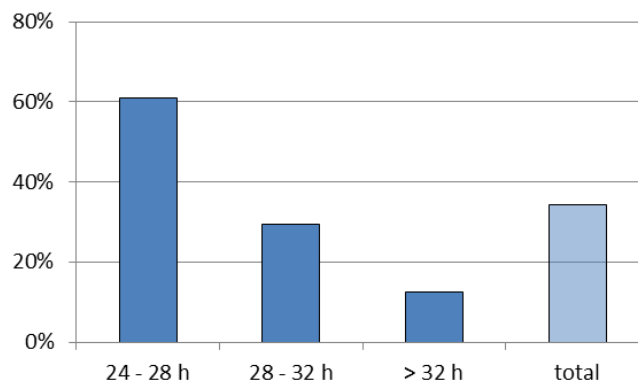


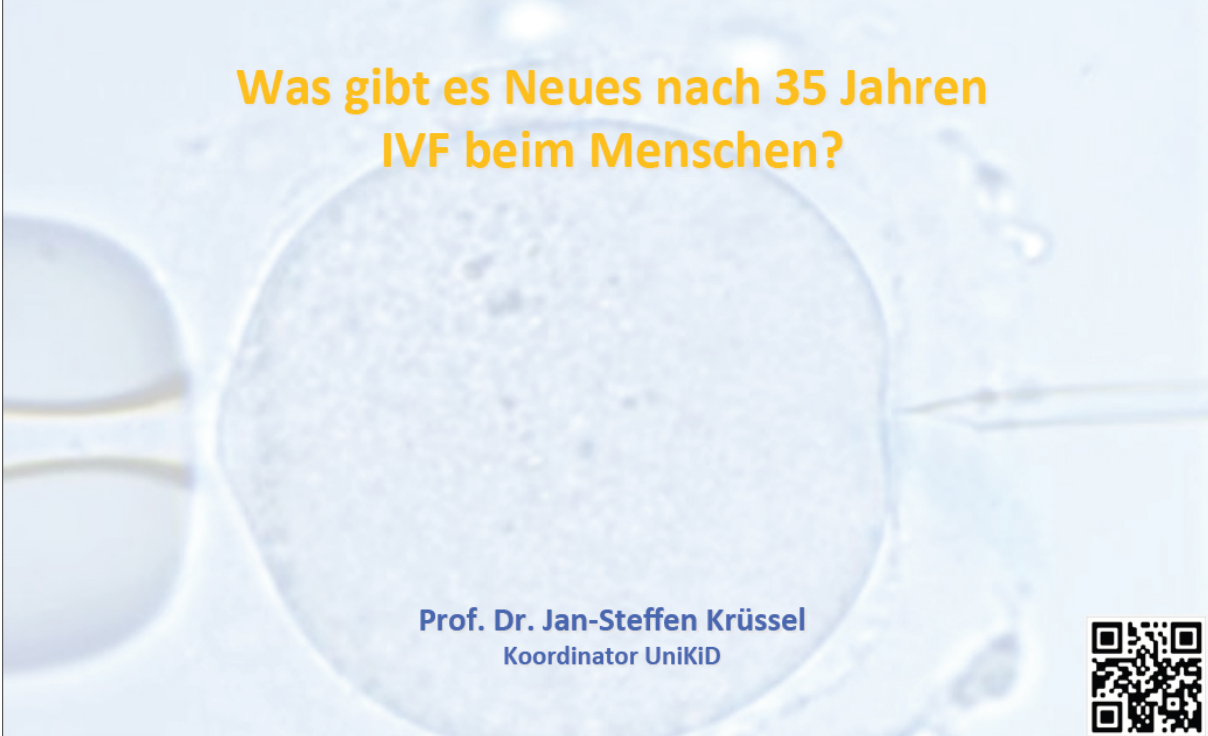
Abb.1: Einfluss der ersten Zellteilung auf die Blastocystenrate

Sektion III

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion III

Was gibt es Neues nach 35 Jahren IVF beim Menschen?

J.-S. Krüssel, Universitäres interdisziplinäres Kinderwunschzentrum Düsseldorf




Universitätsklinikum
Düsseldorf

UniKid
Universitäres Interdisziplinäres
Kinderwunschzentrum Düsseldorf

HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Was gibt es Neues nach 35 Jahren
IVF beim Menschen?**

Prof. Dr. Jan-Steffen Krüssel
Koordinator UniKiD



Frauenklinik

Sie finden den Vortrag gesondert in der Tagungsmappe.

Auswirkungen zweier Vitrifikationsverfahren auf die morphologische und molekulare Qualität in vitro produzierter boviner Embryonen

Katharina Beuing¹, Hanna Stinshoff^{1,*}, Sandra Wilkening¹, Christine Wrenzycki^{1,2,*}

¹ *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

² *Reproduktionsmedizinische Einheiten der Kliniken, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

**Gegenwärtige Adresse: Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz, Justus-Liebig-Universität, Gießen*

Die Vitrifikation scheint eine kosten- und zeitsparende Alternative zum konventionellen Einfrieren von Embryonen darzustellen. Die Qualität der Embryonen nach der Vitrifikation hängt von verschiedenen Faktoren ab. Einen entscheidenden Einfluss hat die Auswahl der Vitrifikationsmedien, bei denen meist ein Gemisch aus penetrierenden und nicht-penetrierenden Kryoprotektiva verwendet wird, um die Toxizität der Einzelsubstanzen zu verringern. Als Kryoprotektiva kommen unter anderem Ethylenglycol, Glycerin, Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Makromoleküle wie beispielsweise Ficoll in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen zum Einsatz. Vor allem die Verwendung von DMSO als Kryoprotektivum wird aufgrund seiner zelltoxischen Eigenschaften kontrovers diskutiert.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss zweier Vitrifikationsmedien auf die morphologische und molekulare Qualität boviner in vitro generierter Embryonen untersucht. Die Vitrifikation und das Auftauen von expandierten Tag 7 Blastozysten, die aus einem Standard-IVP-System (SOFaa) stammten, erfolgte entweder mit einem kommerziell erhältlichen Vitrifikationskit, das DMSO enthielt (V1), oder mit einem, welches kein DMSO enthielt (V2). Embryonen, die zwei weiteren Gruppen zugeordnet wurden, hatten nur Kontakt mit den jeweiligen Einfrier- respektive Auftaumedi- en, ohne tatsächlich kryokonserviert worden zu sein (KV1 – Kontakt zum DMSO-haltigen Medium, KV2-Kontakt zum DMSO-freien Medium). Nach der Vitrifikation und dem Auftauen erfolgten weitere 48 Stunden der Kultur, um nach 24h bzw. 48h die Reexpansions- und Schlupfraten zu ermitteln (Tabelle 1).

Die Analyse der geschlüpften Blastozysten der jeweiligen Gruppen erfolgte mittels einer Lebend-Tot-Färbung oder einer RT-qPCR. In der molekularen Analyse wurde die relative Transkriptmenge von SLC2A1, HSP1A1, IFNT2, TJP1, DSC2 und PTGS2 bestimmt. Als Standard dienten für diese Analysen nicht vitrifizierte geschlüpften Blastozysten, die keinen Kontakt zu den Vitrifikationsmedien (K) hatten.

Die Analyse der relativen Transkriptmengen von IFNT2 und PTGS2 wies keine Unterschiede zwischen den Embryonen der einzelnen Gruppen auf. Die Expression von SLC2A1 war in den Embryonen der V1-Gruppe signifikant niedriger als in den Embryonen aller anderen Gruppen. In den Blastozysten der Gruppen V1 und KV2 konnten signifikant weniger TJP1 Transkripte nachgewiesen werden als in denen der Kontrollgruppe K. Tendenziell waren in den Embryonen der V2-Gruppe ebenfalls weniger TJP1-Transkripte als in den Embryonen der Kontrollgruppe darstellbar. Blastozysten die nach dem

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion III

KV1- oder dem V2-Protokol behandelt wurden, wiesen eine geringere Menge an HSP1A1- und DSC2-Transkripten auf als die Blastozysten der anderen beiden Versuchsgruppen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Vitrifikation mit DMSO-haltigen Medien in Bezug auf die morphologischen Kriterien als das bessere Verfahren anzusehen ist. Allerdings werden auf molekularer Ebene durch das DMSO-freie Medium weniger Veränderungen in den Blastozysten hervorgerufen.

Tabelle 1: : Reexpansions- und Schlupfraten Embryonen nach Vitrifikation (V1,V2) und in denen der Kontrollgruppen [(KV1, KV2);(MW ± SEM innerhalb der Spalten: a:b:c p≤ 0,05)]

| Versuchsgruppe | Reexpansionsrate [%] | Schlupfrate [%] |
|----------------|---------------------------|----------------------------|
| V1 (n = 142) | 89,16 ± 1,6 ^a | 62,90 ± 3,68 ^{ac} |
| KV1 (n = 107) | 90,04 ± 3,09 ^a | 69,23 ± 4,54 ^a |
| V2 (n = 163) | 67,03 ± 4,48 ^b | 29,36 ± 4,19 ^b |
| KV2 (n = 104) | 90,01 ± 5,45 ^a | 47,88 ± 6,30 ^c |

Tabelle 2: Gesamtzellzahl, Anzahl lebender und toter Zellen sowie Lebend-Tot-Zellratio in den Embryonen der verschiedenen Versuchsgruppen (MW ± SEM innerhalb der Spalten: a:b p≤ 0,05)]

| Versuchsgruppe | Gesamtzellzahl | Tote Zellen | Lebend-Tot-Zellratio |
|----------------|----------------|--------------|----------------------------|
| V1 (n = 25) | 119,76 ± 29,19 | 10,44 ± 5,93 | 12,49 ± 4,48 ^a |
| KV1 (n = 25) | 120,56 ± 24,20 | 9,48 ± 4,90 | 15,62 ± 10,50 ^a |
| V2 (n = 20) | 123,45 ± 17,95 | 15,40 ± 4,62 | 7,82 ± 3,37 ^b |
| KV2 (n = 25) | 119,00 ± 25,16 | 9,16 ± 2,98 | 13,10 ± 4,83 ^a |
| K (n= 24) | 116,67 ± 23,76 | 8,13 ± 4,04 | 17,00 ± 9,70 ^a |

Das vorliegende Projekt wurde freundlicherweise von der Firma Origio unterstützt.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion III

Einfluss der Umgebung auf die präimplantative Entwicklung von Rinderembryonen

M. Hölker¹, E. Held¹, U. Besenfelder², V. Havlicek², A. Gad¹, D. Salilew Wondim¹,
D. Testfaye¹, K. Schellander¹

¹ *Institut für Tierwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung, Universität Bonn*

² *Reproduktionszentrum-Wieselburg, Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich*

Die In vitro Produktion (IVP) boviner Embryonen ist mittlerweile fest in die züchterische Praxis integriert. Bei der Verwendung von Kumulus-Oozyten-Komplexen aus Schlachthofovarien werden Reifungsraten von 90 %, Befruchtungsraten von 60-70 % und Blastozystenraten von 30-40 % erzielt. Im Gegensatz dazu führt der Transfer von IVP Embryonen zu geringeren Trächtigkeitsraten als der Transfer von gespülten Ex vivo Embryonen. Darüber hinaus lassen sich IVP Embryonen deutlich schlechter kryokonservieren. Während nach Transfer von Ex vivo Blastozysten Trächtigkeitsraten von 50-60 % erreicht werden, führt der Transfer von kryokonservierten IVP-Embryonen (Slow Freezing) nur in 20- 30 % der Transfers zu einer Trächtigkeit.

Die Ursachen für die geringere Überlebensfähigkeit von IVP Embryonen sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vollends geklärt. Diskutiert werden negative Einflüsse der In vitro Reifung, wie auch der Kulturbedingungen während der Entwicklung zur Blastozyste im Brutschrank.

Ziel der vorliegenden Studie war deshalb die Bestimmung der Entwicklungsraten von Rinder-Embryonen aus In vivo und In vitro Produktion in Abhängigkeit zur Reifungs- und Kulturumgebung. Hierzu wurden IVP Embryonen aus der Kultur in CR1aa Medium (10 % Serum, 20 % O₂) zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer frühen präimplantativen Entwicklung endoskopisch in den Eileiter übertragen und an Tag 7 durch eine uterine Embryonenspülung zurück gewonnen. Parallel wurden Ex vivo Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Entwicklung durch eine endoskopische Eileiterspülung gewonnen und In vitro bis Tag 7 weiterkultiviert. Interessanterweise zeigten die IVP Embryonen, transferiert in verschiedenen Entwicklungsstadien, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der späteren Blastozysterate von maximal 30%. Im Gegensatz dazu zeigten alle aus dem Eileiter gespülten Stadien eine signifikant höhere Blastozystenrate von 82-100% (p < 0,05).

In einem weiteren Versuch wurden Blastozysten die sich in verschiedenen Reifungs- und Kulturbedingungen entwickelt hatten mit einem lipophilen Farbstoff (Oil-Red) gefärbt, um mögliche Lipideinlagerungen darzustellen. Hierbei wurde deutlich, dass die Entwicklungs-umgebung nach der Fertilisation, nicht jedoch die Umgebungsbedingungen während der Eizellreifung, das Ausmaß der Lipid-Einlagerung beeinflusste. Blastozysten die sich in CR1aa Medium mit Serumzusatz (10%) entwickelt hatten, zeigten deutlich höhere Lipideinlagerungen als Blastozysten aus CR1aa Medium welches mit bovinem Serum albumin (BSA, 0,4%) angereichert wurde, wohingegen Blastozysten kultiviert in CR1aa Medium mit 0,4% PVA die geringsten Einlagerungen aufwiesen. Die Höhe der Lipideinlagerungen, der mit unterschiedlichen Zusätzen kultivierten Blastozysten, korrelierte zudem mit den Ergebnissen einer Kryotoleranz-Analyse.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf schließen, dass das Entwicklungspotential zur Blastozyste bereits nach der Eizellreifung fixiert ist, wohingegen der Lipidstoffwechsel, als Indikator für die Blastozystenqualität, maßgeblich durch die Entwicklungsumgebung nach der Eizellreifung bestimmt wird.

Sektion IV

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion IV

Die relative Häufigkeit von 2- und 3-Wellen-Zyklen. Ein unkonventioneller, aber beachtenswerter Fertilitätsparameter in Rinderherden.

Schneebeli Jürg; Schauenberg 91; CH-7421 Summaprada; Schweiz

Auf den Ovarien zyklischer Rinder wachsen zwischen aufeinander folgenden Brunsten in der Regel 2 oder 3 Wellen dominanter Follikel [DF] heran. Wie umfangreiche Langzeitbeobachtungen der Ovaritätigkeit an milchwirtschaftlich genutztem Schweizer Braunvieh zeigten (palpatorische Ovarkontrollen alle 1 - 2 Tage), können solche 2- und 3-Wellen-Zyklen [2WZ; 3WZ] nicht als physiologisch äquivalent angesehen werden. Eine signifikant ($p < 0.01$) überproportionale Häufung von 3WZ bei umrindernden Tieren zeigt indirekt, dass potentielle 3WZ [p3WZ], d.h. Lutealphasen, die sich nach einer Belegung zunächst wie 3WZ entwickeln, im Vergleich zu potentiellen 2WZ [p2WZ] subfertil sind.

Bisher wurden bei unbelegten Tieren ($n=312$) 2- und 3WZ in einem Verhältnis von 72% : 28% beobachtet; der entsprechende Wert für Umrinderzyklen ($n=111$) liegt bei 53% : 47%. Bei einer mittleren Trächtigkeitsrate von 0.60 in den erfassten Betrieben, lassen sich daraus separate Trächtigkeitsraten errechnen, deren Wert für p2WZ bei 0.71 und für p3WZ bei 0.32 liegt. Angesichts der grossen Differenz zwischen diesen beiden Werten stellt sich die Frage, inwiefern die relative Häufigkeit von 2- und 3WZ in Rinderherden als Fertilitätsparameter verwendet werden könnte.

Um die Bedeutung unterschiedlich fertiler p2WZ und p3WZ besser abschätzen zu können, wurde anhand von Modellrechnungen geprüft, wie sich die Fertilität einer Herde hypothetisch ändert, wenn die bisher tatsächlich beobachteten Parameter beliebig variiert werden. Bei diesen Simulationen zeigte sich, dass die Reproduktionsleistung von Rinderherden generell wesentlich differenzierter als bisher üblich beurteilt werden kann, sobald zusätzlich zur Trächtigkeitsrate auch bekannt ist, wie häufig 2- und 3WZ bei unbelegten und bei umrindernden Tieren vorkommen. Dank dieser Parameter lässt sich anhand eines einfachen grafischen Auswertungsschemas objektiv ermitteln, inwiefern die Trächtigkeitsrate einer bestimmten Herde eher als stabile oder leicht veränderliche Grösse anzusehen ist, und inwiefern in dieser Herde eher einheitliche oder heterogene Fertilitätsleistungen der Einzeltiere zu erwarten sind.

Das Auswertungsschema erlaubt es einerseits, den Reproduktionsstatus einer Herde unabhängig von herdenfremden Referenzdaten zu beurteilen, andererseits bietet es sich aber auch für Herden- oder Rassenvergleiche an. Im Rahmen des ET könnte es deshalb dazu verwendet werden, Herden oder Rassen ausfindig zu machen, deren Tiere besonders gute Empfängereigenschaften aufweisen.

Zumindest vorderhand wird die Umsetzung der vorgestellten Methode zur differenzierten Beurteilung der Herdenfertilität dadurch erschwert, dass die Ermittlung der relativen Häufigkeiten der 2- und 3WZ in Rinderpopulationen mit erheblichem diagnostischem Aufwand verbunden ist. Vereinfachungen des absichtlich völlig flexibel konzipierten Verfahrens sind aber durchaus denkbar, wenn sich etwa zeigen sollte, dass ein Teil der Variablen durch allenfalls leistungs- oder rassespezifische Werte ersetzt werden kann. In welchem Umfang solche Anpassungen möglich sind, bleibt zu prüfen, denn alle bisher verfügbaren realen Daten stammen aus Braunviehbetrieben mit nicht sehr unterschiedlichen Leistungsniveaus.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion IV

Beziehungen zwischen der Gelbkörperentwicklung nach Follikelaspiration

und Qualitätsmerkmalen von Brunstfollikeln bei Milchkühen

A. Vernunft, J. M. Weitzel, T. Viergutz

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf

Zur Untersuchung von Regulationsmechanismen des Ovulationsprozesses oder aber der In-vivo-Oozytenreifung ergeben sich Aufgabestellungen, die eine sichere Identifizierung des präovulatorischen Follikels in vivo bedingen. Mittels ultraschallgeleiteter Follikelpunktion ergibt sich die Möglichkeit definierte Substrate (Follikelflüssigkeiten, Granulosazellen, Oozyten) von ausgesuchten Follikeln in vivo zu gewinnen, oder Substanzen und Oozyten (intrafollikulärer Gametentransfer) zu injizieren ohne die anschließenden Ovarfunktionen nachhaltig zu stören. Hanstedt et al. berichteten, dass nach der Follikelinjektion von Kontrolllösungen in 43 Brunstfollikel bei Färsen, in allen Fällen eine zeitgerechte Ovulation und Gelbkörperentwicklung erfolgte (aet-d 2010). Zur Identifizierung des Brunstfollikels kann der Kliniker die Follikelentwicklung (Wachstum), Follikelgröße und Vaskularisierung der Follikelwand ultrasonografisch erfassen. Retrospektiv können dafür auch die Steroidkonzentrationen der gewonnenen Follikelflüssigkeiten genutzt werden. In dieser Untersuchung wollten wir Zusammenhänge zwischen den klinisch vor der Aspiration verfügbaren Informationen sowie den Steroidgehalten in der Follikelflüssigkeit und der folgenden Gelbkörperentwicklung darstellen und so der Frage nachgehen, inwieweit sich die Gelbkörperentwicklung nach der Aspiration eines dominanten Follikels zur retrospektiven qualitativen Einschätzung des Brunstfollikels eignet.

Für die Untersuchungen wurden ultrasonografische Follikel- und Gelbkörpervermessungen, sowie Follikelflüssigkeits- und Blutproben ausgewertet, die wiederholt an 20 HF-Milchkühen im Zeitraum um den 30., 70. und 100. Tag post partum (dpp) gewonnen wurden. Die Follikelpunktionen erfolgten 21 Stunden nach einer GnRH-Gabe, die sich an eine 54 Stunden zuvor erfolgte PGF_{2α}-Injektion anschloss. Die Follikelaspiration erfolgte mittels ultraschallgeleiteter Follikelpunktion mit einer 55 cm langen einlumigen 17 G Ovum Pick-Up Aspirationskanüle (V-OPAA-1755, Cook Australia Pty Ltd, AU) und einer direkt angesetzten 10-ml-Einmalspritze, wobei alle Follikel mit einem Durchmesser von mindestens 12 mm getrennt aspiriert wurden. Die Follikelpunktionen konnten bei 12 Tieren um den 30. dpp, bei 14 um den 70. dpp und bei 18 Tieren um den 100. dpp durchgeführt werden; 2 Tiere blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum azyklisch. Vor der Aspiration wurden die Follikelentwicklung, der Follikeldurchmesser und die Follikelwanddurchblutung mit dem MicroMaxx[®] Ultraschallsystem von SonoSite erfasst. Nach Ablauf von 14 Tagen wurden die Ovarien mit dem gleichen Gerät untersucht und Durchmesser, Umfang und Fläche der Gelbkörper erfasst. Lagen zu dem Untersuchungszeitpunkt zwei Gelbkörper vor, so wurden ihre Querschnittsflächen zur Auswertung addiert, wies der Gelbkörper eine Höhle auf, so wurde die Höhlenfläche zur Ermittlung der Gelbkörpergewebefläche pro Tier subtrahiert. In Blutproben, die 14 Tage nach der Aspiration gewonnen wurden, wie auch in den gewonnenen Follikelflüssigkeiten wurden die Konzentrationen an Progesteron (P4) und 17-beta-Östradiol (E2) mittels H³-RIA ermittelt. Bei der statistischen Auswertung der Follikelflüssigkeiten wurden nur Daten von zuvor als dominant klassifizierten Follikeln berücksichtigt, die sich eindeutig einem Gelbkörper bzw. ausbleibender Gelbkörperentwicklung zuordnen ließen.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion IV

Insgesamt entwickelte sich bei 82 % der Aspirations Sitzungen ein Gelbkörper nach der Follikelaspiration, in 18 % entwickelte sich kein sichtbarer Gelbkörper oder die Tiere kamen in der Woche nach der Aspiration erneut in Brunst. Eine Abhängigkeit des Ausbleiben einer Gelbkörperentwicklung, der Gelbkörpergröße (Fläche) oder der Funktion (P4-Plasmakonzentration) von dem Aspirationszeitpunkt (30.-100. dpp) oder der Aspirationsanzahl (1. -3. Aspiration) wurde in unserer Untersuchung nicht gesehen. Insgesamt wurde eine positive Korrelation zwischen der Gelbkörpergewebefläche und der P4-Plasmakonzentration festgestellt ($r = 0,54$; $p = 0,003$; Spearman-Corr.), die sich als linearer Zusammenhang beschreiben lässt ($P4 = 0,57 + (1,254 \times \text{Fläche in cm}^2)$; $p < 0,001$). Der Durchmesser eines Follikels, aus dem ein Gelbkörper entstand, wies zwar keinen Zusammenhang mit der späteren Gelbkörpergröße auf, jedoch bestand eine positive Korrelation zur späteren P4-Plasmakonzentration ($r = 0,52$; $p = 0,02$). Vergleicht man die Konzentrationen von Progesteron (P4) und 17-beta-Östradiol (E2) in den Follikelflüssigkeiten von dominanten Follikeln, aus denen ein Gelbkörper entstand und denen ohne anschließende Gelbkörperentwicklung, so waren die P4-Konzentrationen vergleichbar ($578 \pm 79 \text{ ng/ml}$ vs. $398 \pm 84 \text{ ng/ml}$; $p = 0,2$), jedoch die E2-Konzentrationen signifikant höher in den dominanten Follikeln, aus denen ein Gelbkörper entstand ($206 \pm 23 \text{ ng/ml}$ vs. $64 \pm 29 \text{ ng/ml}$, $p = 0,004$; t-Test). Es korrelierten die P4-Konzentrationen in den Follikelflüssigkeiten von dominanten Follikeln, aus denen ein Gelbkörper entstand, positiv mit der Fläche des sich entwickelten Gelbkörpers ($r = 0,48$, $p = 0,04$), jedoch waren in unseren Untersuchungen weder P4 noch E2 in der Follikelflüssigkeit geeignet um Hinweise auf die spätere sekretorische Funktion des Gelbkörpers (P4-Plasmakonzentration) zu erhalten.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen der Gelbkörperentwicklung und Qualitätsparametern eines Brunstfollikels bestehen. Gemessen an der Gelbkörperentwicklung, bestehen bei der Gewinnung oder Applikation von Substraten von oder in Brunstfollikel von Milchkühen nach Brunst- und Ovulationsinduktion für wissenschaftliche Experimente, in bis zu einem Fünftel der genutzten Follikel Zweifel über ihre physiologischen Eigenschaften. Zwar zeigten auch die dominanten Follikel, aus denen sich kein Gelbkörper nach der Aspiration entwickelte, eine kurz vor der Ovulation zu erwartende typische Verschiebung der Steroidgehalte zugunsten des Progesterons, allerdings könnten die verminderten Östradiolkonzentrationen bereits auf eine unzureichende Follikelentwicklung vor der Ovulationsinduktion hinweisen. Unter praktischen Gesichtspunkten stellt sich daher erneut die Frage, in wie weit sich durch Brunst- und Ovulationsinduktion bei Milchkühen fertile Brunsten erzeugen lassen. Die Untersuchungen zeigten aber auch, dass der Praktiker über die Beschaffenheit des Brunstfollikels (Follikeldurchmesser) und der Gelbkörpergröße Hinweise auf die sekretorische Funktion eines Gelbkörpers erlangen kann.

Nutzung einer laparoskopisch intrauterinen terminorientierten Einmalbesamung beim Schwein zur Erzeugung gering-divers entwickelter Embryonen

BRÜSSOW K-P¹, TORNER H¹, RÁTKY J²

¹Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf, ²Forschungsinstitut für Tierzucht und Tierernährung (ÁTK) Herceghalom, Ungarn

Allgemein erfolgt eine zweifache terminorientierte Besamung, um beim Schwein Embryonen für unterschiedliche biotechnologische Anwendungen zu erzeugen. Jedoch können sich sowohl durch eine Variation im Ovulationszeitpunkt als auch durch die Befruchtung der Oozyten durch Spermien der ersten und/oder zweiten Besamung Unterschiede in der Embryonenentwicklung ergeben. Oftmals besteht aber der Bedarf, 'ausgeglichene' Embryonenstadien zu gewinnen und die Diversität in der Entwicklung der Embryonen zu minimieren. Eine einmalige laparoskopisch-intrauterine terminorientierte Besamung könnte dazu genutzt werden, um die Diversität in der Entwicklung von Schweineembryonen zu beeinflussen. Das Potential einer laparoskopisch intrauterinen Insemination (LIUI) wurden bisher beim Spermien vermittelten Gentransfer (Fantinati *et al.* Theriogenology 2005) und bei Untersuchungen zur Spermienmigration im Eileiter (Brüssow *et al.* J Reprod Dev 2006, 2011) genutzt.

Ziel der Untersuchung war es, die Befruchtungserfolge sowie die Entwicklung und die Diversität von Embryonen nach einer LIUI zu analysieren. Insgesamt 48 puberale Jungsaugen (JS) der Deutschen Landrasse wurden untersucht. Die JS wurden Östrus synchronisiert (15 Tage Regumate®; Stimulation des Follikelwachstums mit 850 IE eCG 24h nach der letzten Regumate®-Fütterung; Ovulationsinduktion mit 500 IE hCG 80h nach eCG). Die LIUI erfolgte 31h nach der hCG-Applikation. Dazu wurden die Ketamin/Azaperon-anästhesierten JS in Rückenlage fixiert und ein Pneumoperitoneum erzeugt. Anschließend wurden drei Trokarhülsen für die Optik und die Instrumente in das Abdomen eingeführt. Die Ausführung und Beobachtung der laparoskopischen Manipulationen erfolgte über einen TV-Monitor. Zur Besamung wurde das jeweilige Uterushorn vorsichtig mit einer atraumatischen Faszange 10-15cm kaudal der utero-tubalen Verbindung fixiert und die Uteruswand an dieser Stelle mit einem 2,5mm-Trokar punktiert. Durch diesen Trokar erfolgte die Einführung eines 2,2mm-Katheters (Rüsch-Ernährungssonde) etwa 3cm tief in das Uteruslumen und 20ml verdünntes Frischsperma (32,2 x 10⁶ Spermien/ml; 65% Motilität) wurden infundiert. Die Embryonen wurden am Tag 2 (n=25) bzw. am Tag 3 (n=23) aus dem Genitaltrakt gespült.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion IV

Die Ergebnisse der Embryonengewinnung und entwicklung sind in Tabelle 1 dargestellt. Die mittlere Eizellengewinnungsrate betrug $68 \pm 17\%$; 45 der 48 JS (93.8%) wiesen befruchtete Eizellen auf und 76.1% der gewonnenen Eizellen waren Embryonen im 2- und 4-Zellstadium.

Tabelle 1. Ovarreaktion, Eizellengewinnung und Embryonenentwicklung nach terminorientierter LIUI bei JS

| Gruppe (Tieranzahl) | Anzahl Ovulationen (MW \pm SD) | Anzahl Eizellen (MW \pm SD) | Anzahl Embryonen (MW \pm SD) | JS mit 2- Zellembryonen | JS mit 2- / IV- Zellembryonen | JS mit 4- Zellembryonen |
|------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Tag 2 (n=25) | 580 (23,2 \pm 9,2) | 420 (16,8 \pm 8,2) | 270 (10,8 \pm 8,8) | 16 (72,2%) | 5 (22,7%) | 1 (4,6%) |
| Tag 3 (n=23) | 571 (24,8 \pm 9,1) | 358 (15,6 \pm 5,9) | 322 (14,0 \pm 7,2) | 1 (4,3%) | 0 (0%) | 22 (95,7) |

Durch die einmaligen terminorientierten LIUI konnte eine hohe Befruchtungsrate und ein hoher Anteil einheitlich entwickelter (nicht-diverser) Embryonen erzeugt werden. Dabei konnte zusätzlich die Anzahl Spermien je Besamungsdosis um 75% verringert werden.

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion IV

‘Environmental improvement‘

Strategien zur Verbesserung der Haltungsbedingungen bei Zuchtbullen

B Hoyer^{1,2}; J Detterer²; H Hackbarth³; S Meinecke-Tillmann¹

¹*Institut für Reproduktionsbiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

²*Besamungs- und ET-Station Georgsheil, Südbrookmerland*

³*Institut für Tierschutz und Verhalten, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

Bei den Nutztierspezies erregen die Themen Tierschutz und Wohlbefinden der Tiere zunehmend gesellschaftliche und politische Aufmerksamkeit. Ziel des vorliegenden Projektes ist es, die Haltungsbedingungen von Zuchtbullen in Einzelhaltung zu verbessern und die Effekte einer angereicherten und damit verbesserten Umgebung auf das Verhalten (allgemeines Verhalten und Sexualverhalten) sowie Spermaparameter zu analysieren.

Vier Jung- und vier Altbullen der Besamungs- und ET-Station Georgsheil sind in die Untersuchungen einbezogen und werden in chronologisch aufeinander folgenden Versuchsphasen 1, 2 und 3 getestet. In den Phasen 1 und 3 (3 bzw. 13 Wochen) findet die Bullenhaltung, wie auf der Station üblich, konventionell statt (Boxen: 18 m² Fläche, glatte Betonrückwand, Front- und Seitenbegrenzungen aus vertikalen, abgerundeten Metallstangen, Selbstfanggitter an der Frontseite, Selbsttränkebecken an der Frontseite außen, Holzmehleinstreu). In Versuchsphase 2 (10 Wochen) erfolgt die Unterbringung der Bullen unter verbesserten Bedingungen [Boxen: wie oben beschrieben, jedoch ausgestattet mit 29,6 m² Fläche + 3 Anreicherungsobjekten (eine schwingende Kuhbürste, ein in 1,20 m Höhe an einer Kette hängender, frei schwingender Autoreifen sowie ein fast senkrecht an der seitlichen Boxenabgrenzung angebrachter, 35 cm dicker Eichenstamm mit Rinde (Durchmesser: 35 cm, Neigungswinkel: 7°)].

Die Bewegungs- und Wiederkauaktivität der Bullen wird über den gesamten Versuchszeitraum mit dem RuminAct[®]-System (Milklina) aufgezeichnet. Weiterhin erfolgt dreimal pro Versuchsphase eine jeweils 24-stündige Videoüberwachung der Probanden. Zusätzlich wird ihr Verhalten während der einmal wöchentlich stattfindenden Samengewinnung erfasst. Anhand der RuminAct[®]-Messungen und der digitalisierten

39. Jahrestagung der AET-d Zusammenfassungen der Vorträge Sektion IV

Filmsequenzen werden individuelle Ethogramme erstellt. Die in den Versuchsperioden gewonnenen Ejakulate werden einer spermatologischen Standarduntersuchung unterzogen.

Bisher haben vier der Bullen den Versuchszeitraum komplett durchlaufen, so dass einige vorläufige Ergebnisse der Untersuchung präsentiert werden können:

Das RuminAct®-System hat sich als geeignetes Hilfsmittel zur Erfassung der Bewegungsaktivität und des Wiederkauverhalten von Zuchtbullen erwiesen.

Die Bewegungsaktivität der Bullen weist keine deutlichen individuellen oder altersabhängigen Unterschiede auf. Sie nimmt an den Wochenenden gegenüber den anderen Wochentagen ab, steigt jedoch an den Tagen der Samengewinnung. Nachts ist die Bewegungsaktivität im Vergleich zum Tag vermindert. Die Wiederkauaktivität hingegen ist an den Absamtagen geringer, als an den anderen Wochentagen. Während der Arbeitspausen des Personals (Frühstücks- und Mittagspause), in der Nacht und am Wochenende ist sie dagegen höher, als an den normalen Arbeitstagen bzw. den Hauptarbeitszeiten des Stallpersonals (zwischen 7:00 – 16:30) außerhalb der Pausen. Die Wiederkauaktivität weist altersabhängige Unterschiede auf (höhere Aktivität bei Jungbullen). Es waren keine auffallenden Unterschiede hinsichtlich Bewegungs- und Wiederkauaktivität zwischen den Versuchsperioden zu verzeichnen.

Alle Anreicherungsobjekte werden von den Bullen sehr gut angenommen. Die Verhaltensbeobachtungen zeigen, dass sich die Altbullen tagsüber (6:00 – 18:00 Uhr) 5,2 min/h und die Jungbullen 5,0 min/h mit den Objekten beschäftigen. In der Nacht gebrauchen die Altbullen die Anreicherungsobjekte 1,1 min/h und die Jungbullen 1,3 min/h.

Die drei Objekte werden von den Bullen unterschiedlich stark frequentiert. Auffällig ist das über alle Phasen bestehende Körperpflege-(Grooming)-Bedürfnis der Bullen. Bevorzugt wird deswegen die schwingende Kuhbürste. Jungbulle 2 nutzt ebenso wie die Altbullen 1 und 2 am häufigsten die Bürste (Jungbulle: 1,7 min/h; Altbulle 1: 1,9 min/h; Altbulle 2: 2,4 min/h). Jungbulle 1 bevorzugt dagegen den Reifen (1,3 min/h).

Die Kooperationsbereitschaft der Jungbullen während der Samengewinnung ist in Versuchsphase 2 besser als in Phase 1, während bei den Altbullen keine Unterschiede im Versuchsverlauf festzustellen sind. Veränderungen der analysierten Spermaparameter sind bisher nicht zu beobachten.