

# Transfer gesexter Embryonen zur Erzeugung von segregierenden Familienstrukturen

<sup>1</sup>Spitschak, M.; <sup>1</sup>Becker, F.; <sup>2</sup>Oesterreich, D.; <sup>1</sup>Greising, T.; <sup>3</sup>Weikard, R.;  
<sup>3</sup>Kühn, Ch.;  
<sup>4</sup>Papstein, H.-J., <sup>1</sup>Kanitz, W.

Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Forschungsbereiche  
<sup>1</sup>Fortpflanzungsbiologie,  
<sup>3</sup>Molekularbiologie, <sup>4</sup>Tierexperimentelle Anlage,  
Wilhelm-Stahl-Allee 2, D-18196 Dummerstorf, <sup>2</sup>prakt. TÄ, D-18196 Dummerstorf

Durch die Selektion auf Milch- und Fleisch sind Rinderrassen entstanden, die sich phänotypisch deutlich voneinander unterscheiden. Milchrindrassen, wie Holstein-Friesian, als „Umsatz- oder Sekretionstyp“ sind besonders in der Lage, aus den Futtermitteln gebildete Stoffe mit der Milch zu sezernieren. Fleischrindrassen, wie z. B. Charolais, werden dem „Ansatzstyp“ zugeordnet und zeichnen sich durch ein hohes Fleischbildungsvermögen aus. Die genetischen und physiologischen Ursachen für das unterschiedliche Nährstoffumsatzverhalten sind jedoch unbekannt. Mit Hilfe des Modells von F2-Ressourcenfamilien dieser beider Ausgangsrassen sollen komplexe physiologische und genetische Grundlagen zu diesen Merkmalskomplexen untersucht und charakterisiert werden.

Grundlage ist die gezielte Kreuzung von reinrassigen DH-Kühen mit 5 ausgewählten Chabullen (P0-Generation) zur Erzeugung von Vollgeschwistern der F1-Generation. Um Kapazitäten einzusparen, wird zur Erzeugung ausschließlich weiblicher Nachkommen als zukünftige Donoren eine Geschlechtsdiagnose der Embryonen durchgeführt. Die F2-Generation, die entsprechend biomathematischer Versuchsplanung 460 Tiere umfassen soll, wird über die Embryonenproduktion von weiblichen F1-Jungrindern unter Anpaarung mit F1-Bullen der 5 Familien erstellt.

## Material und Methoden

Die DH-Donoren wurden mit „Ovagen“ superovuliert und 56 h sowie 72 h nach der ersten PGF<sub>2α</sub>-Applikation terminorientiert besamt. Die Spülung erfolgte an Tag 7. Nach der Befundung wurden von den Embryonen der Klassen 1 und 2 je ca. 6 bis 10 Blastomeren für die Geschlechtsdiagnose mittels „Leitz-Mikromanipulator“ entnommen. Zur Kryokonservierung wurde das „One-Step“-Verfahren auf Ethylenglycolbasis eingesetzt. Nach dem Auftauen wurden die Embryonen in Kultivierungsmedium umgesetzt, auf den morphologischen Zustand hin kontrolliert und auf zyklussynchrone Kuh- oder Jungrindrezipienten im Zeitraum 2/99 bis 3/00 übertragen.

Die Geschlechtsdiagnose erfolgte über einen PCR-Test, der auf der Basis einer neuen männlich spezifischen Sequenz (FBNY) entwickelt wurde und sowohl zum Sexing von boviner DNA bzw. von Embryoblasten eingesetzt werden kann. Der Vorteil dieses Tests (Weikard et al., Mol. Reprod. Dev., in press), besteht darin, dass hier in einer PCR-Reaktion mit einem Primerpaar neben der auf dem Y-Chromosom lokalisierten geschlechtsbestimmenden Sequenz ein zweites Fragment amplifiziert wird, das somit der internen PCR-Kontrolle dient. Zusätzliche Kontrollen zur Gewährleistung der Sicherheit der Geschlechtsbestimmung können hierdurch entfallen.

## Bisherige Ergebnisse: \_

1. *Embryonengewinnung*  
Nach 137 Superovulationsbehandlungen wurden 131 Spülungen durchgeführt. Davon konnten bisher 624 Embryonen (4,8 pro Spülung) nach vorheriger Biopsie tiefgefroren werden.

2. *Geschlechtsdiagnose*  
Von 604 diagnostizierten Embryonen wurden: 210 = 34,8 % als weiblich und  
280 = 46,4 % als männlich erkannt.  
Bei 114 = 18,9 % Embryonen konnte das Geschlecht nicht oder nicht sicher bestimmt werden. In den meisten dieser Fälle war die Diagnose aufgrund fehlender DNA (keine Amplifikation des internen Kontrollfragmentes) nicht möglich.  
96,3 % der als weiblich diagnostizierten Embryonen wurden als weibliche Kälber geboren. Von den 43 als fraglich transferierten Embryonen waren 12 Kälber weiblichen und 7 männlichen Geschlechts. Von 10 Kälbern, die aus dem Transfer nicht bioptierter Embryonen resultierten, waren 7 weiblich und 3 männlich.

3. *Embryotransfer*  
Insgesamt wurden 184 Transfers durchgeführt. Am Tag 35 wurden 92 Rezipienten (TR = 50 %) mittels Ultraschall als tragend diagnostiziert.

### *Trächtigkeiten nach Transfer bioptierter bzw. nicht bioptierter gefrierkonservierter Embryonen*

Embryotransfers	bioptierte Embryonen	bioptierte Embryonen	unbioptierte Embryonen
	Jungrindrezipienten	Kuhrezipienten	Jungrindrezipienten
Anzahl ET (n)	141	43	18
TU <sup>+</sup> d 35 (n) / (%)	80 / 56,7*	12 / 27,9*	12 / 66,7

\*P = 0,0017

Die Trächtigkeitsraten bei Jungrindrezipienten waren signifikant besser als bei Kuhrezipienten. Eine Reduzierung der Trächtigkeitsrate durch den Transfer bioptierter Embryonen war bisher nicht nachzuweisen. In 3 Fällen kam es zu Zwillingsgeburten nach dem Transfer bioptierter Embryonen. Das durchschnittliche Geburtsgewicht der Hybridkälber betrug  $47,3 \pm 6,5$  kg.

Die gezielte Erzeugung einer relativ großen Rinderpopulation über einen vergleichsweise kleinen Zeitraum ist nur unter Nutzung des komplexen Embryotransferverfahrens möglich. Erstmals wurde in größerem Umfang ein neues Sexingverfahren eingesetzt, welches gegenüber der bisher praktizierten Methode zeit- und kostensparender ist. Unter der Zielstellung, weibliche Nachkommen zu erzeugen, ist die Sicherheit der Geschlechtsbestimmung als gut einzuschätzen. Die Zellentnahme beeinflusst nicht die Trächtigkeitsrate, die Gefriertauglichkeit der Embryonen bleibt danach erhalten. Das Sexen von Embryonen ist dann ein Effektivitätsfaktor, wenn nur Nachkommen eines gewünschten Geschlechts erzeugt werden sollen.