

# Neuer Ansatz zur Kryokonservierung von Ziegensperma

<sup>1</sup>Becker-Silva, S.C.; <sup>2</sup>Holtz, W.

<sup>1</sup>FMVZ-Sao Paulo Universität; <sup>2</sup>Inst für Tierzucht und Haustiergenetik-Georg-August-Uni Göttingen

Bei der Kryokonservierung unterliegen die Spermatozoen großen Volumenschwankungen während des Einfrierens und Auftauens. Die Dehydrierung der Zellen in einer hyperosmotischen Lösung vor dem Einfrieren könnte sich günstig auswirken. Becker-Silva et al., (2004) zeigten, dass bei Zusatz von Saccharose zum Verdünner von Ziegensperma, eine Reduzierung der benötigten Glycerinkonzentration von Vorteil ist: Motilität (MOT) und Membranintegrität (MI) nach dem Auftauen bei 5°C waren verbessert. Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziel den Einfluß verschiedener Zuckerkonzentrationen im Samenverdünner und verschiedener Auftauverfahren zu ermitteln.

Die Untersuchungen wurden an 15 (Versuch 1) bzw. 9 (Versuch 2) Ejakulaten von vier Burenböcken durchgeführt. In Versuch 1 wurde das Sperma in 2 Schritten bei 30°C mit einem Tris-Eigelb (TE) Verdünner versetzt und über 2 h auf 4°C abgekühlt. Fünf Minuten vor dem Tiefgefrieren in Stickstoffdampf wurden folgende Kombinationen aus Saccharose-Glycerin (Sac;Gly) zugesetzt: Gruppe A: 375mM Sac/1,7% Gly; Gruppe B: 300mM Sac/3,4% Gly und Gruppe C: 300mM Sac/1,7% Gly. Die drei Gruppen wurden jeweils dreier verschiedener Auftauverfahren unterzogen: Auftauen und Ausverdünnen bei 5°C in 5 Schritten; Auftauen und Ausverdünnen bei 20°C in 5 Schritten und Auftauen und Ausverdünnen bei 20°C in 2 Schritten. Zum Ausverdünnen des aufgetauten Samens wurde der TE Verdünner verwendet. Als Vergleich diente das Ergebnis eines Standardgefrierverfahrens (TE + 6,8% Glycerin; aufgetaut bei 38°C für 30 sec). Direkt nach dem Auftauen war die MI der Gruppe C signifikant besser als die der Kontrollgruppe (die gleich 100% gesetzt wurde), unabhängig vom Ausverdünnungsverfahren (226% in 5 Schritten/5°C; 226% in 5 Schritten/20°C und 249% in 2 Schritten/20°C). In Gruppe A waren die besten MI-Ergebnisse beim Auftauen/Ausverdünnen in 5 Schritten/20°C (234%) und in 2 Schritten/20°C (213%). In Gruppe B waren die besten MI-Ergebnisse beim Verdünnen in 5 Schritten bei 5°C (223%) oder 20°C (236%). Die MOT war gleich für alle Gruppen. Nach zwei Stunden Inkubation war die MOT tendenziell höher in

Gruppen B und C, aufgetaut bei 20°C, die mit der niedrigeren Saccharosekonzentration eingefroren worden waren. Nach 6 h zeigten diese beiden Gruppen eine signifikant ( $p=0,0055$ ) bessere MOT wenn sie bei 20°C ausverdünnt wurden (Gruppe B: 33% und 28% bei Ausverdünnung in 5 bzw. 2 Schritten, Gruppe C: 29% und 28% in 5 bzw. 2 Schritten), wobei die Gruppe B bei 5-stufiger Ausverdünnung bei 20°C die besten Ergebnisse lieferte. Die Ausverdünnung bei 20°C erwies sich bei allen Gruppen als vorteilhaft.

In Versuch 2 wurde Trehalose (Trea) als alternatives Gefrierschutzmittel für Ziegensperma erprobt. Hierzu wurden die Spermien entweder mit 300mM Sac + 3,4% Gly, mit 300mM Sac oder mit 300mM Trea ohne Glycerin tiefgefroren und in 5 Schritten bei 20°C oder in einem Schritt bei 38°C aufgetaut und ausverdünnt. Die Ergebnisse der MI und MOT wurden wiederum mit dem Standardverfahren analog Versuch 1 verglichen. Die MI war in allen Versuchsgruppen besser erhalten ( $p=0,0024$ ) als in der Kontrollgruppe. Der Zusatz von Trehalose zeigte bei einstufigem Ausverdünnen bei 38°C die signifikant höchsten Werte (320% vs. 100% der Kontrollgruppe). Direkt nach dem Auftauen war die MOT bei allen Gruppen gleich ( $p=0,8361$ ), aber mit fortschreitender Kulturdauer waren die Spermien, die mit Trehalose tiefgefroren worden waren, deutlich motiler als die der Kontrollgruppe, insbesondere bei einer 5-stufigen Ausverdünnung bei 20°C (54% vs 26% der Kontrollgruppe, nach 6 Stunden Inkubation bei 38°C).

Diese Versuche zur Kryokonservierung von Ziegensperma haben gezeigt, daß auf den Zusatz des penetrierenden Gefrierschutzmittels Glycerin verzichtet werden kann, wenn die Spermien vorher eine Dehydrierung durch hohe Disaccharidkonzentrationen, wie Saccharose oder Trehalose, durchlaufen. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Spermien in einem Tris-Trehalose-Eigelb-Verdünner eingefroren und bei 20°C aufgetaut und in 5 Schritten ausverdünnt wurden.

<sup>2</sup>E.mail der Autoren: [wholtz@gwdg.de](mailto:wholtz@gwdg.de); [sbecker@usp.br](mailto:sbecker@usp.br)