

AET-d

Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder

41. Jahrestagung

5. und 6. Juni 2014 in Longsdorf - Luxembourg



www.aet-d.de



 **CONVIS**
LUXEMBOURG

Frank Becker, Hans-Peter Nohner

Familie Vaessen

AET-d

Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer
deutschsprachiger Länder

www.aet-d.de

41. Jahrestagung in Longsdorf-Luxembourg

5. und 6. Juni 2014

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

Goldspensoren 2014



Silbersponsoren 2014



CONSARCTIC[®]



zoetis[™]

Bronzesponsoren 2014



Weitere Sponsoren 2014



Sponsorenadressen

Goldsponsoren

CONVIS s.c.
4, Zone Artisanale et Commerciale
L-9085 Ettelbruck

Hanff s.à r.l. et cie, s.e.c.s.
53-54, ZA Triangle Vert
L-5691 Ellange

Repro-Val -
Centre de Collecte et de Stockage d'Embryons Longsdorf
4, am Duerf
L-9459 Longsdorf

Silbersponsoren

Consarctic GmbH
Postfach 1133
63821 Schöllkrippen

IMV Technologies
Rue Clemenceau, Postfach 61300
L'Aigle, France

Zoetis Deutschland GmbH
Schellingstr. 1
10785 Berlin

Bronzesponsoren

Embryotrans Biotech ApS
Nyvej 16B
DK-1851 Frederiksberg

MINITÜB GmbH
Hauptstrasse 41
84184 Tiefenbach

RMP Medizinische Produkte
Eyber Straße 74
91522 Ansbach-Eyb

Weitere Sponsoren

Bodinco B.V.
Hofdijkstraat 2, 1814 EC Alkmaar
The Netherlands

Pharmanovo GmbH
Sudetenstr. 19
30559 Hannover

Programm

Donnerstag, 5. Juni 2014

- 9:00 – 11:30 Praktikerseminar** -Hans-Peter Nohner
Jungrinderspülung – ein zunehmender Faktor in der
ET-Praxis (Seminar und praktische Demonstration
verschiedener Spültechniken im Stall)
- 12:00 Registrierung und Willkommen** – kleiner Imbiss
- 13:00 Begrüßung** – Frank Becker, 1. Sprecher AET-d
- 13:10 Eröffnung**
Die Milchrinderzucht in Luxembourg – früher und heute.
A. Braun - Zuchtleiter CONVIS
-
- 13:30-15:00 Sektion I -** 11
ET ein wichtiges Instrument der Zucht
Leitung: Frank Becker
-
- 13:30 40 Jahre AET-d – eine bemerkenswerte Geschichte!** 12
J. Detterer – Georgsheil
- 14:00-14:45 Genomische Revolution in der Milchrinderzucht –** 14
Chancen und Grenzen
S. Rensing – Verden
- 14:45-15:00 ET in Kasachstan – ein Erfahrungsbericht** 16
H.P. Nohner – Neustadt a.d. Aisch
- 15:00-15:45 Kaffeepause und Industrieausstellung**

Donnerstag, 5. Juni 2014

- 15:45-17:15 Sektion II** 17
Management von Donoren
Leitung: Jan Detterer
-
- 15:45-16:30 Einfluss des Ernährungszustandes der Spenderkühe: Beeinflussung der Embryonenzahl und -qualität durch Insulin** 18
C. Ponsart, G. Gamarra, S. Lacaze, A.A. Ponter –
Boussy Saint Antoine, Paris, Maisons-Alfort Cedex, Jouy-en-Josas
- 16:30-16:45 Erfahrungsbericht Embryotransfer in Paraguay** 21
J. Westfal, A. Görlach, H. Werle, R. Westfal
- 16:45-17:00 Einfluss verschiedener Gestagene und des Zeitpunkts der Prostaglandinbehandlung auf die Embryonenausbeute bei superovulierten Ziegen** 22
M. Camacho, D. Garza, M. Gaulty, W. Holtz – Göttingen
- 17:00-17:15 Effekte der Fütterungssupplementierung mit pansengeschützten konjugierten Linolsäuren auf die Qualität boviner Eizellen und Embryonen** 24
A.F. González-Serrano, C.R. Ferreira, V. Pirro, A. Lucas-Hahn,
J. Heinzmann, K.G. Hadelar, U. Baulain, P. Aldag, U. Meyer,
M. Piechotta, G. Jahreis, S. Dänicke, R.G. Cooks, H. Niemann –
Neustadt, West Lafayette, Turin, Braunschweig, Hannover, Jena
- 17:15-19:00 Allgemeine Diskussion zum ET auf dem Rundgang und der Vorstellung des Zuchtbetriebes VaLor Holsteins** 26
von Henri und Marc Vaessen, Longsdorf
- Embryotransfer in Luxemburg** 28
Marianne Vaessen, Longsdorf
- Ab 19:30 Gemeinsames Barbecue beim Restaurant Faust**
(Tagungsort)

Freitag, 6. Juni 2014

8:30–10:15	Sektion III In vitro Techniken	29
	Leitung: Christine Wrenzycki	
8:30-9:15	Exploring potential circulatory miRNAs in bovine follicular fluid associated with follicular growth and oocyte developmental competence	30
	D. Tesfaye – Bonn	
9:15-9:30	Einfluss post-ovulatorischer Alterung auf Entwicklung und Methylierungsmuster boviner Oozyten und Embryonen	31
	J. Heinzmann, F. Mattern, P. Aldag, A. Lucas-Hahn, C. Wrenzycki, T. Haaf, H. Niemann – Mariensee, Würzburg, Gießen	
9:30-9:45	Comparison between two vitrification methods for in vitro produced bovine embryos	33
	M.N. Saucedo, M. Reichenbach, M. Kurome, H.-D. Reichenbach, E. Wolf – Grub	
9:45-10:00	Einfluss verschiedener Vitrifikationsverfahren und Auftaumedien auf die in vitro Entwicklung von Mäuseembryonen	35
	D. Garza, M. Camacho, M. Gauly, W. Holtz – Göttingen	
10:00-10:15	Embryonalentwicklung und Embryonenqualität bei präpuberalen und adulten Spendern nach Supplementierung mit cAMP Modulatoren während der in-vitro-Maturation boviner Oozyten	37
	S.M. Bernal, J. Heinzmann, D. Herrmann, U. Baulain, K.G. Hadelers, P. Aldag, A. Lucas-Hahn, H. Niemann – Neustadt, Bogotá	
10:15–11:00	Kaffeepause und Industrieausstellung	
11:00–13:45	Sektion IV Physiologie und Besamung sowie assoziierte Techniken	39
	Leitung: Martin Gehring	
11:00-11:10	Präsentation von Zoetis	40
11:10-11:30	Embryonengewinnung bei superovulierten Kühen nach Besamung mit x-sortiertem Sperm – funktioniert das?	43
	J. Detterer – Georgsheil	

Freitag, 6. Juni 2014

- 11:30-11:45 Verlauf der Steroidhormonkonzentrationen während der in-vivo- und in-vitro-Maturation boviner Oozyten - Erste Ergebnisse** 45
C. Blaschka, H. Stinshoff, F. Poppicht, C. Wrenzycki – Gießen
- 11:45-12:00 Ultraschallgeleitete Follikelinjektion – eine Methode zur In-vivo-Überprüfung von Ergebnissen aus bovinen Follikelzellkulturen** 47
A.Vernunft, T. Viergutz, V. Röttgen und J. Weitzel – Dummerstorf
- 12:00-12:15 Einfluss von exogen supplementiertem Progesteron auf das bovine Corpus luteum während der Frühträchtigkeit** 49
J. Punsmann, H. Stinshoff, S. Wilkening, J. Queck, J. Detterer, S. Meinecke-Tillmann, C. Wrenzycki – Hannover, Gießen, Georgsheil
- 12:15-12:30 Eigenarten des Luteinisierungsverlaufes und des Follikelwachstums bei zyklischen, frühgraviden und erfolglos belegten Rindern** 51
J. Schneebeili – Summaprada
- 12:30-12:45 Verfahrensgestaltung in modernen Besamungseberstationen** 52
M. Schulze – Schönöw
- 12:45-13:00 Einfluss von Milchleistung, Eiweißgehalt und Körperkondition von hochleistenden Rindern auf die Wahrscheinlichkeit von Anovulationen und embryonalen Verlusten** 53
A.Boldt, A. Römer, F. Becker – Dummerstorf
- 13:00-13:15 Vergleich des Brunstverhaltens von Jungrindern bei induzierten und natürlichen Brunsten** 55
V. Röttgen, J. Schön, F. Becker – Dummerstorf
- 13:15-13:20 Präsentation von EmbryoTransBiotech**
- 13:20-13:45 Allgemeine Diskussion zur weiteren Gestaltung der AET-d**
Leitung: Frank Becker
- 13:45 Verabschiedung - Einladung zur 42. Jahrestagung AET-d und kleiner Imbiss**

Zusammenfassungen der Vorträge

Sektion I

ET ein wichtiges Instrument der Zucht

40 Jahre AET-d – eine bemerkenswerte Geschichte!

Jan Detterer

Besamungs- und ET-Station Georgsheil, Südbrookmerland

Am 14.10.1974 wurde in München die deutschsprachige Embryotransfergruppe gegründet.

Die Gründungsmitglieder in München waren Horst Kräußlich, Werner Leidl, Rudolph Hahn und Joachim Hahn. Letzterer war bis 1991 Sprecher dieser Gruppe. Ihm folgten im 2-jährigen Wechsel Sprecher aus Praxis und Wissenschaft, nämlich Wolfgang Lampeter, Heiner Niemann, Heinrich Tenhumberg, Wilhelm Kanitz, Albert Görlach, Christine Wrenzycki, Jan Detterer, Sabine Meinecke-Tillmann, Martin Gehring, Michael Hölker, Uwe Küchenmeister und Frank Becker.

Seit 1974 hat die Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d), wie sich die Embryotransfer-Arbeitstagung seit 1992 nennt, jährlich an verschiedenen Orten im deutschen Sprachraum getagt. Mit den Tagungen in Landquart (1988) in der Schweiz, in Maria Taferl (1993) in Österreich und in diesem Jahr in Longsdorf in Luxemburg haben in allen vier deutschsprachigen Ländern Tagungen der AET-d stattgefunden. Nach der Wende 1989 war die Teilnahme für alle ET-Schaffenden aus den neuen Bundesländern offen, und die Kollegen aus der Wissenschaft und Praxis wurden harmonisch in die AET-d integriert. Im Programm der Tagung in Oldenburg (i.O) 1990 waren bereits fünf Vorträge aus Ostdeutschland vertreten.

Bei den ersten Treffen Mitte der 70er Jahre, bei der auch praktische Demonstrationen durchgeführt wurden, ging es in erster Linie um einen Erfahrungsaustausch der verschiedenen Arbeitsgruppen in Deutschland zur Superovulation, zur Embryonengewinnung, zum Transfer und zur Tiefgefrierung. Ende der 70er Jahre standen aber auch schon die In-vitro-Befruchtung und die Mikromanipulation auf dem Programm,

Ein weiterer Arbeitsschwerpunkt war die Entwicklung von Richtlinien zum Embryotransfer. 1977 gab der deutsche Schwarzbuntzuchtverband erste Richtlinien zum Embryotransfer heraus. Unter der Federführung der AET-d wurden dann die ADR-Richtlinien zum ET Ende der 80er Jahre entworfen. Diese flossen später auch in das Tierzuchtgesetz ein.

Aus diesen anfänglichen Arbeitstagungen entwickelte sich zunehmend eine Tagung mit Vorträgen. Hierbei stand stets der intensive Austausch zwischen Wissenschaft und Praxis im Vordergrund. Sie bietet vor allem jungen Wissenschaftlern die Möglichkeit zur Ergebnispräsentation in einem relativ lockeren Rahmen und die Praxis bekommt die Gelegenheit, ihre Probleme und Fragen an die Wissenschaft zu richten.

Aus den kleinen Arbeitstreffen mit 10 – 15 Teilnehmern entwickelte sich eine über Deutschlands Grenzen hinaus bekannte Tagung, die von 100 bis 150 Teilnehmern besucht wird. Dabei wurden die Entwicklungen und Probleme des ETs beim Rind und anderer Spezies vorgetragen und diskutiert.

Die Tagung beginnt traditionell an einem Donnerstagnachmittag und endet am Freitagmittag. Seit zwei Jahren wird am Donnerstagvormittag ein Workshop für ET-Praktiker angeboten. Ein wichtiger Bestandteil ist die Abendveranstaltung am Donnerstag. Dank großzügiger Unterstützung durch die Zucht- und Besamungsorganisationen und der Industrie war es über Jahre möglich, die Tagung der AET-d ganz ohne Tagungsgebühren durchzuführen.

Weiterhin ist es bemerkenswert, dass jährliche Veranstaltungen auf diesem Niveau ohne eine feste Organisationstruktur und ohne Anbindung an eine größere Gesellschaft 40 Jahre ohne Unterbrechung durchgeführt werden konnten.

Zur Vorbereitung dieses Vortrages habe ich bereits einige Unterlagen sammeln können. Zum Aufbau eines Archivs zur AET-d können Unterlagen zu den Tagungen, Bilder oder andere Materialien an Jan Detterer geschickt werden (Besamungs- und ET-Station Georgsheil, Am Bahndamm 4, 26624 Südbrookmerland; eMail: jan.detterer@vost.de)

Literatur:

Joachim Hahn (2007)

Zur Geschichte des Embryotransfers, Teil II: Embryotransfer beim Rind ab 1970

In Tagungsband der 14. Jahrestagung Geschichte der Gynäkologie und Andrologie der Haustiere S. 13 -15

Danksagung:

Für die Übersendung von Unterlagen aus der Anfangszeit der AET-d und weiteren Informationen danke ich herzlich:

Wilhelm Gehring, Joachim Hahn und Heiner Niemann

Frank Becker, Gottfried Brem und Sabine Meinecke-Tillmann

Genomische Revolution in der Milchrinderzucht - Chancen und Grenzen

Stefan Rensing, Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w.V., Heideweg 1, 27337 Verden/Germany (stefan.rensing@vit.de)

Die Einführung genomischer Zuchtwerte (gZW) in Deutschland 2010 bei Holsteins und 2011 bei Fleckvieh hat insbesondere bei Holsteins innerhalb kürzester Zeit in allen züchterisch führenden Ländern zu gravierenden Änderungen in den Zuchtprogrammen geführt. Vergleichbar ist das Ausmaß nur mit den Folgen der in den 1950er Jahren flächendeckend eingeführten künstlichen Besamung, die seither die Basis für die Testbullen-Wartebullen-Vererber-Zuchtprogramme war. Da für die individuelle Selektion ausreichend sichere gZW bereits für Kälber vorliegen, begrenzt heute in erster Linie die Geschlechtsfähigkeit das Generationsintervall. Besamungsvererber können schon mit einem Jahr statt vorher mindestens 5 Jahren selektiert werden, und die Bullenmütterselektion kann bereits bei Jung-rindern mit der gleichen gZW-Sicherheit wie für Bullen erfolgen. Insgesamt kann dadurch der Zuchtfortschritt verdoppelt werden. Somit ist die Bezeichnung „Revolution“ durchaus gerechtfertigt.

Genomische Zuchtwertschätzung beruht auf dem Vergleich von möglichst sicheren konventionellen Zuchtwerten, die für töchtergeprüfte Bullen vorliegen, mit dem genetischen Muster. Dieses wird durch die Genotypisierung von 54.000 SNP-Markern (Single Nucleotide Polymorphism) ermittelt. Die Bullen, an denen die Beziehung von SNP-Markern und sicherem konventionellem ZW abgeleitet wird, bilden die Referenzpopulation oder Lernstichprobe. Die Sicherheit der gZW ist daher abhängig von der Anzahl Bullen und der Sicherheit von deren konventionellen Zuchtwerten. Die Länder mit großen konventionellen Holstein-Testprogrammen - allen voran die USA und Deutschland - haben somit die besten Voraussetzungen für sichere gZW. Die Sicherheiten der gZW für junge Tiere aus dem deutschen genomischen Schätzsystem mit inzwischen über 27.000 töchtergeprüften KB-Bullen in der Holstein-Referenzpopulation reichen von knapp 50% z.B. für Töchterfruchtbarkeit bis 76% für Zellzahl. Diese Sicherheiten entsprechen etwa der Sicherheit, die ein klassisch töchtergeprüfter Bulle mit seinen ersten veröffentlichten Zuchtwerten auf Basis von den ersten 30-50 Töchtern erreicht. Inzwischen gibt es drei Jahrgänge Besamungsbullen für die 2010 nur genomische Informationen vorlagen, die inzwischen aber mit über 100 Töchtern töchtergeprüft sind. Diese fast 2.000 Bullen erfüllen fast exakt die Erwartungen, d.h. die mittleren Töchter-ZW entsprechen den früheren nur-genomischen ZW, und die mittleren Abweichungen der einzelnen Bullen nach unten und oben sind normalverteilt und korrespondieren mit dem Sicherheitszuwachs.

Die Selektionen im Rahmen der Besamungs-Zuchtprogramme wurden innerhalb kurzer Zeit auf die neuen Möglichkeiten umgestellt, so dass 2013 über 12.000 Bullenkälber typisiert d.h. genomisch geprüft wurden, wovon dann weniger als 500 Bullen für die Besamung selektiert wurden. Als Bullenväter werden inzwischen fast ausschließlich die besten einjährigen genomischen Bullen genutzt, und die Bullenmütter sind bei der Anpaarung vorwiegend die vielversprechendsten Jungrinder, die zunehmend selbst genotypisiert und streng anhand gZW selektiert sind. Da Bullenmütter ein wesentlicher Teil der für Embryotransfer genutzten Tiere sind, hat sich der Schwerpunkt der ETs von Kühen Richtung Jungrindern verschoben. Die Akzeptanz nur genomisch geprüfter Besamungsbullen in der breiten Praxis hat etwas länger gedauert. Inzwischen liegt der Anteil Besamungen mit Jungvererbern aber bei fast 2/3 und steigt weiter an. Dazu beigetragen hat sicher auch die Bestätigung der Zuchtwerte bei einzelnen wichtigen Bullen. Entscheidend aber dürfte das deutlich höhere Zuchtwertniveau der angebotenen jungen genomischen Vererber im Vergleich zu den töchtergeprüften Vererbern sein.

Außer der allgemeinen Steigerung des Zuchtfortschrittes eröffnet die genomische Selektion zusätzliche Möglichkeiten. Genotypisierungen erlauben auch Vorhersagen zum genetischen Status bezüglich Besonderheiten wie Rotfaktor oder Hornlosigkeit, aber auch von Gendefekten. Ein systematisches, erfolgreiches Hornlos-Zuchtprogramm war erst mit der Einführung von Genomics möglich und hat zumindest bei Rotbunt bereits Eingang in die Praxis gefunden. Durch Haplotypen-Analysen können genetische Defekte aufgespürt werden, die zum embryonalen Fröhrtod führen. Der Nachweis erfolgt darüber, dass bestimmte Kombinationen von väterlichem und mütterlichem Erbgut (Haplotypen) in einer der beiden reinerbigen Kombinationen bei den lebenden Nachkommen nicht vorkommen, obwohl eine Häufigkeit von 25% erwartet wird. 2

Die erfolgreiche Umsetzung einer effektiven genomischen Selektion bei Holsteins kann aber auch Risiken beinhalten. Genomische Vererber sind im Mittel deutlich höher veranlagt, als die verfügbaren töchtergeprüften Bullen. Da sich der einzelne genomische Vererber aber mit zunehmender ZW-Sicherheit später noch deutlich verändern kann, sollte innerhalb Betrieb keine zu starke Konzentration des Bulleneinsatzes erfolgen, sondern es sollten zeitgleich möglichst immer mehrere genomische Vererber mit begrenzter Portionszahl eingesetzt werden. Bereits beim Einsatz von z.B. drei Bullen verringert sich das Risiko gegenüber einem Einzelbullen, dass diese als Gruppe später deutlich niedrigere Töchter-ZW haben um fast 90%.

Die Auswirkungen der intensiven Selektion auf die Steigerung der Inzuchtrate werden kontrovers diskutiert. Grundsätzlich hängt die Steigerung der Inzucht eng mit dem Zuchtfortschritt zusammen, denn Ziel der Zucht ist die Verringerung der Streuung durch Ausschluss der Negativ-Varianten zumindest für die Zuchtziel-Merkmale. Ein deutlich kürzeres Generationsintervall und höherer Zuchtfortschritt sollte daher eine schnellere Zunahme des Inzuchtgrades zur Folge haben. In der Praxis bekommen aber heute gleichzeitig deutlich mehr verschiedene Bullenväter ein Chance, und es werden Bullenkälber aus Blutlinien/Familien genomisch getestet, die früher aufgrund der begrenzten Testkapazität und der hohen Kosten für eine Nachkommenprüfung keine Chance erhalten hätten. In der Praxis sind daher bisher keine deutlichen Auswirkungen auf die Inzuchtrate erkennbar.

Die sehr erfolgreiche genomischen Selektion bei Holsteins kann mittelfristig auch eine Bedrohung für die Rassevielfalt werden. Die meisten anderen Milch-Rassen haben aufgrund der geringeren Populationsgröße nur eine geringe oder keine Chance auf eine ausreichend große Bullen-Referenzpopulation zur Ableitung aussagefähiger gZW und damit effektiver genomischer Selektion und vergleichbarem Zuchtfortschritt. Die weltweite Dominanz der Holsteins als Milchviehrasse dürfte dadurch mittelfristig zunehmen. Dies auch, da die genomische Selektion diversifizierte Zuchtprogramme ökonomisch sinnvoll auch für immer mehr spezielle Anforderungen erlaubt (Marktnischen). Die genomische Selektion wirft aber auch für Holstein Fragen auf. Die Referenzpopulation muss laufend aktualisiert werden, damit sie weiterhin die aktuelle Beziehung zwischen den SNP-Markern und der tatsächlichen Vererbung abbildet. Dies geschieht in praxi auch, da die eingesetzten genomischen Vererber nach drei Jahren Töchterinformationen erhalten. Die Anzahl der neuen Bullen mit Töchterzuchtwerten ist/wird jedoch deutlich geringer und die Bullen sind sehr streng selektiert, repräsentieren also nicht mehr das ganze genetische Spektrum der Population. Kurz- und mittelfristig bedeutender ist jedoch, dass die genomische Selektion für neue Merkmale – z.B. Gesundheitsmerkmale - praktisch nicht eingeführt werden kann. Es würde viele Jahre dauern bis genügend Bullen töchterbasierte ZW für ein neues Merkmal haben und damit eine ausreichend große Referenzpopulation vorhanden ist. Es müssen also neue Methoden entwickelt werden (z.B. auf Basis von Kuh-Referenzpopulationen), damit die genomische Selektion um neue Merkmale erweitert werden kann.

Insgesamt bietet die genomische Selektion aber so viele Vorteile, dass sie als jetzt bereits bestimmende Grundlage für die Selektion in Holstein-Zuchtprogrammen und Betrieben noch zunehmen wird.

ET in Kasachstan – ein Erfahrungsbericht

Hans-Peter Nohner, BVN

Im Rahmen der Zusammenarbeit des BVN mit der Universität Pavlodar erfolgte 2011 mein erster Besuch in Kasachstan. Das Ziel der Reise bestand darin, den Aufbau eines ET – Services an der Universität Pavlodar zu unterstützen und ein sogenanntes deutsch – kasachisches ET-Zentrum zu gründen. Außerdem stand die Studentenausbildung in Form von Vorlesungen und praktischen Demonstrationen auf dem Programm.

Das Ergebnis des vorbereiteten Embryotransfers :

Spender vorbereitet	Spülungen	Embryonen gesamt	Embryonen tauglich	Embryonen übertragen	Empfänger tragend
4	3	22	5	5	3

Zur Vertiefung ihrer Kenntnisse organisierte ich für zwei kasachische Tierärzte im Jahr 2012 einen dreiwöchigen ET-Lehrgang bei uns an der Besamungsstation in Neustadt a.d. Aisch, wobei sie sich über den Ablauf des Embryotransfers, Vorauswahl von Spender- und Empfängertieren, Vorbereitung und Superovulation, Besamung, Spülung und über das notwendige und teilweise noch fehlende Instrumentarium informierten.

Im November 2013 führte ich einen weiteren ET-Einsatz in Kasachstan durch. Das Ziel der Reise bestand wiederum in der Studentenausbildung und der Durchführung von 6 Spülungen der Rasse Fleckvieh an drei Tagen in einem großen Staatsbetrieb. Die dazu notwendige Vorbereitung wurde genau nach Plan abgewickelt. Hierbei kamen den beiden Tierärzten die in Neustadt a.d. Aisch gewonnenen Erkenntnisse zu Gute.

Ergebnis der Spülungen :

Spender	Embryonen				Transfers	Empf. tragend	%
	Anz.	ufo.	deg.	taugl.			
1	16	0	0	16	5	4	
2	30	10	4	16	2	1	
3	16	0	5	11	6	3	
4	16	0	0	16	3	2	
5	6	0	0	6			
6	Eiter	0	0	0			
6	84	10	9	65	16	10	62,5

10,8

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass durch verbesserte Ausrüstung und Fortbildung der vor Ort tätigen Tierärzte die Erfolgsaussichten für ET-Programme erheblich verbessert werden können.

Sektion II

Management von Donoren

Zum Einfluss des Ernährungszustandes von Spenderkühen: Embryonen durch Insulin bezogene Strategien gewinnen

PONSART C¹, GAMARRA G^{2,3}, LACAZE S³, PONTER A.A.^{4,5}

¹ DVM, PhD, Expert in reproductive technologies and diseases, 101 rue de la Justice, 91800 Boussy Saint Antoine, France (claire.ponsart.vet@gmail.com)

² UNCEIA, R&D, 149 rue de Bercy, 75595 PARIS cedex 12, France

³ MIDATEST, Domaine de Sensacq cidex 55A, 64230 Denguin, France

⁴ Université Paris Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-94704 Maisons-Alfort cedex, France

⁵ INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

Einführung

Die Ernährungs- und Stoffwechselsituation ist mit dem Fortpflanzungserfolg in Kühen assoziiert, aber die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch wenig verstanden (Gutierrez et al, 1997; Gong et al, 2002; Adamiak et al, 2005). Mehrere Autoren haben vorgeschlagen, dass die Stoffwechselsignale wie zirkulierenden Konzentrationen von Insulin, Wachstumshormon (GH), Leptin und Insulin-like growth factor-System (IGF) auf zentraler Ebene interagieren, um die Freisetzung der Gonadotropine zu modulieren (Schneider, 2004; Garnsworthy et al, 2008). Die Qualität der Eizellen scheint die wichtigste Determinante von Embryonen für eine entsprechende Entwicklung zu sein (Seneda et al., 2001) und dies hängt vom physiologischen und Reproduktionsstatus (Alter, Gesundheit und Ernährung) des Spendertieres besonders ab (Majerus et al, 1999; Armstrong, 2001; Boland et al, 2001). Dieser Vortrag beschreibt die verschiedenen Insulin-bezogenen Strategien mit dem Ziel, die Eizell- und Embryonen-Entwicklung zu verbessern.

Lehren aus in vitro Ansätzen

Eine große Anzahl von *in vitro* Studien haben die direkte Wirkung von Stoffwechselfaktoren auf Granulosazellen und Thekazellen gezeigt (Webb et al., 1999a, b; Lucy, 2000; Spicer et al, 2002). Zahlreiche Experimente studierten auch die direkten Auswirkungen der Ernährung auf die folliculären Variablen nach spontaner Ovulation oder Superovulation (Totey et al, 1996; Gong et al, 1993). *In-vitro* Studien haben hervorgehoben, dass Insulin und IGF-1 wichtige Mediatoren der Follikelreifung, Steroid Eizellreifung und der embryonalen Entwicklung sind.

In vivo Fütterungsstrategien

Die Nahrungsaufnahme beeinflusst eine Eierstockaktivität über Wirkungen auf verschiedenen Ebenen der Hypothalamus – Hypophysen – Ovar Achse. Fütterungsänderungen können sich auf Follikelwachstum durch Plasma und/oder Follikelflüssigkeit, Veränderungen der entsprechenden Stoffwechselmetabolite und/oder Hormone, wie Insulin und IGF-1 auswirken (Gutierrez et al, 1997; Landau et al, 2000 ; Gong et al, 2002 ; Diskin et al, 2003; Mihm & Bleach, 2003; Matoba et al, 2013). Die Nahrungsaufnahme kann auch die Eizellenmorphologie und -entwicklungsfähigkeit beeinflussen (O'Callaghan et al. , 2000).

Eine Überfütterung kann sowohl schädlich für die Qualität von Eizellen wie auch für die Embryonen-Erzeugung sein (Mantovani et al, 1993; Papadopoulos et al, 2001; Freret et al, 2006; Santos et al, 2008). Demgegenüber kann eine restriktive Fütterung einen positiven Effekt auf die Eizellenqualität (Lozano et al, 2003) und die *in vitro* Entwicklung von Blastozysten (Freret et al, 2006 ; Armstrong et al, 2001) haben.

Diese Ergebnisse wurden insbesondere durch die Erhöhung der Insulinspiegel und IGF-1 Konzentrationen mit hoher Energieaufnahme bei Färsen erklärt (Freret et al, 2006). Webb et al. (2004) haben die stimulierende Wirkung von Insulin und IGF1 auf das Wachstum der Follikel beschrieben. Auch nach Superovulation kann die Erhöhung der Insulinspiegel während einer kurzen Zeitperiode eine positive Wirkung auf kleine Follikelwachstum haben (Freret et al, 2006). Gleichzeitig kann die Erhöhung der Insulinspiegel die Qualität von Oozyten negativ beeinflussen (Adamiak, 2008; Freret et al, 2006). Deswegen wurden Experimente durchgeführt, um Fortpflanzungserfolg durch Modulation der Insulinkonzentrationen zu verbessern: Insulin Steigerung während der Phase des Follikel -Wachstum (Scaramuzzi et al, 2006) fordern und dann wieder auf die vor - stimulierten Niveau kurz vor dem Eisprung zurückbringen. Zur weiteren Unterstützung dieser Hypothese haben Garnsworthy et al. (2009) zirkulierende Insulinspiegel (hoch und niedrig) bei Milchkühen nach der Geburt über die Ernährung modifiziert. Verbesserte Schwangerschaftsrate wurden mit der folgenden Ernährung bewertet: i) hohen Insulinkonzentrationen zwischen Kalbung und der ersten postnatalen Progesteron Anstieg und ii) niedrigen Insulin bis 120 Tagen nach der Geburt. Zwei Experimente wurden kürzlich mit Spendertieren durchgeführt : Futterrestriktion (FR, 25% Reduktion der Trockenmasseaufnahme) im Vergleich zur ad libitum (AL) Fütterung, kombiniert mit hoher (H) gegenüber niedrigen (L) LH-gabe in den letzten 4 Injektionen des Superovulationsregimes (Bender et al, 2014). Wie erwartet, wurden die zirkulierenden Insulinkonzentrationen in Fr Tieren vermindert (26.7 vs 46.0 μ U/mL). Befruchtungsraten waren höher für die AL -L (89,4 %) und FR- H (80,1 %) Spendertiere als für die AL -H (47,9 %) und FR -L (59,9 %) Gruppen. Spendertiere haben eine geringere Embryo-Produktion nach Superstimulation auf Grund der reduzierten Befruchtungsrate und einen erhöhter Prozentsatz von degenerierten Embryonen nach entweder zu niedriger (FR -L) oder zu hoher (AL -H) Insulin -und LH- Stimulation gezeigt. Daher sollte man die Wechselwirkung zwischen den Gonadotrophinapplikationen und dem Ernährungsprogramm der Spendertiere berücksichtigen.

Insulinbezogene Fütterungsstrategien

Exogene Verabreichung von Insulin erhöht die Rekrutierung der Follikel (Cox et al., 1987) und „rettet“ Follikel aus der Atresie (Matamoros et al., 1991). Die Rollen des IGF-Systems und Insulin erscheinen besonders kritisch. Erhöhte Energiekonzentrationen reduziert IGFBP2 und IGFBP4 Expression in kleinen Follikeln. Im Gegenteil haben Wathes et al. (2008) über eine erhöhte Expression von IGFBP2 in der Leber bei negativer Energiebilanz berichtet. Zusammen mit einer reduzierten IGF-1 Produktion führen diese Veränderungen wahrscheinlich zu einer Beeinträchtigung der Follikelreifung.

Andere Verfahren existieren, um die Insulinsekretion zu modulieren. Beispielsweise kann die Verabreichung von Nahrungsergänzungsmitteln, wie Propylenglykol (PG) den Stoffwechsel beeinflussen. PG wird in der p.p. Behandlung von Ketosen beim Milchrind verwendet. PG erhöht die Plasmaglukose- und Insulinkonzentration; verringert aber nicht die veresterten Fettsäuren (NEFA) und β -Hydroxybutyrat (BHB). Diese Effekte sind nämlich in unterernährten Tieren (Nielsen und Ingvarsen, 2004) zu sehen. In einer aktuellen Studie in Färsen zeigten wir, dass kurzfristig Nahrungspropylenglykol das Follikelwachstum durch erhöhte Niveaus von Glukose und Insulin stimulieren kann: einer Erhöhung der Zahl der kleinen Follikel (1-4 mm) wurde in den ersten Tagen des Sexualzyklus berichtet (Gamarra et al, 2012). Ein zweites Experiment zielte darauf ab, eine tägliche orale Verabreichung von Propylenglykol zu bewerten, um *in vitro* die Embryoproduktion in superovulierten Färsen (16 Holstein Färsen mit restriktiver Fütterung, 600 g pro Tag) zu verbessern (Gamarra et al, 2014). Verabreichung von PG hat deutlich die Anzahl der kleine (2-3 mm) und gesamte Follikel (2-8 mm) an Tag 2 des Zyklus in allen Färsen erhöht. PG hat auch *in vitro* die embryonale Entwicklungsrate (Gesamtzahl der Embryonen / Anzahl der befruchteten Eizellen) in allen Färsen im Vergleich zu der Kontrolle verbessert.

Zusammenfassend öffnen diese Erkenntnisse die Möglichkeit der Verbesserung der Fruchtbarkeit und Embryoqualität durch eine gezielte Ernährung oder Nahrungsergänzungsmittel, basierend auf einer Modulation von zirkulierenden Insulinkonzentrationen.

Referenzen beim Autor.

Erfahrungsbericht Embryotransfer in Paraguay

J. Westfal, A. Görlach, H. Werle, R. Westfal

1998 lud die Unternehmensgruppe Liebrex Paraguay ein, um gemeinsam ein ET-Projekt umzusetzen. Primäres Ziel der Unternehmung war die Ausbildung eines neu gegründeten ET-Teams das die Serviceleistungen von Liebrex erweitern sollte.

Der Projektablauf war in zwei Schritte eingeteilt:

1. Schwerpunkt: praktische Ausbildung (27.April – 01.Mai 1998)
2. Schwerpunkt: Beobachtung und Hilfestellung (11.November – 16.November 1998)

Das Unternehmen bewirtschaftete und beweidete 700.000 ha Land und hielt damals 30.000 Rinder der Rasse Braman, sowie Kreuzungen mit Red Angus und Fleckvieh.

Die züchterische Basis des Unternehmens bildete die Zucht auf Brangus. In Zusammenarbeit mit einem japanischen Genetiker wurden diese Brangus entwickelt, Phänotypisch ähneln diese Tiere eher einem großrahmigen Angus. Jedoch ausgestattet mit den Eigenschaften den klimatischen Bedingungen und der besonderen Vegetation des Chacco in Paraguay zu trotzen, kombiniert mit deutlich besseren Tageszunahmen als reingezogene Bramanen. Als Spendertiere standen 85 Jungrinder der eben beschriebenen Zuchtrichtung zu Verfügung aus denen für jeden Projektschritt 35 Tiere vorbereitet wurden. Die ausgewählten Spendertiere wurden vorsynchronisiert und mit FSH P (75% einer Dosis) superovuliert.

Tag 0: morgens Ohrimplantat Crestar

Tag 1 – Tag 4: morgens u. abends FSH Injektionen

Tag 4: zusätzlich morgens u. abends Prostaglandin; Ohrimplantat entfernen

Tag 6: morgens u. abends KB

Tag 13: Spülung u. Transfer

Als Empfängertiere standen überwiegend reinrassige Braman zur Verfügung, die mit zweimaliger Prostaglandine Injektion im Abstand von 10 Tagen synchronisiert wurden. Dem Transfer ging eine Rektaluntersuchung voraus und anhand der Ovarien- und Gelbkörpergröße ergab sich eine Einteilung in sehr gute, gute und schwache Empfänger.

Die überschüssigen Embryonen wurden in Ethylenglycol mit einem Cryozell 1400 – Einfriergerät tiefgefroren.

Ergebnisse nach 60 Tagen TU:

	Spülungen	Embryonen gesamt	Embryonen tauglich	Embryonen durchschnitt	Embryonen TG	Embryonen Übertragungen
28.04.- 01.05.98	34	408	276	8,1	168	108
12.11.- 15.11.98	34	322	249	7,3	271	102
Braman	1	67	52		52	52

Einfluss verschiedener Gestagene und des Zeitpunkts der Prostaglandin Behandlung auf die Embryonenausbeute bei superovulierten Ziegen

Camacho M¹., Garza D¹., Gauly M¹., Holtz W¹.

¹Department für Nutztierwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen, Albrecht-Thaer-Weg 3, 37075 Göttingen

1 Einleitung

Zur Superovulation von Ziegen hat sich die Verwendung von pFSH in Verbindung mit einer zyklussteuernden Gestagenenbehandlung bewährt (Nowshari et al., 1992; Holtz, 2005). Anstelle der ursprünglich bis zu 18tägigen, geht man neuerdings meist zu einer kurzzeitigen Gestagenbehandlung in Kombination mit Prostaglandin F_{2α} zur Rückbildung noch vorhandener Gelbkörper über. Der Zeitpunkt der Prostaglandinbehandlung wird unterschiedlich gewählt. Teilweise wird die Verabreichung am Anfang der Gestagenapplikation empfohlen (Menchaca et al., 2007), von anderen (Romano, 1996) am Ende. In der vorliegenden Untersuchung wurden im Rahmen der Superovulationsbehandlung mit pFSH zwei gestagenhaltige Vaginalpessare vergleichend untersucht. Gleichzeitig sollte ermittelt werden ob die Verabreichung von Prostaglandin F_{2α} eher zu Anfang oder am Ende einer kurzzeitigen Gestagenenbehandlung erfolgen sollte.

2 Material und Methoden

Bei den intravaginal zu applizierenden Vaginalpessaren handelte sich um ein Schwämmchen aus Polyurethan das 20 mg Fluorogestonacetat (FGA) enthält (Cronolon, Intervet, Frankreich) sowie einer Y-förmigen Kunststoffspange, die mit Silikongummi beschichtet ist und 0,3 g Progesteron enthält (CIDR = controlled intravaginal drug releasing device; EAZY-Breed, Pfizer, Deutschland).

Achtundvierzig Burenziegen im Alter von 2 bis 7 Jahren wurden in vier Gruppen @ 12 aufgeteilt. Gruppe 1 erhielt ein intravaginales Schwämmchen für die Dauer von 7 Tagen. Zu Behandlungsbeginn wurden zwei Dosen von 5 mg PGF_{2α} im Abstand von 12h verabreicht. Gruppe 2 wurde in der gleichen Weise behandelt, außer dass PGF_{2α} zu Behandlungsende verabreicht wurde. In Gruppen 3 und 4 wurde in gleicher Weise verfahren, doch anstelle eines Schwämmchens wurden CIDRs intravaginal appliziert. Bei allen Tieren erfolgte eine Superovulationsbehandlung indem ab 2 Tage vor Ende der Gestagenbehandlung 4, 4, 2, 2, 2 und 2 Armour Units pFSH mit 40% pLH (Nowshari et al., 1995) in 12-stündigen Abständen i.m. verabreicht wurden. Von Behandlungsbeginn bis zur Embryonenspülung erfolgte ein tägliches Ovar-Monitoring per Ultraschall. Nach Behandlungsende wurde in achtstündigen Intervallen eine Brunstdiagnose

vorgenommen. So lange Duldungsbereitschaft bestand, wurden die Tiere täglich gedeckt. Die transzervikale Embryonenspülung erfolgte sieben Tage nach der letzten Belegung, wobei den Tieren 16 Stunden vor der Gewinnung 5 mg PGF_{2α} appliziert wurde um eine Luteolyse herbeizuführen. Anzahl gewonnener Eizellen und Embryonen sowie Gewinnungsrate wurden mit einer Zwei-Wege-Varianzanalyse mit den Effekten Pessartyp und Zeitpunkt der PGF_{2α} Behandlung analysiert; die sonstigen Variablen mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test.

3 Ergebnisse und Diskussion

Von 48 behandelten Ziegen zeigten 46 Brunstanzeichen, woraus abzuleiten ist, dass beide Synchronisationsverfahren ihren Zweck erfüllten. Entsprechende Befunde ermittelten Motlomelo et al. (2002) und Romano (2004). Die mit CIDR behandelten Tiere hatten der Tendenz nach eine höhere Anzahl Ovulation als mit Schwämmchen behandelte (9,7 und 10,0 vs 6,8 und 7,5; P>0.05). Die Anzahl aufgefundener Eizellen und Embryonen reflektiert diese Differenz weniger deutlich, wobei die vergleichsweise unvorteilhaften Auffindungsraten (Anzahl Eizellen und Embryonen in Relation zur Anzahl echographisch ermittelter Gelbkörper) eine Rolle gespielt haben mögen. Diese bewegten sich im Bereich von 36 %, was deutlich unter den Erfahrungswerten bei Anwendung des verwendeten transzervikalen Gewinnungsverfahrens liegt (Holtz et al., 2000; Suyadi et al., 2000). Ob die PGF_{2α} -Verabreichung am Anfang oder am Ende der Gestagenbehandlung erfolgte, hatte ebenfalls keinen Einfluss auf das Spülergebnis. Wenn die Behandlung zu Beginn erfolgte, war die Embryonenqualität (% Transfertaugliche) der Tendenz nach geringfügig besser, was darauf hinweisen könnte, dass während der durch die pFSH Behandlung stimulierten follikulären Entwicklung bezüglich der Progesteronkonzentration relativ einheitliche Verhältnisse vorherrschten (Menchaca und Rubianes, 2002). Andererseits würde für eine Behandlung zum Zeitpunkt des Pessar-Entzugs sprechen, dass sehr frühe Gelbkörperstadien auf eine Prostaglandinbehandlung nicht zu reagieren in der Lage sind.

Abschließend ist festzustellen, dass bezüglich des Synchronisierungsgrades sowie der Qualität der gewonnenen Embryonen die 7tägige Gestagen-Kurzbehandlung in Kombination mit PGF_{2α} – gleich ob mit Scheidenschwämmchen oder CIDR und ob PGF_{2α} am Anfang oder am Ende der Gestagenapplikation – sich voll bewährt hat. Weniger befriedigend fielen die Ovulationsrate von nur durchschnittlich 8,5 sowie die Gewinnungsrate von etwa 36 % aus.

Effekte der Fütterungssupplementierung mit pansengeschützten konjugierten Linolsäuren auf die Qualität boviner Eizellen und Embryonen

AF González-Serrano¹, CR Ferreira², V Pirro³, A Lucas-Hahn¹, J Heinzmann¹, K-G Haderler¹, U Baulain¹, P Aldag¹, U Meyer⁴, M Piechotta⁵, G Jahreis⁶, S Dänicke⁴, RG Cooks² and H Niemann¹

¹Institute of Farm Animal Genetics, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), 31535 Neustadt, Germany; ²Department of Chemistry and Center for Analytical Instrumentation Development, Purdue University, West Lafayette, 47907 IN, USA; ³Department of Chemistry, University of Turin, 10125 Turin, Italy; ⁴Institute of Animal Nutrition, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), 38116 Braunschweig, Germany; ⁵Clinic for Cattle, University of Veterinary Medicine, 30173 Hannover, Germany; ⁶Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University of Jena, 07743 Jena, Germany

Die Linolsäure ist eine für die Ernährung von Wiederkäuern essentielle mehrfach ungesättigte Fettsäure. Als Folge einer unvollständigen Hydrierung der Linolsäure im Pansen werden konjugierte Linolsäuren (CLA / conjugated linoleic acid) gebildet. CLA ist ein Überbegriff für verschiedene Positions-Isomere der Linolsäure, die im Darm adsorbiert werden. In laktierenden Kühen konnte eine Reduzierung des Milchfetts durch Supplementierung mit CLA erreicht werden, auch scheint sich die Supplementierung positiv auf die Reproduktion auszuwirken, da sich die Trächtigkeitsrate erhöht und das Intervall zwischen Abkalbung und erster Ovulation verkürzt wird. Direkte Effekte der Supplementierung mit konjugierten Linolsäuren auf Eizellqualität und Entwicklungspotential von Embryonen sind bisher noch nicht beschrieben worden. In dieser Studie, erhielten Holstein-Friesian Färsen (n=84) entweder eine Mischung pansengeschützter CLA (mindestens 10% *cis9,trans11*-CLA und 10% *trans10,cis12*-CLA) oder pansengeschützte Stearinsäure (C18:0; SA) als Supplementierung zu einer isokalorischen Grassilage-Fütterung. Zwei verschiedene Mengen wurden dabei in zwei Experimenten eingesetzt (100 g/d und 200 g/d). Nach einer initialen Supplementationsphase (45 Tage), wurden die Eizellen mittels Ultraschall-geleiteter Ovum-pick-up (OPU) zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von vier Wochen gewonnen. Oozyten der CLA-supplementierten (n=413) und der SA-supplementierten (n=350) Gruppen wurden *in vitro* gereift, befruchtet und kultiviert, um Reifungs- und Blastozystenraten zu bestimmen. Blut und Follikelflüssigkeit wurden am Anfang und Ende der Supplementationsphase gewonnen, um Cholesterin, IGF1, NEFA und das Fettsäureprofil zu bestimmen. Die Reifungsraten unterschieden sich nicht zwischen den Versuchsgruppen (CLA=73% vs. SA=70%). Die Blastozystenrate in der SA-supplementierten Gruppe war tendenziell niedriger als in der CLA-supplementierten Gruppe (CLA=22,4% vs. SA=13,8%). Während sich die IGF1- und NEFA-Spiegel in beiden Versuchsgruppen ähnlich waren, waren die Lipidprofile in Blut und Follikelflüssigkeit in beiden Versuchsgruppen dosis-abhängig verschieden. Die Cholesterinspiegel wurden durch die CLA-Supplementierung erhöht. Die relative mRNA Expression der Gene *IGF1R*, *GJAI*, *FASN*, *SREBP1* und *SCAP* wurde in einzelnen ungereiften und *in vitro* gereiften Eizellen mittels RT-qPCR analysiert (n=6/Gruppe). *In vivo* gereifte Oozyten, gewonnen durch OPU 20h nach GnRH Injektion, wurden als Kontrolle verwendet. Die relative poly(A⁺) mRNA unterschied sich zwischen den verschiedenen Fütterungsgruppen für die untersuchten Gene nicht; *SCAP* war aber signifikant erniedrigt in *in vitro* gereiften Eizellen von supplementierten Färsen im Vergleich zu *in vivo* gereiften Eizellen, die von nur mit Grassilage gefütterten Tieren stammen.

Die Lipid-Profile wurden von Oozyten CLA- (n=37) und SA- (n=50) supplementierter Tiere mittels Desorptions-Elektrospray Ionisation Massenspektrometrie (DESI-MS) erstellt. Die Fettsäureanalysen mittels DESI-MS ergaben, dass die CLA-Supplementation zu einem Anstieg der Triglyceride 52:3 [TAG (52:3)] und [TAG (52:2)], Squalen, Palmitinsäure (C16:0) und Ölsäure (C18:1), und einer Abnahme von TAG (56:3), TAG (50:2) und TAG (48:1) im Vergleich zu SA-supplementierten Tieren, führte. *In vitro* gereifte Eizellen CLA-supplementierter Tiere zeigten veränderte Lipidprofile, mit einer Anreicherung von TAG (52:3) und TAG (52:2) sowie Phosphatidylinositol 34:1 [Plo (34:1)], während Plasmalogene [PCp (38:4) und Pep (38:4)] und Palmitinsäure (C16:0) im Vergleich zu Oozyten von SA-supplementierten Tieren deutlich erniedrigt waren.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass sich eine Supplementierung mit pansen geschützten Fettsäuren bei Färsen mit hoher Spezifität und Sensitivität in verschiedenen Probenmaterialien (z.B. Blut, Follikelflüssigkeit und Oozyte) nach verfolgen lässt. Die Supplementierung mit CLA hat einen signifikanten Einfluss auf das Lipidmuster in Eizellen gezeigt. Diese Ergebnisse zeigen eine enge Beziehung zwischen Fütterung und Herdenfertilität und unterstützen die Bedeutung des Rindermodells für Untersuchungen von ernährungsabhängigen Fertilitätsstörungen.

Vorstellung des Zuchtbetriebes VaLor Holsteins von Henri und Marc Vaessen, Longsdorf

Lage und Geschichte

Der Betrieb liegt im Kanton Vianden im sogenannten „Éislek“, welches den luxemburgischen Ausläufer der Ardennen darstellt. Er liegt auf einer Höhe von ca. 300 m über dem Meeresspiegel in einer Waldreichen von Hügeln und Tälern gekennzeichneten Region.



Sicht auf die Hofstätte und Umgebung)

Gegründet wurde der Betrieb im Jahre 1798. Anfang der 70er Jahre wurde der Betrieb auf die Milchviehhaltung spezialisiert, was ein Ende der Ochsen-, Schweine- und Hühnerhaltung sowie die Einstellung des Marktfruchtanbaus zur Folge hatte. Im Jahr 1983, als die europäische Milchquote eingeführt wurde zählte die Herde insgesamt 217 Milchkühe.

Bewirtschaftet werden aktuell ca. 100 Hektar Land mit überwiegend schweren lehmigen Böden. Sämtliche Flächen werden zum Futteranbau für die 180 köpfige Milchkuhherde und einen Teil der Nachzucht genutzt. Die Milchleistung liegt aktuell bei 10800 kg Milch bei 3,8 % Fett und 3,3 % Eiweiß.

Der Betrieb befindet sich zurzeit in einem Erweiterungsprozess mit dem Ziel die Herde im Laufe des Jahres 2015 bis auf die aktuelle Kapazitätsgrenze von ca. 250 Milchkühen aufzustocken. Im Rahmen dieser Betriebserweiterung wurde Ende 2012 ein Teil der Färsenaufzucht auf einen Kooperationsbetrieb ausgelagert, Mitte 2013 ein neuer Boxenlaufstall in Betrieb genommen und im Frühjahr 2014 der Umbau des alten Milchviehstalles in einen Jungviehstall abgeschlossen.



Blick in den 2013 fertig gestellten Boxenlaufstall

Zuchtprogramm und Zuchtrichtung

Der Betrieb gilt als einer der ersten des Landes der Anfang der 70er Jahre mit der Eigenbestandsbesamung in Luxemburg begann und ausschließlich Sperma von Nachkommen geprüften Vererbern einsetzte. Zunächst wurde mit holländischen Rot- und Schwarzbunt Bullen gearbeitet um dann Mitte der 70er Jahren komplett auf Holstein-Friesian Vererber zu wechseln. Um den Zuchtrückstand gegenüber den reinrassigen Holsteins aufzuholen wurde zwischen 1981 und 1987 in insgesamt 8 Kuhfamilien mit US amerikanischem Pedigreehintergrund aus dem Zuchtgebiet der OHG investiert.

In dieser Zeit wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Albert Görlach vom Besamungsverein Neustadt Aisch ein ET Programm gestartet was Ende der 80er Jahre zur Gründung der ET Station Longsdorf führte. Seit 1987 wurden keine weiblichen Tiere mehr zugekauft sondern die Selektion der Spendertiere beschränkte sich auf das vorhandene Zuchtmaterial des Betriebes.



August 1990 : ET Donor Karola (v Scheik) mit 51 weiblichen Nachkommen

Die Herde besteht heute zu 90 % aus Mitgliedern der „Sleepy Hollow Apollo Kay“ Familie.

Durch die beständige Nutzung der höchsten Zuchtwertbullen im Rahmen eines kontinuierlichen ET Programmes sowie einer frühen Fokussierung auf Sekundärmerkmale ist VaLor Holsteins seit Jahren die höchste Zuchtwertherde nach RZG in Luxemburg.

Seit dem Jahr 2010 wird neben den Relativzuchtwerten, die Weeks Analyse bzw. das Triple A System bei Anpaarungsentscheidungen berücksichtigt. Die Kombination beider Systeme erfordert Kompromisse bei der Bullenauswahl was die Zuchtwerte betrifft.

Der Focus unseres Zuchtprogrammes liegt auf der Verbesserung der Herde als Ganzes vor allem im Hinblick auf Effizienz und Lebensleistung.

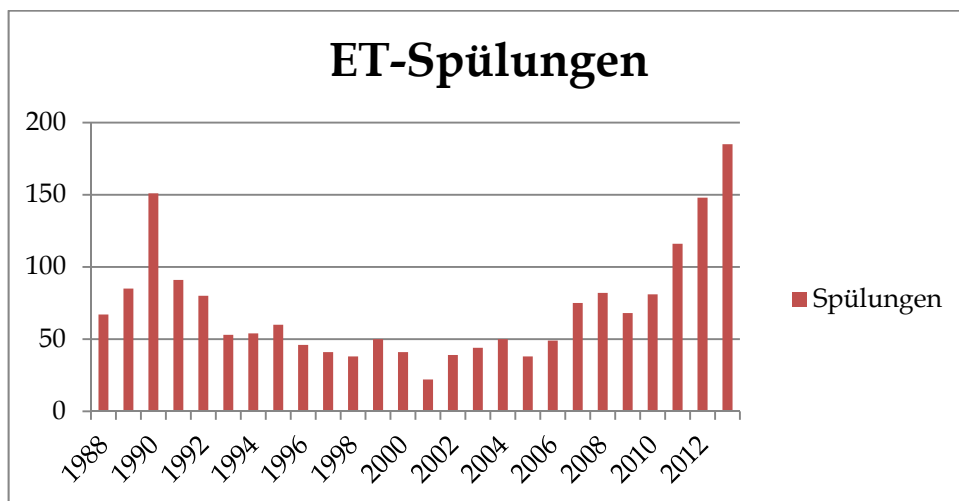
Embryotransfer in Luxemburg

Marianne Vaessen

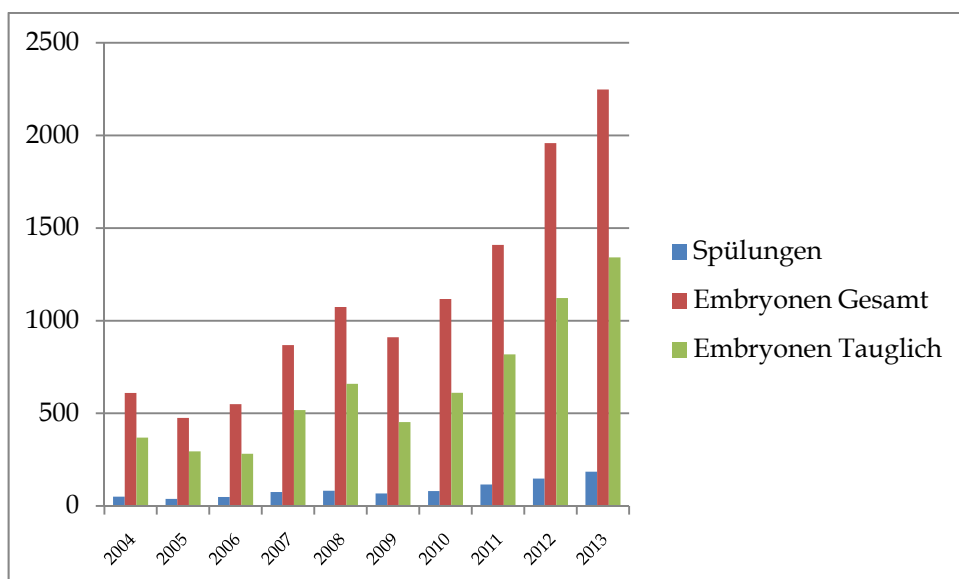
Ende der 70er Jahre wurden in Luxemburg die ersten operativen ET's durch Dr. Albert Görlach vom Besamungsverein Neustadt/Aisch durchgeführt.

Der Züchter und Eigenbestandsbesamer Henri Vaessen begann Anfang der 80er Jahre, unter der Anleitung von Dr. Görlach, mit den ersten Spülungen auf seinem landwirtschaftlichen Betrieb. Dies führte im Jahr 1985 zur Gründung der ET Station Longsdorf . Die beiden Luxemburger Zuchtverbände SEG und Herdbuch, welche sich heute zu CONVIS zusammengeschlossen haben, betrieben ihre jeweiligen ET Programme in Zusammenarbeit mit Dr. Henri Kohnen und Dr. Venant Eiffener. Seit 2001 führt Dr. Jakob Westfal den ET für CONVIS durch.

Nach rückläufigen Spülungszahlen in den 90er Jahren gewinnt der Embryotransfer seit der Jahrtausendwende wieder an Popularität und ist heute ein fester Bestandteil des Luxemburger Zuchtgeschehens.



2013 wurden insgesamt 185 Spülungen durchgeführt. Im Schnitt wurden 12,25 Embryonen gewonnen von denen 7,25 als tauglich eingestuft wurden.



Sektion III

In vitro Techniken

Exploring potential circulatory miRNAs in bovine follicular fluid associated with follicular growth and oocyte developmental competence

Tesfaye D, Hoelker M, Schellander K

Animal Breeding and Husbandry Group, Institute of Animal Science, University of Bonn, Bonn, Germany

While the majority of miRNAs detected intracellularly, a considerable number of miRNAs, commonly known as circulating miRNA or extracellular miRNA, have been also detected outside cells, mainly in various bio-fluids. Recent studies have shown that miRNAs are not only present in serum or plasma but also different extra-cellular body fluids including saliva, urine, tears, seminal fluid, breast milk, colostrum, peritoneal fluid, bronchial lavage and cerebrospinal fluid. Moreover, the expression profile of circulating miRNAs from different types of body fluids show a specific pattern which indicate that circulating miRNAs are not only passively released outside the necrotic or injured cells. Mammalian follicular development and maturation of oocytes is the result of complex and coordinated processes that involve functional and morphological changes in different types of follicular cells and extensive cell-to-cell communication within the follicular microenvironment. Efficient delivery of factors to and from the oocyte at critical stages of development is essential for coordination of folliculogenesis and triggering of different signaling molecules. These signaling molecules involved in cell to cell communication within the follicular microenvironment are mediated by secretion and uptake of exosomes containing bioactive molecules including circulatory microRNA (miRNA). Recently a handful of experiments have been conducted to show the presence and also the expression profile of circulating miRNAs in equine and bovine follicular fluid. In the present review information on the miRNA transcriptome profile of follicular fluid and the surrounding cells will be presented and their implication for follicular development and oocyte competence will be elucidated.

Einfluss post-ovulatorischer Alterung auf Entwicklung und Methylierungsmuster boviner Oozyten und Embryonen

J. Heinzmann¹, F. Mattern², P. Aldag¹, A. Lucas-Hahn¹, C. Wrenzycki³, T. Haaf², H. Niemann¹
Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Mariensee¹,
Institut für Humangenetik, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg²,
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen³

Oozyten, die nicht innerhalb eines spezie-spezifischen Zeitfensters fertilisiert werden, degenerieren und verlieren ihr Entwicklungspotential. Dieser Prozess wird als post-ovulatorische Alterung von Eizellen bezeichnet und muss unabhängig von anderen Alterungsprozessen wie der ovariellen Alterung betrachtet werden. Er kann sowohl *in vivo*, nach Ovulation, als auch unter *in vitro* Bedingungen, wenn gereifte Eizellen zu lange in Kultur gehalten werden, auftreten. In den letzten Jahrzehnten sind die Assistierte Reproduktionstechniken sowohl in der Tierzucht als auch in der Humanmedizin zu Routineverfahren entwickelt worden, allerdings hat sich auch das Bewusstsein für mögliche assoziierte Komplikationen verstärkt, zum Beispiel für Schwierigkeiten, die aus der „Alterung“ von Keimzellen vor der Fertilisation entstehen können.

Im Zusammenhang mit dem progressiven Verlust der Entwicklungskompetenz der Eizellen wurden zum Beispiel eine Verhärtung der Zona pellucida, Abnormalitäten der Spindel und Fehlfunktionen der Mitochondrien beschrieben. Maternale Faktoren, die die pränimplantatorische Embryonalentwicklung bestimmen und die Integrität und Entwicklungskompetenz der Oozyte beeinflussen, sind in den gealterten Eizellen beeinträchtigt. Dies kann zu Veränderungen bei mRNA- und Proteinexpression führen sowie epigenetische Muster beeinflussen.

In dieser Studie wurde die *in-vitro*-Maturationsdauer boviner Oozyten von 24 h (Standardprotokoll) auf 48 h ausgedehnt, um den Einfluss der zeitlich verzögerten Fertilisation auf Entwicklung, mRNA-Transkriptmenge und genspezifische Methylierung in bovinen Eizellen und frühen Embryonen zu untersuchen.

Bovine Oozyten wurden mittels „Slicing“ aus Ovarien (Schlachthof) gewonnen und in TCM199 Medium mit BSA und Suigonan[®] entweder 24 h (Standardprotokoll) oder 48 h (post-ovulatorische Alterung) gereift, anschließend *in vitro* fertilisiert und für maximal 8 Tage *in vitro* kultiviert. Reifungs- sowie Fertilisierungs-, Teilungs- und Blastozystenraten wurden bestimmt. Die Reifungsraten der beiden Gruppen unterschieden sich nicht maßgeblich (24 h: 79±3 vs. 48h: 64.2±7%), morphologisch zeigte sich jedoch ein deutlicher Verlust des Zell-Zell-Kontaktes zwischen den Oozyten und den umgebenden Kumuluszellen. Die Fertilisierungsraten unterschieden sich nicht signifikant (47,5±9 vs. 52,8±7%). Die Teilungsrate war nach verlängerter Reifung signifikant niedriger (53,7±9 vs. 41±14%) und die Entwicklung bis zur Blastozyste war beinahe vollständig inhibiert (22,4±6% vs. 1,3±1). Die RT-qPCR Analyse entwicklungsrelevanter Gene, die Funktionen bei der Antwort auf oxidativen Stress (*PRDX1*), beim Imprinting (*IGF2R*, *PEG3* und *SNRPN*), Methylierungsmechanismen (*DNMT1B* und *DNMT3A*) und maternalen Effekten (*HSF1*, *NLRP9* und *ZARI*) haben, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Gereifte (Metaphase II) Oozyten und 4-8-Zell-Embryonen wurden für die Analyse der genspezifischen Methylierung mittels Limiting-Dilution und Direktsequenzierung eingesetzt. Hierbei zeigte sich ein signifikant höherer Anteil falsch-methylierter Allele für *DNM3Lo* in post-ovulatorisch gealterten Oozyten ($p=0,03$), andere geprägte und nicht-geprägte Gene (*H19*, *SNRPN*, *OCT4* und *DNMT3A*) wurden nicht durch die Reifungszeit beeinflusst.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Verzögerung der Fertilisation die Entwicklung bis zur Blastozyste signifikant erniedrigt. Allerdings sind weder die Reifungs- oder Fertilisationsrate noch die Genexpression der gereiften Oozyten beeinträchtigt, die mangelnde Entwicklungskompetenz könnte sich jedoch mit dem fehlerhaften Methylierungsmuster, das für *DNMT3Lo* gefunden wurde, in den Oozyten zeigen.

Die Ergebnisse dieser Studie sind ein wichtiger Schritt in der Etablierung des Rindermodells zur Untersuchung von Alterungseffekten und unterstreichen die Bedeutung der Sorgfalt und der Einhaltung von Qualitätsstandards bei der Anwendung assistierter Reproduktionstechniken.

Comparison between two vitrification methods for *in vitro* produced bovine embryos

MN Saucedo¹, M Reichenbach², M. Kurome¹, H-D Reichenbach³, E Wolf¹

¹Chair for Molecular Animal Breeding and Biotechnology, Ludwig-Maximilian University

²Bayern-Genetik GmbH, Grub

³Bavarian State Research Center for Agriculture, Institute of Animal Breeding, Grub

The *in vitro* production (IVP) of bovine embryos is well established, but freezing is still the limitation factor for good results in pregnancies after frozen thaw embryo transfer. In the present study we compared two different vitrification methods for *in vitro* produced bovine embryos: The CryoLogic Vitrification Method (CVM), CryoLogic® Australia and the Hollow Fiber Vitrification (HFV) Method (Matsunari et al.[1]). For IVP, Ovaries from slaughtered animals were obtained from the abattoir. Only 2 to 8 mm follicles were aspirated. Oocytes recovered were selected under microscope and only good and fair quality cumulus oocyte complexes (COCs) showing at least five layers of cumulus cells, were *in vitro* matured for 22 h in Modified Parker Medium (MPM) supplemented with 5% estrus cow serum (ECS), 0.01250 IU LH/ml and 0.0250 IU FSH/ml. *In vitro* fertilization (IVF) of matured oocytes was performed with frozen thawed semen after swim up procedure in Fert-TALP medium supplemented with 50µl/ml heparin, 10 µl/ml pyruvic acid and 6 mg/ml bovine serum albumin. After 18 h presumptive zygotes were denuded for *in vitro* culture (IVC) in SOF supplemented with 5% OCS, 40 µl/ml BME, 10 µl/ml MEM and 0.36 mg/ml pyruvic acid. Cleavage rate was recorded on day 3 (day 0 = IVF). *In vitro* cultured embryos were assessed on days 5 to 8. Only grade 1 (day 5 or day 6), early blastocysts (day 6 or day 7) and blastocysts (day 7 or day 8) were vitrified either by the CVM or HFV method. Embryos were loaded in 0.7 – 1.0 µl of solution. Vitrification procedure was performed at room temperature (RT). Embryos were selected and handled in 20 mM HEPES TCM-199 supplemented with 20% fetal calf serum (FCS) until they were transferred to the equilibration solution (ES) 1 (TCM + 7.5% EG + 7.5% DMSO) and equilibrated for 1 minute. After they were transferred to ES 2 (TCM+ 7.5% EG + 7.5% DMSO + 0.25M sucrose) for another minute, following ES 3 (TCM + EG 7.5% + DMSO 7.5% + 0.5M sucrose) for 1 minute and finally transferred to the vitrification solution (VS) (TCM + 15.0% EG + 15.0% DMSO + 0.5 M sucrose) where they were held for 40 seconds. Subsequently they were either vitrified over the solid surface (CVM) or immersed in liquid nitrogen (HFV). Hollow fibers were inserted in 0.25 ml straws and stored in LN₂. Embryos were thawed immediately after vitrification or stored for up to 7 days in LN₂. For thawing, embryos were immersed directly in thawing solution (TS) (TCM + 1 M sucrose) at 38.5°C for 1 minute and transferred subsequently to the dilution solution (DS) 1 (TCM + 0.5 M sucrose) at RT for 3 minutes and to ES 2 (TCM + 0.25 M sucrose) at RT for another 3 minutes and finally washed two times in washing solution (WS) (TCM + 20% FCS) 1 and 2, both for five minutes. After thawing procedure, embryos were *in vitro* cultured until day 12. Survival rate (judged by re-expansion rate) 24-48 h after thawing and hatching rate were recorded.

Comparing both vitrification methods, a statistical difference was observed between the HFV method and CVM. Overall survival rates after thawing were higher when embryos (morulae: HFV n=42, CVM n = 41; early blastocyst: HFV n=60, CVM n=35; blastocyst: HFV n=81, CVM n=70) were vitrified by the CVM. An average re-expansion rate of 73.0 (HFV) vs. 78.6 (CVM) % ($p>0.05$) and hatching rate of 63.6 vs. 57.0 % ($p>0.35$) respectively, was observed. Hatching rate within the two group's equals the hatching rate of regular IVP (60.3%) observed in our laboratory.

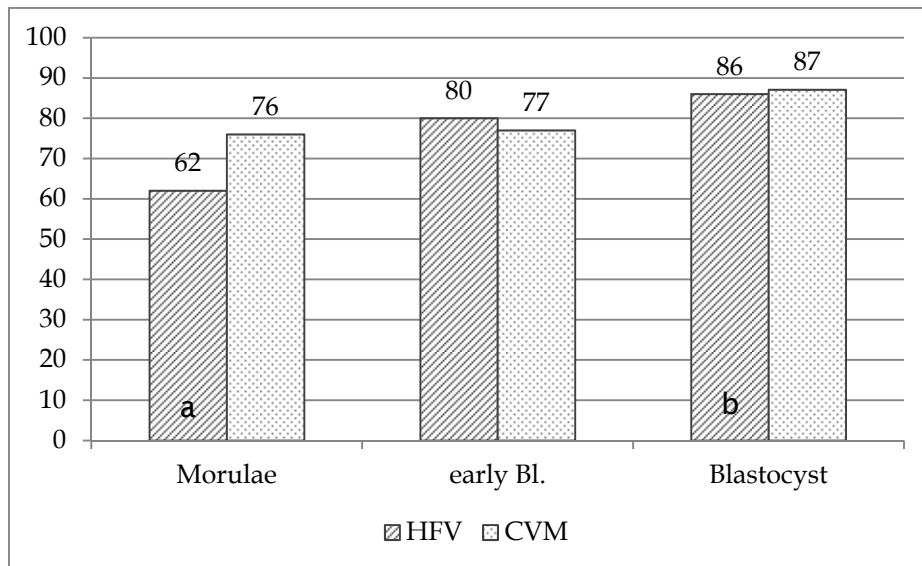


Figure 1: Re-expansion rate after vitrification depending on stage of embryo (a;b: $p>0.05$)

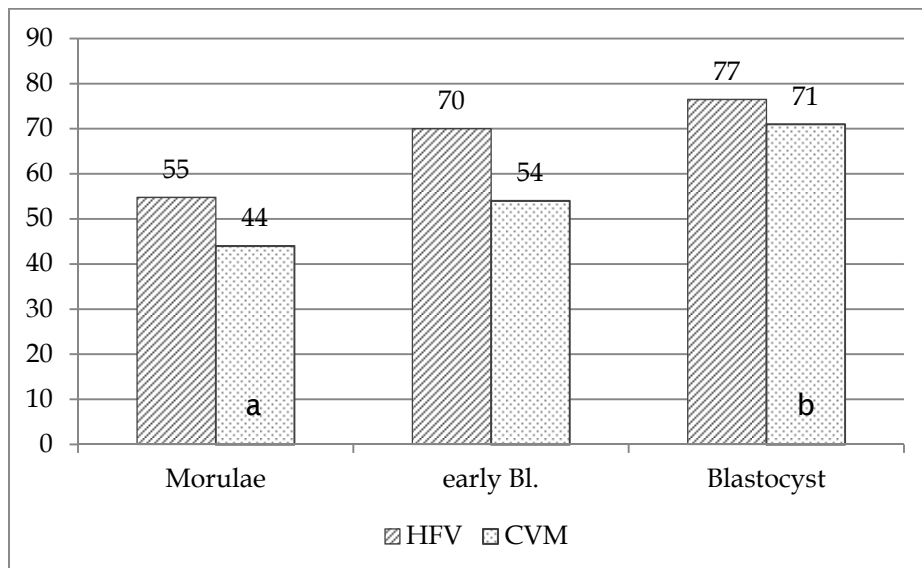


Figure 2: Hatching rate after vitrification depending on stage of embryo (a;b: $p>0.05$)

Both methods are applicable for freezing *in vitro* produced bovine embryos. Early blastocysts and blastocysts seem to be the best embryo stages in order to achieve good hatching rates after thawing (morulae vs. blastocyst; $p>0.05$).

1. Matsunari, H., et al., *Hollow Fiber Vitrification: A Novel Method for Vitrifying Multiple Embryos in a Single Device*. Journal of Reproduction and Development, 2012, 58(5): 599-608.

Für die finanzielle Unterstützung des Projekts wird der Bayerischen Forschungsförderung gedankt (AZ-1031-12; DOK-153-12).

Einfluss verschiedener Vitrifikationsverfahren und Auftaumedien auf die in vitro Entwicklung von Mäuseembryonen

Garza D¹., Camacho M¹., Gauly M¹., Holtz W¹.

¹Department für Nutztierwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen, Albrecht-Thaer-Weg 3, 37075 Göttingen

1 Einleitung

Zu Vitrifikation von Säugerembryonen entwickelten Vajta et al. (1998) unter Verwendung dünn ausgezogener Pailletten das so genannte „open pulled straw“ (OPS)- Verfahren. Eine andere Vorgehensweise, bei der die Embryonen nicht in Kontakt mit flüssigem Stickstoff (LN₂) wie bei OPS, sondern einer LN₂ gekühlten Metalloberfläche kommen (Begin et al., 2003; Somfai et al., 2010), wird als „CVM RingFibreplug“ Verfahren (CVM) bezeichnet. Zur Entfernung der Kryoprotektiva aus den Zellen nach dem Erwärmen vitrifizierter Embryonen werden diese in der Regel durch Medien mit abnehmender Saccharose-Konzentration passagiert. Dabei kollabieren die Blastocysten infolge des Wasser-Entzugs um anschließend allmählich wieder zu re-expandieren. Es hat sich bei Maus (El-Gayar et al., 2008, Rodriguez et al., 2010), Rind (Trigal et al., 2013; Morato und Mogas., 2013a), Schaf (Isachenko et al., 2003) und Schwein (Cuello et al., 2004) erwiesen, dass diese zusätzliche Belastung vitrifizierter Embryonen sich vermeiden lässt indem ein Ausverdünnen der Kryoprotektiva in einem einzigen Schritt möglich zu sein scheint. Ziel der vorliegenden Untersuchung bestand zum einen in einem Vergleich beider Einfrierverfahren, zum anderen in der Verwendung eines Saccharose-freien Erwärmungsmediums.

2 Material und Methoden

Mäuse Blastocysten wurden zufallsmäßig auf zwei Gruppen verteilt. Das verwendete Medium („holding medium“=HM) bestand aus TCM 199 mit 0,0168g NaHCO₃, 0,0220g Na-Pyruvat, 0,650g HEPES und 0,0146g L-Glutamat. Jeweils zwei Blastocysten wurden in 800µl HM, ergänzt mit 20% hitzeinaktiviertem Ziegenbockserum, für 3 min äquilibriert. Nach Spülung im gleichen Medium folgten 3 min in Medium dem 7,5% Etylenglykol (EG) und 7,5% Dimethylsulfoxid (Me₂SO) zugesetzt waren. Nach 40-45s in 1µl HM+20% Ziegenbockserum + 16,5% EG + 16,5% Me₂SO + 0,5M Saccharose erfolgte die Vitrifikation. Im Falle von OPS wurden die Blastocysten in eine fein ausgezogene OPS-Paillette aufgezogen und direkt in LN₂ getaucht. Im Falle von CVM wurde der Tropfen auf den Ring des Fibreplugs übertragen und auf eine LN₂ – vorgekühlte Oberfläche platziert. Der Ring Fibreplug wurde dann in ein vorgekühltes Röhrchen verbracht, das verschweißt und in LN₂ gelagert wurde. Das Erwärmen erfolgte in HM mit 20% Ziegenbockserum mit entweder 0,0M oder 0,3M Saccharose-Zusatz. Anschließend wurden die Blastocysten in M16 Medium in vitro kultiviert und nach 2h und 24h mikroskopisch beurteilt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Wiederfindungsrate nach dem Auftauen war beim OPS-Verfahren geringfügig höher als bei CVM (85% vs 77%, $P > 0,05$). Wie aus Tab.1 ersichtlich, unterscheidet sich der Anteil expandierter Embryonen zwischen den beiden Vitrifikationsmethoden nicht ($P > 0,05$). Der Zusatz von Saccharose zum Erwärmungsmedium beeinträchtigte die anschließende in vitro Entwicklung der Embryonen erheblich (45% vs 9%), einen Befund der übereinstimmt mit den Ergebnissen von Isachenko et al. (1997). Die Qualität der Embryonen 24 Stunden nach dem Auftauen war besser in Medium ohne Saccharose-Zusatz (1.75 ± 0.13) als in Medium mit Saccharose-Zusatz (2.55 ± 0.11).

Tabelle 1: Anteil expandierter (Exp %) und geschlüpfter (Ges %) Blastocysten nach Vitrifikation mit dem OPS- und dem CVM-Verfahren und entweder 0,3M oder 0,0M Saccharose im Erwärmungsmedium.

Sac (M)	Anz	OPS		Anz	CVM		Anz	Total	
		Exp(%)	Ges (%)		Exp(%)	Ges (%)		Exp(%)	Ges (%)
0,0	30	89	48	30	82	41	60	86^a	45^a
0,3	30	74	13	30	54	4	60	64^b	9^b
Total	60	82	32	60	67	22	120	75	27

^{a,b}: Prozente mit verschiedenen Indices sind verschieden ($P < 0,05$)

Abschließend kann festgestellt werden, dass beide Vitrifikationsverfahren praxisgeeignet sind, wobei das CVM System geringfügige Vorteile zu haben scheint. Dazu gehört auch, dass OPS Pailletten aufgrund ihrer filigranen Struktur beim Hantieren relativ leicht zerbrechen. Ein erheblicher Vorteil des CVM-Verfahrens besteht darin, dass kein direkter Kontakt der Embryonen mit LN2 zustande kommt, ein aus hygienischer Sicht nicht unbedeutender Gesichtspunkt. Aus technischer Sicht ist die Tatsache von Vorteil, dass das Erwärmen vitrifizierter Embryonen ohne Saccharose-Zusatz möglich ist, folglich ein Direkt-Transfer ohne Zuhilfenahme von Mikroskop und sonstiger Laborausstattung möglich ist.

Embryonalentwicklung und Embryonenqualität bei präpuberalen und adulten Spendern nach Suppletierung mit cAMP Modulatoren während der *in-vitro*-Maturation boviner Oozyten

S.M. Bernal^{1,2}, J. Heinzmann¹, D. Herrmann¹, U. Baulain¹, K.G. Hadelers¹, P. Aldag¹,

A. Lucas-Hahn¹, H. Niemann¹

¹*Forschungsbereich Biotechnologie, Institut für Nutztiergenetik (FLI), Mariensee
31535 Neustadt*

²*Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales -U.D.C.A.,
Bogotá, Colombia*

Die Verwendung präpuberaler Spendertiere kann genetischen Fortschritt und Effizienz in der Rinderzucht verbessern. Momentan werden verstärkt züchterisch besonders wertvolle weibliche Tiere als Spender für Embryonen-basierte Reproduktionstechniken mit Hilfe der genomischen Selektion ausgewählt. Folglich werden präpuberale Tiere insbesondere verwendet, um das Generationsintervall zu verkürzen, und die individuelle Reproduktionsphase zu verlängern. Obwohl die *in-vitro*-Produktion von Embryonen bei präpuberalen Tieren bereits unter züchterischen Bedingungen angewendet wird, ist die Entwicklungskompetenz der gewonnenen präpuberalen Oozyten bis zur Blastozyste im Vergleich zu adulten Spendern reduziert. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind aber noch weitgehend unbekannt. Einige Unterschiede zwischen präpuberalen und adulten Oozyten und Embryonen wurden inzwischen gefunden, zum Beispiel in der Ultrastruktur, im Metabolismus, in den Genexpressionsmustern und in der Reifung, wo bei präpuberalen Keimzellen eine unvollständige und/oder fehlerhafte cytoplasmatische Reifung und reduzierte Oozytengröße beobachtet wurde. Durch *in-vitro*-Reifung (IVM) mit zyklischen Adenosin-Monophosphat (cAMP) Modulatoren in einem zweiphasigen Kultursystem und eine Ausdehnung der Kultur auf 30h konnte die Blastozystenrate bei Rindern und Mäusen erhöht werden (Albuz *et al*, 2010).

In unserer Studie wurde der Einfluss der cAMP Modulatoren Forskolin, 3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX) und Cilostamid auf die *in-vitro*-Reifung, Entwicklungsraten und Genexpressionsprofile in Blastozysten aus präpuberalen und adulten bovinen Eizellen untersucht. Oozyten von adulten (laktierenden) Holstein Kühen und präpuberalen (6-10 Monate alt) Spendern wurden mittels Ovum-pick-up (OPU) gewonnen. Dazu wurden Follikel >2 mm Durchmesser aufgesucht und mittels Vakuum aspiriert.

Nach OPU wurden die COCs gesucht, evaluiert und folgenden IVM Behandlungen unterzogen: TCM24 (24h IVM, Standardprotokoll und Medium / Kontrolle), TCM30 (2h pre-IVM Kultur (Forskolin-IBMX) und 30h IVM plus Cilostamid), DMSO30 (2h pre-IVM Kultur und 30h IVM mit DMSO/ Vehikelkontrolle). Nach der Reifung wurden die Oozyten fertilisiert und für 19h inkubiert und die mutmaßlichen Zygoten anschließend für 8 Tage zur Bestimmung der Blastozystenrate kultiviert. Reifungs-, Teilungs- und Blastozystenraten wurden bestimmt und mittels Glimmix (SAS/STAT®) statistisch analysiert. Die relative mRNA Expression ausgewählter entwicklungsrelevanter Gene *SLC2A8* (Nährstofftransport), *DNMT3B* (Methyltransferase), *BCL-XL* (Apoptose), *EGR1* (Embryoqualität) und *PRDX1* (Reaktion auf oxidativen Stress) wurde in einzelnen expandierten Blastozysten mittels RT-qPCR bestimmt. Die Genexpressionsdaten wurden mittels One-way ANOVA evaluiert.

Die Reifungsraten (präpuberale Spender vs. Kühe – TCM24: $63,4 \pm 6,3\%$ vs $81,6 \pm 6,1\%$; cAMP30: $66,0 \pm 6,8\%$ vs. $79,7 \pm 5,2\%$; DMSO30: $73,7 \pm 4,1\%$ vs. $79,3 \pm 6,7\%$; $p > 0,05$), Teilungsraten (präpuberale Spender vs. Kühe – TCM24: $63,4 \pm 4\%$ vs. $56,1 \pm 4,7\%$; cAMP30: $54,9 \pm 5,1\%$ vs. $57,8 \pm 5,6\%$; DMSO30: $52,1 \pm 3,6\%$ vs. $51,6 \pm 4,4\%$; $p > 0,05$) und Blastozyste/ Zygote-Raten (präpuberale Spender vs. Kühe – TCM24: $26,2 \pm 5,3\%$ vs. $27,5 \pm 3,0\%$; cAMP30: $19,6 \pm 2,8\%$ vs. $28,1 \pm 2,7\%$; DMSO30: $16,2 \pm 2,0\%$ vs. $21,5 \pm 2,8\%$; $p > 0,05$) zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen *in vitro* Behandlungen. Die mRNA Transkriptmenge für *EGR1* war in *in vivo* produzierten Blastozysten 6-fach hoch-reguliert im Vergleich zu allen *in vitro* Behandlungen ($p < 0,05$). Die Genexpression für die Gene *SLC2A8*, *DNMT3B*, *BCL-XL* und *PRDX1* unterschied sich nicht zwischen den Gruppen.

Die Entwicklungsraten wurden nicht durch die Verwendung von DMSO (Lösungsmittel für die cAMP Modulatoren) im Medium während der *in-vitro*-Reifung beeinflusst. Dieser Versuch bestätigte die Eignung von *EGR1* als Marker für die Qualität von bovinen Embryonen, wie schon für Embryonen aus Schlachthofmaterial von uns beschrieben wurde (Bernal *et al*, 2014).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Oozyten präpuberaler Tiere ein ähnliches Entwicklungspotential wie Eizellen von adulten Tieren haben können, mit und ohne zusätzliche Modulatoren der Reifung.

Sektion IV

**Physiologie und Besamung
sowie assoziierte Techniken**

Zoetis Deutschland GmbH

IN VITRO UNTERSUCHUNG ÜBER DEN EFFEKT VON VERSCHIEDENEN PROSTAGLANDINPRÄPARATEN AUF DIE UTERUSMOTILITÄT

L. Leon, M. San Andres Larrea, P. Zieger

Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology, University of Madrid,

Einleitung

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und seine Analoga werden beim Rind zur Behandlung ovarieller Dysfunktionen sowie bei Gebärmutterentzündungen und in der Gynäkologie eingesetzt (Gorritz Martin, 2013). Über die *in vitro* Wirksamkeit der natürlichen und analogen Medikamente bestehen unterschiedliche Aussagen (Stolla & Schmid, 1990). Die vorliegende *in vitro* Vorlaufstudie untersucht die uterokinetische Wirkung von zwei kommerziellen Produkten unter kontrollierten Laborbedingungen mittels Organbad-Methode und vergleicht diese mit einem natürlichen Prostaglandin.

Material und Methode

Myometriumsstreifen (n=12, 2-3 x 2 mm) von klinisch gesunden Wistar-Raten (n= 5; Ø Gewicht 350 g) wurden für die Motilitätsmessung im Organbad vorbereitet. Die Messung der spontanen uterinen Kontraktion wurde mit einem Brückenmessverstärker mit 6 Kanälen (Grass FT03C, Grass Instrument, U.S.A) sowie mit einem Polygraph (Graphtec Multicorder MC6621) durchgeführt.

Die untersuchten Arzneien (Estrumate[®], 250µg/ml Cloprostenol als analoges Prostaglandin, MSD und Dinolytic[®], 5mg/ml Dinoprost als natürliches Prostaglandin, Zoetis Deutschland GmbH) wurden mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (Sigma Spain) verglichen. Dafür wurden verschiedene inkrementierende Konzentrationen untersucht: Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (0.1 - 30 µM), Estrumate (0.1 - 300 µM) und Dinolytic (0.1 - 300 µM). Als Parameter wurden die Kontraktionshäufigkeit (Anzahl min^{-1}) und die Kontraktionsamplitude (g) der glatten Uterusmuskulatur evaluiert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse zwischen Dinoprost und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ waren in der Kontraktionsamplitude der Gebärmutter vergleichbar, wobei der kontrahierende Effekt bei Prostaglandin $F_{2\alpha}$ früher einsetzt (Abb. 1). Der lang anhaltende Effekt ist mit beiden Substanzen nachweisbar.

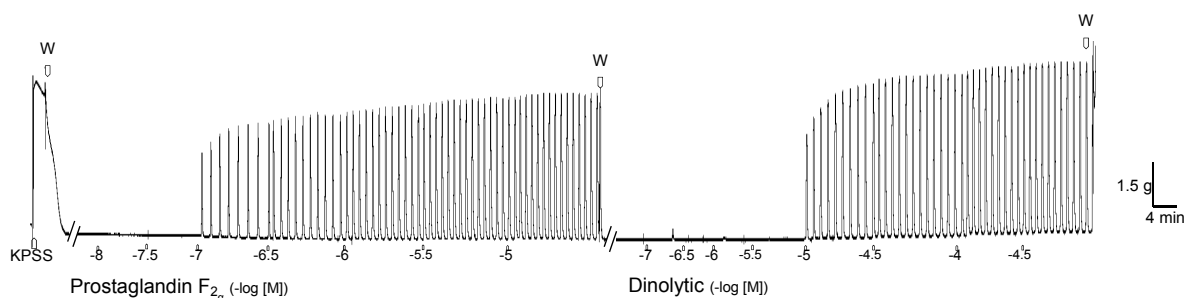


Abb. 1: Beispiel einer originalen Messgraphik, verglichen wurden unterschiedliche Konzentrationen von natürlichen Prostaglandinen

Der direkte Vergleich zwischen den getesteten Substanzen zeigt, dass die natürlichen Substanzen die Uterusmotilität stärker beeinflussen – sowohl in der Frequenz (Abb. 2a) als auch in der Intensität (Abb. 2b) – als das Analoge-Prostaglandin.

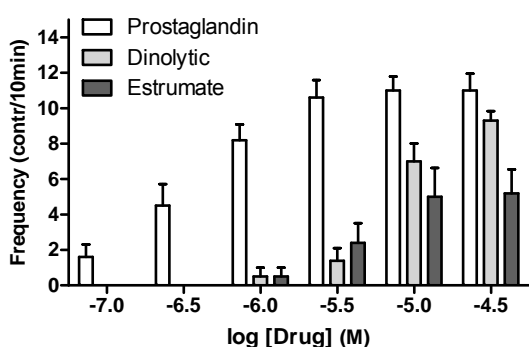


Abb. 2a

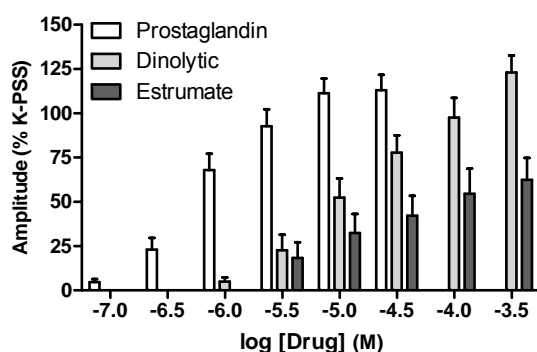


Abb. 2b

Abb. 2a und 2b: Mittelwert und SD der Frequenz (2a) und Amplitude (2b) der Uterusmotilität bei unterschiedlichen Konzentrationen von natürlichen und analogen Prostaglandinen.

Zusammenfassung

Wie in früheren Arbeiten festgestellt (STOLLA & SCHMID, 1990), kann die Messung der vorgestellten Vorstudie zeigen, dass analoge Prostaglandine die Uterusmotilität schwächer ausprägen als die natürlichen.

Literaturverzeichnis

L. GORRIZ MARTIN (2013): An in vitro study on the myometrial contractility in dairy cattle before calving and after postpartum LPS infusion. Relation to blood progesterone and estradiol-17b levels. Diss. TiHo Hannover

R. STOLLA & SCHMID G. (1990): Auswirkungen natürlicher und synthetischer PGF_{2α}-Präparate auf die Uteruskontraktilität des Rindes, Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 103, 198-202

Zoetis erhält Zulassungserweiterung für Vaginalspange CIDR®

Flexible Möglichkeiten der Anwendung für beste Fruchtbarkeitsleistung

P.Zieger

Berlin, April, 2014 –Zoetis hat für CIDR® eine Zulassungserweiterung erhalten, die höchst flexible Anwendungsmöglichkeiten der Progesteronspange – in Kombination mit GnRH, Prostaglandin und eCG – ermöglicht. Denn gute Reproduktionsleistungen erfordern eine gute Herdenfruchtbarkeit: Als Partner von Tierärzten und Landwirten unterstützt Zoetis mit seinem Angebot der drei essenziellen bioidentischen Hormone Acegon®, Dinolytic® und CIDR® das strategische Fruchtbarkeitsmanagement und macht jeden Zyklus rund.

Die innovativen Anwendungsmöglichkeiten der Produktpalette erleichtern die kontrollierten Besamungsabläufe. Nach dem Vorbild aus der Natur werden die Präparate aus dem Hormon-Portfolio in der exakten Dosis zum richtigen Zeitpunkt für optimale Fruchtbarkeitserfolge verabreicht. Mit der Zulassungserweiterung ist die Vaginalspange CIDR® von Zoetis noch flexibler einsetzbar.

CIDR® ist nun zugelassen für die Brunstsynchronisation von zyklischen Färsen und Kühen sowie zur Brunsteinleitung und -synchronisation von zyklischen und nicht-zyklischen Färsen und Kühen für terminorientierte Besamungsprogramme. CIDR® kann in diesen Fällen in Kombination mit Prostaglandin, Prostaglandin und GnRH sowie mit Prostaglandin und eCG eingesetzt werden. Zudem eignet sich CIDR® für die Synchronisation von Spender- und Empfängertieren beim Embryonentransfer. Mit der schonenden T-Form hat CIDR® eine hohe Retentionsrate, ist einfach zu applizieren und gut verträglich. Nach dem Entfernen kommt es zyklusunabhängig zu einer fertilen Brunst. CIDR® ermöglicht so eine Vielzahl von Fruchtbarkeitsprogrammen für zyklische und nichtzyklische Kühe und Färsen.

Zoetis bietet hochwertige Komplettlösungen für flexible und wirksame Fruchtbarkeitsprogramme aus einer Hand: Acegon®, Dinolytic® und CIDR® mit der neuen Zulassungserweiterung sind die drei essenziellen, bioidentischen Hormone für den gesamten Fruchtbarkeitszyklus. Das erleichtert die Bestandsbetreuung und den Betriebsalltag: für gesunde, langlebige und fruchtbare Milchkühe und betrieblichen Erfolg.

Embryongewinnung bei superovulierten Kühen nach Besamung mit x-sortiertem Sperma – funktioniert das?

Jan Detterer

Besamungs- und ET-Station Georgsheil, Südbrookmerland

Der Einsatz von X-sortierten Sperma bei der Besamung hat inzwischen eine weite Verbreitung gefunden. So werden im Gebiet des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter (VOSt) ca. 10% aller Erstbesamungen mit x-sortiertem Sperma durchgeführt. Das sortierte Sperma kommt dabei zu 90% bei Rindern und zu 10% bei Kühen zum Einsatz. Eine Ursache für diesen relativ geringen Anteil an Kuhbesamungen sind niedrige Erfolgsraten. Bei Auswertungen der Kuhbesamungen aus den Jahren 2007 - 2014 im VOSt-Gebiet (N= 80 Bullen) lag die Non-Return-Rate-56-Tage (NRR-56) mit x-sortiertem Sperma bei 55,1% auf der Basis von 3.040 Erstbesamungen (EB) gegenüber einer Rate von 64,8% beim nicht sortierten Sperma (175.973 EB), was also einer Differenz von 9,7 %-Punkten entspricht. Bei den Besamungen von Rindern ist diese Differenz mit 13,2 %-Punkten höher (X-sortiert: NRR-56 62,1% bei 30.384 EB gegenüber konventionell 75,3% bei 84.533 EB).

Bei der Besamung kommen routinemäßig Portionen mit 2 Millionen x-sortierten Samenzellen zum Einsatz. Die ersten Versuche beim ET wurden auch mit derartigen Dosen durchgeführt, wobei in der Regel mit 2 x 2 oder 3 x 2 Portionen besamt wurde; d.h. also 8 bzw. 12 Millionen Samenzellen versamt wurden.

Die ersten eigenen Erfahrungen (Dettterer, 2007) mit einer kleinen Anzahl von Kuh-Spülungen (N=4) nach Besamung mit x-sortiertem Sperma (2 x 2 oder 3 x 2 Mio Spermien/Dosis) resultierten in 6.2% transfertauglichen Embryonen.

Kaimio et al (2013) verwendeten ebenfalls bei 2 Besamungsterminen je 2 Dosen mit 2 Millionen Samenzellen und erreichten bei 88 Spenderkühen 45% transfertaugliche Embryonen gegenüber 70% bei 324 Vergleichskühen, die mit konventionellem Sperma besamt waren.

Da es jetzt auch möglich ist, Pailletten mit einer höheren Samenzellkonzentration zu produzieren, wurden für ET-Zwecke von 6 verschiedenen Bullen Portionen mit 8 Millionen Samenzellen pro Dosis hergestellt. Bei der ET-Besamung wurden 2 Besamungen im Abstand von 12 Stunden mit je einer Portion mit 8 Millionen x-sortierten Samenzellen durchgeführt.

Bei 13 Spülungen von Holstein-Kühen (26.11.13 – 25.4.14) mit 1 – 8 Laktationen ($\bar{\emptyset}$ 3,3 \pm 1,8) und einer durchschnittlichen Rastzeit von 327 \pm 261 Tagen konnten 95 Embryonen/Eizellen ($\bar{\emptyset}$ 7,8 \pm 4,4) gewonnen werden; davon waren 8 Embryonen degeneriert (8,4%) und 36 Eizellen unbefruchtet (37,9%). 51 Embryonen ($\bar{\emptyset}$ 4,3 \pm 4,2) waren transfertauglich, was einem Prozentsatz von 53,7% transfertauglicher Embryonen pro Spülung entspricht.

Im selben Zeitraum wurden 43 Kühe gespült, die mit konventionellem Sperma besamt waren (2 x 15 Mio Samenzellen) Die Tiere hatten durchschnittlich $3,6 \pm 1,8$ Laktationen und eine Rastzeit von 213 ± 180 Tagen. Es wurden 433 Embryonen/Eizellen ($\bar{\varnothing} 10,2 \pm 7,7$) gewonnen; davon waren 23 Embryonen degeneriert (5,3%) und 151 Eizellen unbefruchtet (34,9%). 259 Embryonen ($\bar{\varnothing} 6,3 \pm 6,4$) waren transfertauglich, was einem Prozentsatz von 59,8% transfertauglicher Embryonen pro Spülung entspricht

Durch den Einsatz von x-sortiertem Sperma in einer Konzentration von 8 Millionen Samenzellen pro Dosis können akzeptable ET-Ergebnisse erreicht werden. Eine weitere Verbesserung der Ergebnisse und eine größere Bullenauswahl sind für einen stärkeren Einsatz aber notwendig!

Literatur:

Detterer J

Geschlechtsbestimmung – Eine Übersicht über die Möglichkeiten anhand von eigenen Erfahrungen
Tagungsband der 34. Jahrestagung der AET-d in Hannover (2007) 18 - 19

Kaimio I., Mikkola M., Lindeberg H., Heikkinen J., Hasler J.F. and Taponen J.

Embryo production with sex-sorted semen in superovulated dairy heifers and cows
Theriogenology 80 (2013) 950 - 954

Verlauf der Steroidhormonkonzentrationen während der In-vivo- und In-vitro-Maturation boviner Oozyten

- Erste Ergebnisse -

Carina Blaschka, Hanna Stinshoff, Friederike Poppicht, Christine Wrenzycki

Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere,

Lehrstuhl für Molekulare Reproduktionsmedizin

Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland

Die Bedingungen der derzeit in der In-vitro-Maturation (IVM) eingesetzten Systeme spiegeln die In-vivo-Situation nicht vollständig wider. In Folge dessen weisen in vitro gereifte Oozyten eine niedrigere Qualität auf als ihre in vivo gereiften Gegenstücke.

In den fein abgestimmten Prozessen der Follikel- und Oozytenreifung und -entwicklung spielen Steroidhormone eine wichtige Rolle. Ein Teil der Steroidhormone wird vom Organismus in Steroidsulfate umgewandelt. Die Sulfokonjugation von Steroiden geht einher mit einer deutlichen Erhöhung der Wasserlöslichkeit und damit dem Verlust des passiven Diffusionsvermögens durch biologische Membranen, einer Reduktion des Verteilungsvolumens sowie einem kompletten Wirkungsverlust an den klassischen nukleären Rezeptoren. Daher wurden konjugierte Steroide in der Vergangenheit primär als inaktive Endprodukte auf dem Weg zur Ausscheidung betrachtet. Durch spezifische Transportsysteme, wie beispielsweise den Natrium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT), können sulfatierte Steroide jedoch in spezifische Zielzellen importiert und dann durch die Steroidsulfatase wieder in die freie biologisch wirksame Form überführt werden. Das Vorkommen sulfatierter Steroide, in der Follikelflüssigkeit des Rindes, ist – im Gegensatz zu andern Haustieren (Pferd, Maus, Ratte) – wenig untersucht.

Unter Verwendung von Rindereizellen soll in diesem Projekt untersucht werden, welche lokalen Effekte sulfatierte Steroide auf die Follikel- und Oozytenentwicklung in vivo und in vitro ausüben.

Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden aus Schlachthofovarien mittels der Slicing-Methode gewonnen. Die In-vitro-Reifung von jeweils 30 KOK der Kategorien 1-3 erfolgte in TCM plus BSA-FAF plus Suigonan für insgesamt 24 Std. bei 39°C und 5% CO₂ ohne Ölüberschichtung. Das Reifungsmedium wurde nach definierten Zeitpunkten gesammelt und bei -20°C bis zur Hormonbestimmung eingefroren. Aus Follikeln definierter Größe (3-5mm, 6-8mm, 9-14mm und >15mm) wurde mittels Punktion die Flüssigkeit gewonnen. Die Lagerung erfolgte auch hier bei -20°C bis zur Messung.

Derzeit steht die Detektion nicht konjugierter und konjugierter Steroide während der In-vivo-/ In-vitro-Maturation im Vordergrund. Dazu werden mittels Radioimmunoassay (RIA) 17 β -Östradiol (E2) und Progesteron (P4) im Maturationsmedium bestimmt (nach 0h [Kontrolle], 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h).

	E2 (pg/ml)	P4 (ng/ml)
0h	nicht nachweisbar	
4h -EZ	nicht nachweisbar	
4h +EZ	50,4 \pm 24,0	2,5 \pm 0,2
24h -EZ	nicht nachweisbar	
24h +EZ	67,4 \pm 24,1	10,4 \pm 1,5

E2: 17 β -Östradiol; P4: Progesteron; EZ: Eizellen

Desweiterm wird bovine Follikelflüssigkeit aus Follikeln mit definierter Größe mittels LC-MS/MS analysiert.

Follikelgröße	E2 (ng/ml)	P4 (ng/ml)	T (ng/ml)	E2S (ng/ml)	E1S (ng/ml)	PREGS (ng/ml)	CHOLS (ng/ml)
3-5 mm	4,0 \pm 2,0	152,6 \pm 89,2	16,3 \pm 2,0	0,5 \pm 0,5	1,0 \pm 0	0,7 \pm 0,2	50,2 \pm 11,4
6-8 mm	43,7 \pm 19,8	118,2 \pm 54,5	6,6 \pm 2,0	0,1 \pm 0	0,3 \pm 0,1	1,0 \pm 0,3	69,7 \pm 12,8
9-14 mm	173,7 \pm 22,5	97,1 \pm 54,3	8,8 \pm 2,5	1,7 \pm 0	0,2 \pm 0	1,0 \pm 0,2	64,8 \pm 12,4
>15 mm	123,2 \pm 84,3	53,4 \pm 8,6	8,6 \pm 6,8	2,1 \pm 0	0,2 \pm 0	1,1 \pm 0,2	35,8 \pm 14,3

E2: 17 β -Östradiol; P4: Progesteron; T: Testosteron; E2S: 17 β -Östradiolsulfat; E1S: Östronsulfat;

PREGS: Pregnenolonsulfat; CHOLS: Cholesteronsulfat

Weiterhin waren Androstendion (5,7 \pm 2,6 bis 6,8 \pm 4,6 ng/ml), Östron (1,8 \pm 1,7 bis 9,3 \pm 5,7 ng/ml), Androsteron(1,6 \pm 0,2 bis 2,1 \pm 0,3 ng/ml) und 17OH-Pregnenolon (5,4 \pm 1,1 bis 10,7 \pm 5,9 ng/ml) nachweisbar. Pregnenolon konnte aufgrund von Überlagerungen nicht eindeutig dargestellt werden. Dehydroepiandrosteronsulfat und 17OH-Pregnenolonsulfat lagen unter der Nachweisgrenze. 16OH-Dehydroepiandrosteronsulfat und Dihydrotestosteronsulfat konnten nicht detektiert werden.

Basierend auf den Konzentrationsbestimmungen der konjugierten und nicht konjugierter Steroidhormone soll ein IVM-System abgeleitet werden, welches zur Generierung von Eizellen mit höherer Entwicklungskompetenz führt.

Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG; FOR 1369). In gleichem Maße möchten wir uns für die Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Wudy und seinen Mitarbeitern für die LC-MS/MS - Messung bedanken.

Ultraschallgeleitete Follikelinjektion – eine Methode zur In-vivo-Überprüfung von Ergebnissen aus bovinen Follikelzellkulturen

A.Vernunft, T. Viergutz, V. Röttgen und J.M. Weitzel

Institut für Fortpflanzungsbiologie, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf

Zellkulturen bieten die Möglichkeit unter sehr standardisierten Bedingungen grundlegende Zellfunktionen zu untersuchen. Unter dem zunehmenden Leistungsdruck („pressure to publish“) sowie finanziellen und ethischen Einschränkungen fokussiert die Forschung vermehrt auf In-vitro-Methoden wie z. B. Zellkulturen. Um die Relevanz der Ergebnisse aus In-vitro-Versuchen für den Gesamtorganismus zu beurteilen ist es aber notwendig die Ergebnisse im In-vivo-Versuch zu verifizieren. Da dieses zunehmend unterbleibt, wird vermehrt eine mangelnde Nutzbarkeit und Reproduzierbarkeit der In-vitro-Ergebnisse für die angewandte Forschung beklagt (Nachrichtenüberblick des DFG-Büro Nordamerika über die Sitzung des President's Council of Advisors on Science and Technology (PCAST) am 31.01.14). Mit der Nutzung der Technik vom Ovum-Pick-Up (OPU) zur Follikelinjektion könnte sich bei Rindern ein kostengünstiges, minimal-invasives Verfahren zur In-vivo-Verifizierung von Ergebnissen von Follikelzellkulturen bieten.

Zur Follikelinjektion nutzen wir einen Ultraschallsondenträger, der für die Verwendung von einlumigen 17G OPU-Nadeln (Cook) vorgesehen ist. Er trägt eine 6,5 Mhz Sektor-Fingertip-Sonde, die an ein CS 9100 Ultraschallgerät von Picker (Hitachi) gekoppelt ist. Im Nadelkanal wird dazu ein Edelstahlröhrchen mit einem Durchmesser von 1,2 mm geführt, an das vorne ein Luer-Ansatz und hinten ein Lueraufsatz angelötet wurde. Für die Injektion wird eine extrapolierte 0,5 x 40 mm Injektionskanüle (Sterican, 25G x 1,5“ BL/LB, dental, B. Braun) aufgesetzt und eine feinskalierte 1 ml Spritze (Omnifix-F, B. Braun) angesetzt. Das Röhrchen und die Spritze werden zunächst mit steriler NaCl-Lösung entlüftet und dann die Kanüle aufgesetzt. Nun kann eine Versuchslösung mit der angesetzten Kanüle aufgezogen werden, eine kleine Luftperle trennt dabei die Versuchslösung von der Wassersäule im Röhrchen.

Die Rinder werden mit einer kleinen Periduralanästhesie (4 ml Procasel, Otto Fischer GmbH) und falls Fixiermöglichkeiten fehlen, durch eine leichte Sedierung (0,8 ml Xylazin 2%, Serumwerk Bernburg) vorbereitet. Ähnlich wie beim OPU, wird bei der Follikelinjektion von einer Person das Ovar rektal vor den vaginal gelegenen Sondenträger so manipuliert, dass die Kanüle indirekt über eine kleine Brücke aus Ovargewebe (2-3 mm) in den zu injizierenden Follikel von der Person vorgeschoben werden kann (siehe auch Hanstedt et al., AET-d 2010). Eine Hilfsperson injiziert vorsichtig die Versuchslösung, sobald sich die Kanüle im Ultraschallbild im Antrum des Follikels abbildet.

In einem aktuellen Forschungsprojekt untersuchen wir die Auswirkungen von oxidierten Phospholipiden auf die präovulatorische Follikelentwicklung. Einhergehend mit einer höheren Milchleistung und Stoffwechselumsatzes bei Milchkühen erhöht sich die Konzentration von oxidierten Lipiden im Serum von Milchkühen (Löhrke et al., 2005, Berl. Münch. Tierärztl Wochenschr.).

Diese interagieren mit dem LOX-1-Rezeptor, der auch auf Granulosazellen von präovulatorischen Follikeln zu finden ist (Löhrke et al., 2011, Cytometry Part A).

In der Zellkultur konnten wir zeigen, dass die Verhinderung der Bindung von oxidierten Phospholipiden an den LOX-1-Rezeptor (durch einen spezifischen Antikörper) die Östradiolproduktion der Granulosazellen in vitro signifikant ansteigen lässt (Weitzel et al., 2014, Cytometry Part A). Somit könnten hohe Konzentrationen von oxidierten Phospholipiden im Plasma von Milchkühen im Zusammenhang mit der Follikelqualität oder auch mit dem Ausbleiben der Ovulation (Theka-Zysten) über eine Verminderung der Östrogenproduktion bei Milchkühen stehen.

Um die Bedeutung dieser in vitro erlangten Ergebnisse für den Ovulationsprozess in vivo zu prüfen, werden bei Rindern im Diöstrus Brunsten mit einem PGF-Analogon (PGF-Veyx-Forte) eingeleitet und nach 54 Stunden die Ovulation mit einem GnRH-Analogon (Gonavet Veyx) standardisiert induziert. Direkt vor der GnRH-Gabe, zu Beginn des LH-Peaks (zwei Stunden nach GnRH) oder 16 Stunden nach der GnRH-Gabe werden 0,2 ml Versuchslösung in den dominanten Follikel injiziert, da eine LH-Abhängigkeit der LOX-1-Rezeptorexpression zu erwarten ist. Die Follikelentwicklung vor und nach der Injektion wird durch transrektale Ultraschalluntersuchungen von der Brunstinduktion bis zum Ovulationszeitraum dokumentiert.

Als Kontrolllösungen werden NaCl-Lösungen und Lösungen von unspezifischen Antikörpern eingesetzt. Als Versuchssubstanzen dienen spezielle LOX-1-Rezeptorblocker und Antikörper. Als positive Kontrolle werden spezifische COX-2-Hemmer verwendet.

Erste Ergebnisse zeigen, dass die Injektion von NaCl-Lösungen und Lösungen von unspezifischen Antikörpern (bis 2,5 µg) die Ovulation nicht behindern, eine Ovulation konnte meist zwischen 28 und 32 Stunden nach GnRH-Gabe beobachtet werden. Jedoch konnten ab einer Menge von 5 µg injizierten unspezifischen Antikörpern Immunreaktionen im Follikel beobachtet werden und die Ovulation blieb aus. Durch den Einsatz von spezifischen COX-2-Hemmern konnte der Ovulationsprozess zu den verschiedenen Zeitpunkten dagegen reproduzierbar gestoppt werden. Die Wirkung von LOX-1-Rezeptorblockern und Antikörpern auf das LOX-1-Rezeptorsystem lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend beurteilen, da der LOX-1-Rezeptor vermutlich eine modulierende Wirkung im Ovulationsprozess aufweist.

Zusammenfassend zeigen unsere Arbeiten, dass mit der ultraschallgeleiteten Follikelinjektion bei Rindern ein minimal-invasives, kostengünstiges Verfahren zu Verfügung steht, dass zur Verifizierung von In-vitro Forschungsergebnissen aus bovinen Follikelzellen genutzt werden kann.

Das laufende Forschungsprojekt wird von der deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt (DFG Projekt WE 2458/7-2).

Einfluss von exogen supplementiertem Progesteron auf das bovine Corpus luteum während der Frühträchtigkeit

Jan Punsmann¹, Hanna Stinshoff², Sandra Wilkening¹, Jan Queck³, Jan Detterer⁴,
Sabine Meinecke-Tillmann³, Christine Wrenzycki²

¹ Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover

² Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher
Ambulanz, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen

³ Institut für Reproduktionsbiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover

⁴ Verein Ostfriesischer Stammviehzüchter eG (VOST), Georgsheil

Während der Frühträchtigkeit des Rindes soll eine exogene Supplementation mit Progesteron (P4) dazu dienen, Trächtigkeitsraten zu optimieren. Zumeist erfolgt eine solche Supplementation über die Applikation einer hormonfreisetzenden intravaginalen Spange oder Spirale.

Ziel des vorliegenden Feldversuches war es, den Einfluss einer P4-Supplementation während der Frühträchtigkeit über den Einsatz einer CIDR®-Vaginalspange von Tag 4 bis 10 post inseminationem (p.i.) auf das bovine Corpus luteum (CL) zu untersuchen.

Insgesamt wurden auf elf Betrieben 60 Kühe der Rasse Holstein Friesian randomisiert drei verschiedenen Gruppen zugeteilt: (1) CIDR: Einsatz einer CIDR®-Vaginalspange von Tag 4-10 p.i.; (2) CIDR Placebo: Einsatz eines CIDR® Placebos von Tag 4-10 p.i. (3) Null: Unbehandelte Kontrollgruppe. Die Tiere wurden in Kleingruppen von drei bis neun Tieren zeitversetzt mit Hilfe des Ov-Synch-Verfahrens synchronisiert und besamt (Tag 0).

Zur Bestimmung der Serum-P4-Konzentrationen erfolgten an den Tagen -10, 0, 4, 6, 9, 12, 16, 20 und 42 jeweils morgens und an Tag 4 zusätzlich abends Blutprobenentnahmen. Ab Tag 4 wurden mit Hilfe transvaginaler Ultraschalldiagnostik sonographische Aufnahmen der CL angefertigt, um ihre Größe und Durchblutung zu bestimmen. An den Tagen 6, 9, 12, 16 und 42 erfolgte die Entnahme lutealen Gewebes unter Ultraschallkontrolle. Die Biopsien wurden hinsichtlich ihres Gehalts an P4 untersucht. An Biopsien der Tage 6, 12 und 42 wurde mittels RT-qPCR die relative Transkriptmenge von Schlüsselenzymen und -rezeptoren des Progesteron- und Prostaglandinstoffwechsels, sowie der Angiogenese (STAR, CYP11A1, HSD3B1, VEGF, PGR, LHCGR, PTGS2, PTGFR) bestimmt. Nach Trächtigkeitsuntersuchungen per Sonographie an den Tagen 30 und 42 erfolgte eine weitere Unterteilung der Tiere in folgende Gruppen: CIDR tragend (n=6), CIDR nicht tragend (n=7), CIDR Placebo tragend (n=8), CIDR Placebo nicht tragend (n=6), Null tragend (n=6), Null nicht tragend (n=8).

Bezüglich der Trächtigkeitsraten (CIDR: 46,2%, CIDR Placebo: 57,1%, Null: 42,9%), der mittleren Größe des CLs und des lutealen Blutflusses konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die Serum-P4-Konzentrationen der CIDR Tiere waren an Tag 4 abends und an Tag 6 signifikant höher als die der Tiere beider anderer Gruppen. Ebenso wiesen die tragenden Tiere der CIDR-Gruppe an Tag 9, 16, 20 und 42 signifikant höhere P4-Werte als die Tiere der anderen Gruppen.

Die relative luteale Transkriptmenge von CYP11A1 (an Tag 42) und HSD3B1 (an den Tagen 12 und 42) war bei den Tieren der CIDR Placebo-Gruppe signifikant höher als bei den Tieren beider anderer Gruppen.

Die relative luteale Transkriptmenge von VEGF war an Tag 6 bei den aus der CIDR tragend Gruppe gewonnenen Biopsien signifikant erhöht.

Die relative Menge des PGR war in den CL-Biopsien der CIDR Placebo-Gruppe an Tag 42 signifikant höher exprimiert als in den Biopsien, die von Tieren ohne Behandlung stammten.

Die Transkriptmenge des LHCGR war im Lutealgewebe der CIDR-Tiere (Tag 42) signifikant höher exprimiert als im Gewebe von Tieren der anderen Gruppen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die periphere P4-Konzentration durch das Einsetzen einer CIDR-Spange erhöhen lässt, wohingegen die anderen morphologischen Gelbkörpercharakteristika unbeeinflusst bleiben. Die molekulare Analyse der Corpus luteum-Biopsien lässt vermuten, dass weder P4- und Prostaglandinmetabolismus noch die Angiogenese durch die exogene P4-Supplementation beeinflusst sind. Nichts desto trotz beeinflusst die Supplementation die Expression des LHCGR, welches ursächlich für die erhöhte P4-Sekretion an Tag 42 sein könnte.

Ein positiver Einfluss auf die Trächtigkeitsraten konnte in diesem Versuchsansatz nicht nachgewiesen werden.

Eigenarten des Luteinisierungsverlaufes und des Follikelwachstums bei zyklischen, frühgraviden und erfolglos belegten Rindern.

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

In dieser Studie ging es darum abzuschätzen, inwiefern die Entwicklung frisch transferierter Rinderembryonen allenfalls dadurch beeinträchtigt wird, dass die Ovarien der Empfängertiere anfänglich nicht 'trächtigkeits-spezifisch' aktiv sind. Dazu wurde der Verlauf der Luteinisierung und die Anbildung der ersten beiden dominanten Follikel (DF) bei zyklischen (Gruppe C; n = 109), erfolglos belegten (Gruppe U; n = 31) und frühträchtigen (Gruppe P; n = 60) Braunvieh-Milchkühen und -Rindern vergleichend analysiert. Neben täglichen Messungen der Progesteronkonzentration (P4) im peripheren Blut der Versuchstiere (RIA) wurden deren Ovarien alle 1 bis 2 Tage palpatorisch untersucht.

In den ersten 4 Tagen (Tag 1 = Brunst) und ab Tag 14, wenn die Luteinisierungsphase abgeschlossen war, unterschieden sich die mittleren P4-Konzentrationen der Versuchsgruppen nicht signifikant ($p < 0.05$). In den dazwischen liegenden 10 Tagen zeigten die Corpora lutea (CL) unbelegter Tiere im Mittel stets die höchste, jene der erfolglos belegten stets die tiefste Aktivität. Die P4-Werte frühträchtiger Tiere verweilten bis etwa Tag 7 auf dem tiefen Niveau von Gruppe U, stiegen dann aber rasch an und verblieben anschliessend im gleichen Bereich wie jene von Gruppe C. Ein früher Beginn der ersten DF-Welle (vor Tag 5) war in Gruppe C mit erhöhter P4-Sekretion während der ganzen Luteinisierungsphase korreliert. In Gruppe U war eine ähnliche, aber weniger deutlich ausgeprägte Tendenz feststellbar, während in Gruppe P keine entsprechende Korrelation vorlag. Ein Zusammenhang zwischen Phasen relativ tiefer P4-Sekretion und einer verlängerten Verweildauer des DF1 war sowohl bei erfolgreich als auch bei vergeblich belegten Tieren, nicht aber bei jenen in Gruppe C, zu beobachten. In allen Versuchsgruppen war der Beginn der zweiten DF-Welle mit der relativen Intensität der Luteinisierung korreliert, allerdings war dabei zusätzlich von Bedeutung, ob eine Belegung vorangegangen war oder nicht. Bei unbelegten Tieren setzte die zweite DF-Welle sehr früh ein, wenn die P4-Konzentration im Blut rasch anstieg; andererseits wuchs der zweite DF in den Gruppen P und U erst extrem spät heran, wenn die CL-Aktivität anfänglich relativ tief war.

Gemäss den vorliegenden Beobachten gibt es bereits während der frühen Luteinisierungsphase spezifische Unterschiede zwischen der Ovaritätigkeit zyklischer, frühgravidier und erfolglos belegter Rinder. Die Ergebnisse weisen indirekt auf komplexe utero-ovarielle Interaktionen hin, welche neben der CL-Entwicklung auch das DF-Wachstum modulieren. Hinsichtlich der Auswahl geeigneter Embryonen-Empfängerinnen ist insbesondere beachtenswert, dass die P4-Sekretion unbelegter zyklischer Rinder in den Tagen kurz vor dem üblichen Transferzeitpunkt signifikant höher ist als jene frühgravidier und auch jene später umrindernder Tiere. Dabei stellt sich die Frage, inwiefern eher belegungs- als trächtigkeits-spezifische Effekte (Kontamination; Infektion; mechanische Reizung; Seminalplasma; etc.) den Beginn der Luteinisierung beeinträchtigen. Die anhaltend zögerliche CL-Entwicklung nach erfolglosen Belegungen könnte durchaus ein Anzeichen des Unvermögens sein, Irritationen des Endometriums rasch unter Kontrolle zu bringen. Da die gängige transzervikale Übertragung von Embryonen aus physiologischer Sicht zweifellos einen gravierenden Eingriff darstellt, wäre es wertvoll, die unmittelbare Reaktion des Luteingewebes darauf zu kennen. Solche Informationen könnten helfen abzuschätzen, inwiefern es allenfalls angezeigt ist, alternative Transfermethoden (z.B. Transfer der Embryonen durch die Scheiden- und die Uteruswand, zur Vermeidung der Cervixpassage) zu evaluieren.

Verfahrensgestaltung in modernen Besamungseberstationen

M Schulze, K Rüdiger, M Jung

Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V.

Als besonders wertvolles Zuchttier erfordert der Besamungseber eine Umwelt, die eine hohe Leistung bei langer Nutzungsdauer ermöglicht. Darüber hinaus sind geltende rechtliche Regelungen sowie Aspekte der effektiven Betreuung der Tiere zu berücksichtigen.

Die Spermagewinnung muss grundsätzlich so erfolgen, dass das Paarungsverhalten der Eber nicht gestört wird, die Ejakulate nicht mehr als unvermeidbar verunreinigt werden und die Befruchtungsfähigkeit des Spermas in vollem Umfang erhalten bleibt. Da das native Ejakulat bereits wesentlich zur Qualität des ausgelieferten, konservierten Spermas beiträgt, sind hohe Anforderungen an die hygienischen Verhältnisse bei der Spermagewinnung und -verarbeitung zu stellen. Bei der Spermagewinnung hat sich die „Handmethode“ durchgesetzt. Daneben sind in den letzten Jahren Geräte für eine halbautomatische Ejakulatgewinnung entwickelt worden (Bsp. Automate[®] der Fa. Minitüb & Collectis[®] der Fa. IMV). Zum Auffangen des Ejakulats werden überwiegend Einweg-Spermaauffangbeutel (44%) mit integriertem Gazefilter verwendet (US-Bag[®], Fa. Minitüb). Das bereits filtrierte Ejakulat wird unmittelbar nach der Gewinnung luftdicht in das Spermalabor verbracht (Erstversorgung). Für den Transport haben sich Rohrpostanlagen (50%) oder Durchreichen (50%) bewährt. Unerlässlich ist die sichere und unverwechselbare Kennzeichnung des Ejakulates. Ein Viertel der Stationen arbeitet heute mit einem Barcode-Etikett.

Der hohe Zeitdruck während der Spermaproduktion an Spizentagen und die Einhaltung hygienischer Anforderungen erfordern eine zweckmäßige Anordnung der Arbeitsplätze im Produktionslabor („Work Flow“). Für Ebersperma ist die Flüssigkonservierung über einen Zeitraum bis zu 120 h die Methode der Wahl. Der in Deutschland derzeit hauptsächlich verwendete EDTA-Verdünner ist BTS (Beltsville Thawing Solution). Die Verdünnung selbst muss immer bei gleicher Temperatur des Ejakulats (isotherm), der verwendeten Geräte und Instrumentarien und des Verdünners erfolgen. Eine wesentliche Voraussetzung für den Erhalt der Spermaqualität ist ein optimales Temperaturmanagement während der Produktion. Unzulänglichkeiten hierbei führen neben Motilitätsverlusten zu einem vermehrten Auftreten von Membranschäden. Im Wesentlichen wird zwischen einphasiger (33%) und mehrphasiger Verdünnung (66%) unterschieden. Die Wartezeit des nativen Ejakulates bis zur Erstverdünnung sollte 30 min nicht überschreiten. Gut für die Spermaqualität ist eine Zwischenlagerung der Tuben bei Raumtemperatur für ein bis zwei Stunden. Die abschließende Kühlgeschwindigkeit von 4°C bis 6°C je Stunde sollte nicht überschritten werden.

Über die notwendige Anzahl der Spermien je Besamungsdosis gibt es unterschiedliche Auffassungen. Sie muss so hoch sein, dass unter praktischen Bedingungen eine ausreichende Anzahl befruchtungskompetenter Spermien im weiblichen Genitale zur Verfügung steht, was von einer Vielzahl von Faktoren abhängt. Da in jedem Falle eine Mindestforderung für die Spermienmotilität über den Einsatz des Ejakulates entscheidet, kann bei der Berechnung des Verdünnungsgrades von der Spermiengesamtzahl im Ejakulat ausgegangen werden.

Die erfolgreiche Anwendung der künstlichen Besamung beim Schwein setzt eine stabile Spermaproduktion voraus. Dabei ist die Sicherung einer hohen Qualität des konservierten Eberspermas ein vorrangiges Anliegen einer jeden Besamungsstation.

Einfluss von Milchleistung, Eiweißgehalt und Körperkondition von hochleistenden Rindern auf die Inzidenz von Anovulationen und embryonalen Verlusten

A Boldt¹, F Becker², A Römer¹

¹Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei MV, Institut für Tierproduktion, Dummerstorf

²Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie; Dummerstorf

Embryonale Mortalität ist nach Schätzungen mit 57 % die Hauptursache der Fertilitätsstörungen bei Hochleistungskühen (INSKEEP und DAILY, 2005). Trotz hoher Fertilisationsraten von ca. 90 % in der Holstein-Friesian-Population beträgt der Anteil an früh abgestorbenen Embryonen 43 % (DISKIN und MORRIS, 2008).

Die Prävalenz von Anovulationen nach der Brunst liegt in einer Milchviehherde bei 20 % (GÜMEN et al, 2003; WILTBANK et al., 2006; WALSH et al., 2007a). Die Ursache liegt nach Meinung von WILTBANK et al. (2002) in einer Störung der Uterusinvolution, einer Infektion des Uterus oder anderen uterinen Anomalitäten, aufgrund derer die Sekretion und der Transport von PGF_{2α} zum Ovar reduziert ist und die Luteolyse des CL nicht stattfinden kann.

Das Ziel unserer Untersuchung war es, die Häufigkeit von Anovulationen nach der Brunst und embryonalen Verlusten anhand von Progesteronkonzentrationsmessungen zu erfassen und zu prüfen, ob die Leistung und die Körperkondition einer Milchkuh einen Einfluss auf diese Fruchtbarkeitsparameter ausüben.

Im Zeitraum von November 2009 bis Dezember 2012 wurden von insgesamt von 513 Kühen (678 Laktationen) der Rasse Deutsche Holsteins eines Milchviehbetriebes in Mecklenburg-Vorpommern Milchproben genommen um den Progesteron Gehalt (P4) zu bestimmen. Die Herde hatte im Versuchszeitraum eine durchschnittliche Milchleistung von 10.600 kg mit einem Fett- und Eiweißgehalt von 4,1 % bzw. 3,4 %. Einmal wöchentlich erfolgte die Probennahme aus dem Vorgemelk von Tieren der 3. Woche bis 14. Woche post partum. Die P4-Konzentration in der Milch wurde mittels des „on-farm“-Gerätes eProCheck® der Firma Minitüb und parallel im Labor des Leibniz-Institutes für Nutztierbiologie Dummerstorf analysiert.

Das Merkmal Anovulationen nach Brunst war gekennzeichnet durch einen nicht feststellbaren P4-Konzentrationsanstieg (< 5 ng/ml) am Tag 7 und Tag 8 nach einer erkannten Brunst bzw. KB und einer dementsprechenden P4-Konzentration auf Basalniveau. Wenn ein Tier ab dem 9. Tag bis zum 23. Tag nach der KB, nach vorangegangenem hohem P4-Konzentrationsniveau, wieder eine geringe P4-Konzentration (< 5 ng/ml) aufwies wurde dies als Nichtträchtigkeit gewertet. Frühe embryonale Verluste wurden charakterisiert durch P4-Konzentrationen, die ab dem 24. Tag bis zum 42. Tag nach der KB auf ein Referenzniveau (< 5 ng/ml) abfielen. Zur Überprüfung der Einflussfaktoren auf die Fruchtbarkeitsparameter wurde die 100-Tage-Leistung Milch, der Milcheiweißgehalt zur ersten Milchleistungsprüfung (MLP) nach dem Abkalben und die Rückenfettdickeveränderung (RFD) von der ersten zur zweiten MLP verwendet. Die statistische Analyse erfolgte mit SAS und der GLIMMIX-Prozedur. Für alle Signifikanzen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ unterstellt.

Die Analyse der Prävalenz von Anovulationen innerhalb der Untersuchungsherde ergab nach P4-Konzentrationen einen Anteil von 26,1 % an den Tagen 7 und 8 nach der KB. Nach der Merkmalsdefinition wurden 73,9 % der Kühe als nicht anovulatorisch eingestuft. Insgesamt wiesen 23,8 % der Kühe eine Nichtträchtigkeit auf. Bei 7,0 % der Kühe wurde ein embryonaler Verlust (EV) diagnostiziert. 69,2 % der Kühe konnten keines der beiden Merkmale zugewiesen werden.

Der Einfluss der Milchleistung, in Form der 100-Tage-Leistung, auf die Wahrscheinlichkeit einer Anovulation bestätigte sich nicht. Der Eiweißgehalt zur 1. MLP in der Milch erwies sich als signifikanter Einflussfaktor auf die Wahrscheinlichkeit einer Anovulation. Kühe mit einem Eiweißgehalt von 3,25 bis 3,5 % hatten mit 36,7 % eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit einer Anovulation als Kühe mit einem Eiweißgehalt von > 3,5 % (12,4 %; $p \leq 0,05$).

Die 100-Tage-Leistung Milch stellte sich als signifikanter Einflussfaktor ($p < 0,05$) auf die Wahrscheinlichkeit eines EV dar. Kühe mit einer Milchleistung von 3.000 bis 4.000 kg verzeichneten mit 2,9 % eine signifikant geringere Wahrscheinlichkeit eines EV als Kühe mit einer Milchleistung von 4.000 bis 5.000 kg (9,6 %; $p < 0,05$). Der Eiweißgehalt zur 1. MLP zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit eines EV. Die zur Körperkonditionsbeurteilung verwendete RFD-Veränderung von der 1. MLP zur 2. MLP hatte tendenziell einen starken Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit eines EV ($p = 0,09$). Eine hohe RFD-Abnahme von 7 mm und mehr im ersten Laktationsviertel, erhöhte die Wahrscheinlichkeit eines EV auf 12,4 %. Für Kühe mit moderater Abnahme bzw. Zunahme an RFD lag die Wahrscheinlichkeit eines EV bei 5,5 % bzw. 7,2 %.

Der Einfluss hoher Milchleistungen auf die untersuchten Fruchtbarkeitsparameter konnte nur z.T. bestätigt werden. Es wurde deutlich, dass insbesondere die Phase der NEB, hier dargestellt anhand des Milcheiweißgehaltes und der Körperkonditionsentwicklung, einen maßgeblichen Einfluss auf die reproduktive Leistung einer Milchkuh ausübt. Der Anteil an embryonalen Verlusten in der untersuchten Milchvieherde war auf Basis unserer Versuchsanstellung nicht so hoch, wie in der Literatur beschrieben.

Vergleich des Brunstverhaltens von Jungrindern bei induzierten und natürlichen Brunsten

V Roettgen^{1,2}, P C Schoen², F Becker¹

¹*Institut für Fortpflanzungsbiologie* ²*Institut für Verhaltensphysiologie; Leibniz Institut für Nutztierbiologie (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Deutschland*

Die Brunsterkennung ist ein entscheidender Faktor für ein erfolgreiches Milchrindmanagement. Die Beobachtung des Brunstverhaltens ist bis heute immer noch die zuverlässigste Methode. Die Duldung des Aufsprungs ist eine besonders spezifische Verhaltensweise um den Zeitpunkt der Brunst zu bestimmen. Neben diesen Verhaltensweisen gibt es eine Reihe weiterer gebräuchlicher und ungebräuchlicher Verhaltensparameter, die auf eine Brunst hinweisen können. Ein wenig erforschtes Brunstmerkmal ist die Vokalisationsrate.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Vergleich zwischen der mittels PGF induzierten Brunst und der natürlichen Brunst zu untersuchen. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf die Ausprägung brunstassoziiierter Verhaltensweisen gelegt.

Die Daten wurden aus Videoanalysen von drei Deutsche Holstein Färsen in einem Alter von dreizehn bis siebzehn Monaten gewonnen. Die Tiere wurden in einem etwa fünf mal zehn Meter großen Haltungsraum mit einem Gummiboden für die gesamte Dauer der Untersuchung gehalten.

Das Stallabteil wurde von zwei Kameras kontinuierlich über 24 Stunden überwacht, die Video- und Tonaufnahmen wurden auf einem Digitalrecorder zwischengespeichert und mit dem Programm Observer XT 10.1 ausgewertet.

Die Färsen erhielten bei natürlicher Brunst ab Tag 18 nach der zuletzt dokumentierten Brunst und bei der PGF induzierten Brunst ab dem Tag der Injektion bis zur sonographisch nachgewiesenen Ovulation täglich transrektale Ultraschalluntersuchung der Ovarien und Vaginoskopie. In der Ultraschalluntersuchung wurden die Größe und Anzahl der Follikel und die Lage des Gelbkörpers erfasst, bei der vaginoskopischen Untersuchung wurde Öffnungsgrad und Form der Cervix sowie Farbe und Feuchtigkeitsgrad der Vaginalschleimhaut dokumentiert.

Bei der Auswertung ging die Anzahl folgender Verhaltensweisen ein: Bespringen, Besprungen werden ohne Duldung, Besprungen werden mit Duldung, kopfseitiges Bespringen, Kinnauflegen, Beriechen der Vulva bei einem Herdenmitglied und die Vokalisation. Weiterhin wurde die Zeit erfasst, in der das Tier lag sowie der Zeitraum, in dem die Duldung des Aufsprungs durch ein Gruppenmitglied stattfand. Die Progesteron- und Estradiolkonzentration im Plasma wurden entsprechend gemessen.

Die statistische Auswertung der Daten zeigte hinsichtlich der untersuchten Verhaltensweisen keine signifikanten Unterschiede zwischen der induzierten und natürlichen Brunst.

Möglicherweise zeigen sich keine signifikanten Verhaltensunterschiede zwischen den Gruppen aufgrund der geringen Fallzahl, weshalb eine Weiterführung der Untersuchung mit zusätzlichen Färsen geplant ist.

Neben der Erhöhung der Fallzahl haben weitere Auswertungen mit folgender Fragestellung bereits begonnen:

Wie wirkt sich eine Superovulations-Behandlung auf das Verhalten aus?