

# AET-d

Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder

45. Jahrestagung

[www.aet-d.de](http://www.aet-d.de)

7. und 8. Juni 2018 in Mariensee



Andrea Lucas-Hahn

Andreas Kuwer

# **AET-d**

**Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer  
deutschsprachiger Länder**

**[www.aet-d.de](http://www.aet-d.de)**

**45. Jahrestagung in Mariensee**

**7. und 8. Juni 2018**

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

**Goldsponsor 2018**



**Silbersponsoren 2018**



## Bronzesponsoren 2018



## Sponsorenadressen

### Goldsponsor

**Calier Deutschland GmbH**  
Balsenstraße 2  
D - 27472 Cuxhaven

### Silbersponsor

**Vitoquinol GmbH**  
Reichenbachstr. 1  
D - 85737 Ismaing

**Worthington Cylinders GmbH**  
Beim Flaschenwerk 1  
A - 3291 Kienberg bei Gaming

### Bronzesponsoren

**Bodinco/ICPbio Reproduction**  
Hazenkoog 35B  
NL - 1822 BS Alkmaar

**Ceva Tiergesundheit GmbH**  
Kanzlerstr. 4  
D - 40472 Düsseldorf

**GYNEMED GmbH & Co . KG**  
Lübecker Str. 9  
D - 23738 Lensahn

**IMV Technolgies**  
ZI n° 1 Est  
F - 61300 L'Aigle

**Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH**  
Kampweg 12  
D - 37124 Rosdorf

**MASTERRIND**  
Osterkrug 20  
D - 27283 Verden

**Minitüb GmbH**  
Hauptstr. 41  
D - 84184 Tiefenbach

**RMP Medizinische Produkte**  
Eyber Str. 74  
D - 91522 Ansbach

**Veyx-Pharma GmbH**  
Söhreweg 6  
D - 34639 Schwarzenborn

**Zoetis Deutschland GmbH**  
Schellingstr. 1  
D - 10785 Berlin

# Programm

## Donnerstag, 7. Juni 2018

---

- 10:00 Praktikerseminar**  
**Molekulabiologische Methoden in der Tierzucht**  
B. Petersen
- 12:30 Registrierung und Willkommen - kleiner Imbiss**
- 13:45 Begrüßung und Vorstellung der neuen**  
**AET-d Webseite**  
A. Lucas-Hahn, 1. Sprecherin AET-d
- 
- 14:00-14:45 Sektion I**  
**Methoden in der modernen Tierzucht**  
Leitung: A. Lucas-Hahn
- 
- 14:00-14:30 Zur Entwicklung der Biotechnologie beim Nutztier** 8  
H. Niemann - Mariensee
- 14:30-14:45 Generierung eines Hornlos-Phänotyps bei Holstein-** 9  
**Friesian und Braunvieh Rinder mittels DNA-**  
**Nukleasen**  
F. Schuster, B. Petersen, J. Boch, H. Niemann -  
Mariensee, Hannover
- 
- 14:45-15:30 Kaffeepause und Industrieausstellung**
-

---

<b>15:30-16:30</b>	<b>Sektion II</b>	
	<b>Einflüsse auf den ET-Erfolg</b>	
	Leitung: R. Pokorny	
<hr/>		
<b>15:30-15:45</b>	<b>Einfluss einer diätetischen Supplementation von essentiellen Fettsäuren auf die Fettsäuremuster und die Entwicklung von Follikeln und Eizellen bei laktierenden Kühen</b>	<b>11</b>
	A. Vernunft, L. Vogel, M. Gnott, C. Kröger-Koch, J. Schön, D. Dannenberger, A. Baufeld, H. M. Hammon, J. Vanselow - Dummerstorf	
<b>15:45-16:00</b>	<b>Bedeutung des Embryotransfers für das Zuchtprogramm des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter</b>	<b>13</b>
	I. Sanders, J. Detterer, E. Busemann, M. Hölker - Bonn, Südbrookmerland	
<b>16:00-16:15</b>	<b>Trächtigkeitsraten nach Transfer von Embryonen aus Kühen mit subklinischer Endometritis</b>	<b>14</b>
	J. Egberts, J. Detterer, A. Park, S. Meinecke-Tillmann - Hannover, Südbrookmerland	
<b>16:15-16:30</b>	<b>Entwicklung eines Trächtigkeitsschnelltestes beim Rind</b>	<b>15</b>
	T. Krebs, C. Blaschka, J. Sondermann, I. Wiedemann, C. Lenz, M. Hennies, S. Kleinhaus, K. Mütze, K. Knipper, C. Knorr - Göttingen, Rheinbach, Alsfeld	
<b>16:30-16:45</b>	<b>Die integral gemessene Sekretionsleistung boviner Corpora lutea; ein aussagekräftiger Fertilitätsparameter</b>	<b>16</b>
	J. Schneeblei - Summaprada (Schweiz)	

---



---

**16:45-17:30** **Deutsche Genbank landwirtschaftlicher Nutztiere - Status quo**  
anschließend **Besichtigung der Deutschen Genbank**  
M. Henning - Mariensee

---

**17:30-19:00** **Pause**

---

**Ab 19:00** **Abendveranstaltung auf dem Gelände des Instituts für Nutztiergenetik**

## **Freitag, 8. Juni 2018**

---

**9:00-10:15** **Sektion III**

**In vitro-Produktion von Embryonen**

Leitung: H. Grothmann

---

**9:00-9:15** **Einfluss einer Vorinkubation der Spermien auf die Entwicklung und die Verteilung des Geschlechts bei bovinen in vitro produzierten Embryonen** 18

F. Kotarski, B. Zimmer, C. Wrenzycki - Gießen

**9:15-9:30** **Intrazytoplasmatische Spermieninjektion mit gesex-tem Sperma beim Rind** 19

L. Richter, F. Kotarski, B. Zimmer, C. Wrenzycki - Gießen

**9:30-09:45** **Theophyllin: Ein Schlüssel zur Verbesserung der In-vitro-Oozyten-Spermien-Interaktion?** 20

S. Bernal-Ulloa, S.E. Ulbrich - Zürich (Schweiz)

- 9:45-10:00** **Effect of melatonin and ethanol on in vitro embryo development, focused on embryonic developmental competence and kinetics** 21  
J.C. Gutiérrez-Añez, P. Aldag, A. Lucas-Hahn,  
H. Niemann - Maracaibo (Venezuela), Mariensee
- 10:00-10:15** **Einfluss der Zygotenherkunft und der Kulturbedingungen auf die Morphokinetik von individuell kultivierten Rinderembryonen** 22  
M. Hölker, S. Aouliyaou, F. Rings, E. Held-Hölker,  
D. Tesfaye, S. Etay, K. Schellander - Königswinter,  
Bonn
- 
- 10:15-11:00** **Kaffeepause und Industrieausstellung**
- 
- 11:00-12:15** **Workshop**  
**Einflussfaktoren auf den Befruchtungserfolg**  
Leitung: A. Kuwer
- 
- Beiträge von: M. Gehring, A. Kuwer, H. Melbaum,  
H. Grothmann
- 
- 12:15-12:30** **Änderungen/Vorschläge/Diskussion**  
A. Lucas-Hahn und A. Kuwer
- 
- 12:30** **Verabschiedung - kleiner Imbiss**

# **Zusammenfassungen der Vorträge**

# **Sektion I**

## **Methoden in der modernen Tierzucht**

## Zur Entwicklung der Biotechnologie beim Nutztier

**H. Niemann**

*Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Mariensee*

Vorläufer des heutigen Menschen sind nach aktuellen Forschungsergebnissen bereits vor 250- bis 300.000 Jahren erstmalig nachgewiesen worden. Nach langer Zeit des Lebens als Jäger und Sammler wurde mit der Domestikation der Nutztiere, die etwa 12- bis 15.000 Jahre vor Christi Geburt im Mittleren Osten begonnen hat, ein wesentlicher Schritt in der menschlichen Entwicklung getan, durch den zudem auch wesentliche Grundlagen für die heutige Landwirtschaft gelegt wurden. Ursprünglich wurden die domestizierten Tiere nach Phänotyp und/oder nach spezifischen Merkmalen ausgewählt und an das lokale Klima und an das jeweilige Produktionssystem angepasst. Wissenschaftlich basierte Züchtungskonzepte wurden erst mit dem Aufkommen von statistischen Methoden im 16. Jahrhundert entwickelt, was einen quantitativen Ansatz für die Selektion auf spezifische Merkmale ermöglichte. Heute sind genaue und zuverlässige Verfahren der DNA-Analyse entwickelt worden, die die quantitativen Ansätze deutlich erweitern und präzisere Bestimmungen des genomischen Zuchtwerts (GBF) einzelner Tiere bereits im frühen Alter (Embryo, Kalb) ermöglichen.

Die Auswirkungen dieser Entwicklung sind dramatisch verstärkt worden durch die Einführung der Reproduktionstechnologien, die den genetischen Einfluss einzelner hochwertiger Zuchttiere deutlich gesteigert haben. Die erste dieser Technologie war die künstliche Besamung (KB), die im späten 19. Jahrhundert entwickelt wurde, aber erst nach dem 2. Weltkrieg in der Rinderzucht systematisch eingesetzt wurde, zunächst vorwiegend um die vorherrschenden Genitalkrankheiten zu kontrollieren, aber bald auch um einen deutlich stärkeren Zuchtfortschritt über einzelne Vatertiere zu erreichen. Wesentliche Voraussetzungen dafür waren die Entwicklung von wirksamen Verdünnern und effektiven Gefrierverfahren für Spermien. Die zweite wesentliche Reproduktionstechnologie war der Embryotransfer (ET), der erstmals eine bessere Nutzung des weiblichen Genpools erlaubte. Durch neue Erkenntnisse in den biologischen Grundlagenwissenschaften im letzten Teil des 20. Jahrhunderts wurden diese Fortschritte im ET ermöglicht. Der Embryotransfer spielt heute eine wesentliche Rolle bei genetischen Spitzentieren, besonders beim Rind. Der Embryotransfer spielt bereits heute eine große Rolle bei Verfahren der in vitro Produktion von Embryonen, beim Embryo Sexing, beim Klonen und bei der Transgenese. Die ET-Technologie wird aber in der Zukunft noch erheblich an Bedeutung gewinnen, bedingt durch die Einführung von Züchtungsverfahren der nächsten Generation.

Ein weiterer wichtiger Schritt in der Entwicklung der heutigen modernen Tierzucht war „Dolly“, das geklonte Schaf, das im Jahr 1996 geboren wurde. Dadurch wurde ein jahrhundertealtes Dogma der Biologie, das nämlich eine differenzierte Zelle nicht in einen pluripotenten Zustand zurück programmiert werden konnte, beseitigt. Das Klonen ist bei einigen Spezies bereits so weit entwickelt worden, dass eine kommerzielle Anwendung für ausgewählte Anwendungsziele möglich ist. Klonen wird insbesondere eine größere Rolle im Zusammenhang mit dem sich rasant entwickelnden Genome Editing spielen, das eine Basenpaar genaue Modifikation des Genoms erlaubt und das Erreichen völlig neuer Zuchtziele, sowohl auf landwirtschaftlichem als auch auf biomedizinischem Anwendungssektor, ermöglicht. Dies wird zur Entwicklung von Precision Breeding Concepts führen, die helfen können, die großen Herausforderungen an die Tierzucht zu meistern, wie die Nahrungssicherung für die wachsende Weltbevölkerung, bei nur sehr begrenzt verfügbaren landwirtschaftlichen Flächen und wachsenden Umweltbegrenzungen.

## **Generierung eines Hornlos-Phänotyps bei Holstein-Friesian und Braunvieh Rinder mittels DNA-Nukleasen**

**F. Schuster<sup>1</sup>, B. Petersen<sup>1</sup>, J. Boch<sup>2</sup>, H. Niemann<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Mariensee*

<sup>2</sup>*Institut für Pflanzengenetik, Leibniz Universität Hannover*

Die Haltung horntragender Rinder ist mit beträchtlichen Verletzungsrisiken für Tier und Mensch verbunden. Daher werden Kälber möglichst früh enthornt. Da diese Prozedur bis zu einem Alter von sechs Wochen ohne Betäubung legal ist und mit erheblichem Stress und Schmerzen verbunden ist, wurde im Sinne des Tierschutzes das gemeinsame Ziel zur Zucht auf Hornlosigkeit vereinbart („Düsseldorfer Erklärung zur verstärkten Zucht auf Hornlosigkeit in der Rinderhaltung“, Mai 2012).

Die genomische Grundlage für die Hornlosigkeit bei verschiedenen Rinderrassen wurde weitestgehend aufgedeckt (Medugorac, Seichter et al. 2012). Hierbei konnten zwei allelische Varianten im sog. *horned*-Locus mit der Hornlosigkeit in Verbindung gebracht werden: Zum einen die *Keltische Mutation* (P<sub>C</sub>) und zum anderen die *Polled Friesian* Variante (P<sub>F</sub>). Bei der *Keltischen Mutation* handelt es sich um eine 202 bp InDel-Mutation, welche autosomal dominant vererbt wird. Die *Polled Friesian* Variante besteht aus einer 80 kb Duplikation und drei Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs), wobei weitestgehend unklar ist, welche Bedeutung die SNPs bei der Ausbildung der Hornlosigkeit haben.

Unter Verwendung der Nukleasen CRISPR/Cpf1 und TALEN wird die *Keltische Mutation* in das Genom von Zellen horntragender Holstein-Friesian und Braunvieh Rinder integriert (Knock-in), indem die Mutation mittels PCR isoliert und mit der jeweiligen Nuklease in Fibroblasten via Elektroporation co-transfiziert wurde.

Des Weiteren werden die jeweiligen SNPs der *Polled Friesian* Variante mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems in das Genom horntragender Rinder integriert um zu überprüfen, ob sie ebenfalls zu hornlosen Nachkommen führen.

Positive Zellklone werden weiter propagiert und dienen als Donorzellen für den somatischen Kerntransfer (SCNT) zur Generierung von Feten und lebenden Nachkommen. Die jeweils erste Trächtigkeit wird an Tag 90 unterbrochen und der Bereich der Hornanlage wird histologisch untersucht. Allais-Bonnet et al. (2013) konnten zeigen, dass bereits in diesem Stadium Unterschiede zwischen hornlosen und horntragenden Nachkommen festzustellen sind. Alle darauffolgenden Trächtigkeiten werden ausgetragen.

Wir danken dem Förderverein für Bioökonomieforschung e.V. (FBF) für die Unterstützung des Projektes.

## **Sektion II**

### **Einflüsse auf den ET-Erfolg**

## Einfluss einer diätetischen Supplementation von essentiellen Fettsäuren auf die Fettsäuremuster und die Entwicklung von Follikeln und Eizellen bei laktierenden Kühen

A. Vernunft, L. Vogel, M. Gnott, C. Kröger-Koch, J. Schön, D. Dannenberger, A. Baufeld, H.M. Hammon, J. Vanselow

*Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), Dummerstorf*

Eine bedarfsgerechte Versorgung mit ungesättigten, essentiellen Fettsäuren (EFS) ist für Wiederkäuer von besonderer Bedeutung, da die Pansenmikroben einen Großteil der ungesättigten Fette im aufgenommenen Futter sättigen (Biohydrogenierung). Wichtige EFS sind Linolsäure (C18:2 *n*-6) und Linolensäure (C18:3 *n*-3). Insbesondere Maissilagen enthalten nur geringe Mengen einiger essentieller Fettsäuren (18:3 *n*-3). Eine Supplementation von EFS in der Wiederkäuerration erfolgt mit dem Ziel, die Energieaufnahme zu steigern, das Immunsystem und die allgemeine Gesundheit zu stabilisieren, aber auch die Fruchtbarkeitsleistung zu verbessern. Für die positiven Wirkungen der EFS ist nicht nur ihre absolute Menge entscheidend, sondern auch das Verhältnis zwischen *n*3/*n*6 Fettsäuren. Eine indirekte positive Wirkung von konjugierten Linolsäuren auf die Fruchtbarkeit wird einer Verbesserung der Energiebilanz zugeschrieben, die sich durch eine Milchfettreduzierung ergibt. Direkte Wirkungen auf die Fortpflanzungsorgane und Gameten sind nur wenig erforscht. Stinshoff et al. (39. AET-d, 2012) konnten zeigen, dass der Zusatz von konjugierten Linolsäuren zum Kulturmedium die molekularen Eigenschaften von Rinderembryonen beeinflussen können, auch wenn die Blastozystenraten unverändert bleiben.

In diesem Teilprojekt wollten wir untersuchen, inwieweit diätetische Supplementationen mit EFS und CLA die Fettsäuremuster in und die Entwicklung von Follikeln und Eizellen verändern können. Im Rahmen des Verbundprojektes „FITCOW“ wurden 40 Deutsche Holstein Kühe in der zweiten Laktation mit einer Pansenfistel versehen, um über eine Sonde zwei Mal täglich eine definierte Menge an Fetten direkt in den Labmagen applizieren zu können. Basierend auf einer maissilagebentonten Grundration wurde von der neunten Woche a.p. bis achten Woche p.p. in vier Gruppen supplementiert. Die Kontrollgruppe erhielt Kokosnussöl (Contr), da dies fast ausschließlich aus gesättigten Fettsäuren besteht und einen sehr geringen Anteil an EFS hat (*n*6/*n*3=10/1, 76g/d). Die zweite Gruppe (EFS) erhielt v. a. *n*3-EFS (C18:3 *n*-3) durch Lein- und Distelöl (*n*6/*n*3=1/3; 78 u. 4g/d). Eine dritte Gruppe (CLA) erhielt konjugierte Linolsäuren (Lutalin® von BASF, 38g/d; enthalten je 10g Isomere C18:2 *c*9, *t*11 und C18:2 *c*10, *t*12) und eine vierte Gruppe EFS + CLA. Während der Versuchsphase wurde der Ovarzyklus überwacht und 48h vor der Schlachtung am Versuchsende (8. Woche p.p.) beim Vorliegen eines Corpus luteum eine Brunst durch PGF<sub>2α</sub> induziert. Nach der Schlachtung wurden der Uterus und die Ovarien entnommen und von den größten Follikeln die Follikelflüssigkeiten sowie Theka- und Granulosazellen konserviert. Die gewonnenen Follikelwandzellen werden mittels PCR molekularbiologisch untersucht. Durch Slicing der Ovarien wurden Kumulus-Oozyten-Komplexe gewonnen, die zu einem Teil für eine IVF verwendet wurden und zum anderen, separiert nach Oozyten und Kumuluszellen, für die Fettsäureanalytik archiviert wurden.

Die ersten Ergebnisse zeigen, dass die Ration und Supplementationen geeignet waren um die Fettsäuremuster und entsprechenden Konzentrationen signifikant im Plasma und in der Milch zu verändern, wie es aufgrund der Vorversuche zur Rationsgestaltung zu erwarten war (Haubold et al., 2017, Proc. Soc. Nutr. Physiol. 26:155; Vogel et al., 2018, Proc. Soc. Nutr. Physiol. 27:181).

In den Follikelflüssigkeiten wurden gegenüber dem Plasma vergleichbare Fettsäuremuster und Konzentrationen gefunden. Nach einer Eingruppierung der beprobten Follikel aufgrund ihres Entwicklungsstadiums (dominant, atretisch, Zyste) anhand der Steroidmuster in der Follikelflüssigkeit (E2, P4), Markergenen in den Follikelzellen (*CYP 19A1*, *CYP 17A1*, *PTSG2*) und ihrer Morpholo-



gie wurden keine unterschiedlichen Fettsäuremuster oder Gehalte in den Follikelflüssigkeiten in Abhängigkeit von den verschiedenen Follikelentwicklungsstadien gesehen.

Zum Zeitpunkt der Schlachtung (8 Wochen p.p.) waren 47% der Tiere zyklisch (Gelbkörper nachweisbar). Ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen wurde nicht festgestellt.

Durchschnittlich wurden von den Tieren  $50 \pm 19,5$  Oozyten gewonnen. Für eine IVF wurden  $8,6 \pm 1,5$  Oozyten pro Tier verwendet und  $43 \pm 18$  Oozyten für die Fettsäureanalytik zurückgestellt. Die Blastozystenraten waren insgesamt mit durchschnittlichen 14,7% niedrig. Zwischen den Versuchsgruppen wurden keine Unterschiede während der IVP beobachtet, jedoch waren die Entwicklungsraten insgesamt wesentlich niedriger als in den parallel gelaufenen Laborkontrollen mit Schlachthausmaterial (Blastozystenrate 49%).

In den vorliegenden Ergebnissen zeichnet sich ab, dass enteral aufgenommene essentielle Fettsäuren bis in die Follikel transportiert werden. Die Fettsäuremuster und Konzentrationen im Follikel scheinen unabhängig von dessen Entwicklungsstadium zu sein, da sie jeweils in vergleichbaren Mustern und Konzentrationen wie im Plasma vorlagen. Ob sich die Muster in die Kumuluszellen und die Oozyten im gleichen Maße fortsetzen, werden die zurzeit andauernden Untersuchungen zeigen. Bei der Interpretation der Ergebnisse, insbesondere der IVP, muss neben den relativ geringen Anzahlen beachtet werden, dass die Tiere im postpartalen Zeitraum mit negativer Energiebilanz geschlachtet wurden und erst die Hälfte einen Beginn des ovariellen Zyklus aufwies.

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages.

## **Bedeutung des Embryotransfers für das Zuchtprogramm des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter**

**I Sanders<sup>1,2</sup>, J Detterer<sup>2</sup>, E Busemann<sup>2</sup>, M Hölker<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institut für Tierwissenschaften, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*

<sup>2</sup>*Besamungs- und ET-Station Georgsheil, VOST Südbrookmerland*

Der Embryotransfer spielt in der Rinderzucht eine große Rolle und ist ein gängiges Verfahren im Rahmen der Produktion von Besamungsbullen. In der vorliegenden Studie wurde die Bedeutung des Embryotransfers für ein Zuchtprogramm exemplarisch am Beispiel des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter (VOST) untersucht. Besonders die Frage nach dem Erfolg und der Wirtschaftlichkeit dieses Verfahrens für die Zuchtorganisation war hier von Bedeutung.

Es zeigte sich, dass das ET-Team der Zuchtorganisation in den Wirtschaftsjahren 2013/2014 und 2014/2015 insgesamt 317 Spülungen an Tieren der Rasse Holstein durchgeführt hat, dabei handelt es sich bei 31,2% (99 von 317) um Rinderspülungen. 15,1% (48 von 317) der Spülungen wurden mit einem ET-Gutschein in Höhe von 500 Euro durch den VOST gefördert (47 Rinder, 1 Erstkalbskuh). Außerdem hat der VOST 269 Embryonen zum Zweck der Besamungsbullenproduktion zugekauft. Von diesen stammten 207 aus anderen Zuchtgebieten innerhalb Deutschlands und dem Ausland. Die übrigen 62 Embryonen stammen aus Spülungen innerhalb des Zuchtgebietes.

In den Wirtschaftsjahren 2015/16 und 2016/17 kamen insgesamt 39 Zuchtbullen der Rasse Holstein im ostfriesischen Zuchtgebiet zum Ersteinsatz. Davon stammen 35 Bullen aus dem Embryotransfer, wovon 21 als Jungbullen nach Vorliegen ihres genomischen Zuchtwertes zugekauft wurden. Die 14 übrigen Bullen wurden nach Übertragung der gespülten bzw. zugekauften Embryonen der Wirtschaftsjahre 2013/14 und 2014/15 geboren. Von diesen 14 Bullen wiederum resultierten 8 Bullen aus Embryonen, die vom VOST zugekauft wurden. Die 6 übrigen Zuchtbullen stammen von Embryonen aus dem eigenen Zuchtgebiet, davon wiederum 4 aus den mit einem Gutschein vom VOST geförderten Spülungen.

Zur Beurteilung der Ökonomie wurde für 12 dieser 14 o.g. Bullen in der Folge ermittelt, wie viele Spermaportionen von Ihnen in den ersten 12 Einsatzmonaten zu welchem Preis verkauft wurden (2 der 14 Bullen waren zu diesem Zeitpunkt noch keine 12 Monate im Einsatz und wurden deshalb nicht berücksichtigt). Der Verkaufspreis für eine Spermaportion variierte dabei zwischen 13 und 20 Euro.

Außerdem wurden die Erlöse der Kälber aus den ET-Programmen ermittelt, die nicht für den Besamungseinsatz selektiert und deshalb verkauft wurden. Zieht man von diesen Erlösen die Ankaufpreise der Bullen, die Kosten für einen Embryo und den Wert der ET-Gutscheine für vom VOST geförderte Spülungen ab, so kann unter Vernachlässigung der Produktions- und Haltungskosten der Zuchtbullen ermittelt werden, ob sich die gezielte Förderung von Spülungen und/oder die Investition in Importembryonen rentiert.

## Trächtigkeitsraten nach Transfer von Embryonen aus Kühen mit subklinischer Endometritis

J. Egberts<sup>1,2</sup>, J. Detterer<sup>2</sup>, A. Park<sup>2</sup>, S. Meinecke-Tillmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

<sup>2</sup>Besamungs- und ET-Station Georgsheil, VOST Südbrookmerland

Die subklinische Endometritis des Rindes wird seit Jahren in der internationalen Wissenschaft kontrovers diskutiert, beginnend bei der Diagnostik bis hin zu den Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit betroffener Kühe und wirtschaftlichen Schäden. Ziel der vorliegenden Analyse war es, festzustellen, ob sich das veränderte Uterusmilieu der Donoren auf die Trächtigkeitsergebnisse nach Transfer ihrer Embryonen in gesunde Empfängertiere auswirkt.

Von September 2014 bis Dezember 2015 erfolgten 62 Embryonengewinnungen (EG) bei 56 Holsteinkühen ( $\bar{O}$  4,4  $\pm$  1,8 Laktationen). Die Tiere befanden sich am Tag 245  $\pm$  180 der Laktation. Während der Voruntersuchung vor der EG (Zyklustag 6–13; D0 = Tag des Brunstbeginns) wurden mittels einer modifizierten Cytobrush<sup>®</sup>-Methode drei Endometriumabstriche/Tier (Corpus und Cornua uteri) gewonnen. Nach Diff-Quick<sup>®</sup> Färbung wurden 300 Zellen/Objekträger in Epithelzellen und PMN differenziert und die Tiere anhand zwei verschiedener Grenzwerte (3% und 5% PMN) in die Gruppen „subklinische Endometritis, SE“ bzw. „gesund, G“ eingeteilt. Die EG erfolgte am 7. Zyklustag.

Von 310 gewonnenen transfertauglichen Embryonen wurden nur die 91 frisch übertragenen in den Versuch aufgenommen. Ihr Transfer (ET) erfolgte innerhalb von 3 h nach EG in zyklussynchrone (D7  $\pm$  1), gesunde Rezipientinnen (84 Färsen und 7 Kühe). Eine Trächtigkeit der Empfängertiere wurde 34,0  $\pm$  7,5 Tage nach dem ET mittels Ultraschall verifiziert.

Bei Annahme eines Grenzwertes von 5% PMN, stammten 14 (Qualität nach IETS: 9x1, 5x2) bzw. 77 (Qualität: 30x1, 36x2, 11x3; Gruppe SE vs. G: p = 0,13) der gewonnenen, frisch übertragenen Morula- und Blastozystenstadien aus SE- bzw. G-Kühen. Der ET von G-Embryonen führte in 66,2% (51/77) der Fälle zu einer Gravität, wohingegen die 14 SE-Embryonen in 12 Trächtigkeiten (85,7%; p = 0,21) resultierten. Demgegenüber wurden bei einem Grenzwert von 3% PMN 43 frisch transferierte Morula- und Blastozystenstadien (Qualität: 24x1, 17x2, 2x3) aus belasteten und 48 (Qualität: 15x1, 24x2, 9x3; Gruppe SE vs. G: p = 0,02) aus unbelasteten Tieren gewonnen. Hier wurden mit SE-Embryonen bei 72,1% (31/43) und mit G-Embryonen bei 66,7% der Rezipientinnen (32/48; Gruppe SE vs. G: p = 0,65) Trächtigkeiten erzielt.

Diese Ergebnisse, die an einer größeren Versuchsgruppe verifiziert werden sollten, deuten darauf hin, dass transfertaugliche D7-Embryonen, die aus Donorkühen mit subklinischer Endometritis, aber nach abgeschlossenem Puerperium gewonnen werden, keine geringeren Trächtigkeitserfolge erwarten lassen, als Embryonen aus einem unbelasteten Milieu.

## Entwicklung eines Trächtigkeitsschnelltestes beim Rind

**T. Krebs<sup>1</sup>, C. Blaschka<sup>1</sup>, J. Sondermann<sup>1</sup>, I. Wiedemann<sup>1</sup>, C. Lenz<sup>2</sup>, M. Hennies<sup>3</sup>, S. Kleinhans<sup>4</sup>, K. Mütze<sup>4</sup>, K. Knipper<sup>5</sup>, C. Knorr<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Department für Nutztierwissenschaften, Abteilung Biotechnologie und Reproduktion landwirtschaftlicher Nutztiere, Georg-August Universität Göttingen*

<sup>2</sup>*Core Facility Proteomics, Institut für klinische Chemie, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen*

<sup>3</sup>*TECOdevelopment GmbH, Rheinbach*

<sup>4</sup>*Hessischer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfung in der Tierzucht e.V., Alsfeld*

<sup>5</sup>*Fassisi, Gesellschaft für Veterinärdiagnostik und Umweltanalysen mbH, Göttingen*

Der Nachweis von trächtigkeitsassoziierten Glykoproteinen („pregnancy-associated glycoproteins“, PAG) ist ein Verfahren, das zur frühen Trächtigkeitsdiagnose sowie zur Überwachung einer Trächtigkeit bei Kühen und weiteren Wiederkäuern genutzt werden kann (Szafranska et al., 2006, *Reprod Nutr Dev* 46, 481-502; Wallace et al., 2015, *Reproduction* 149, R115-R126). Die Konzentration der PAG im Serum steigt ab dem 24. Trächtigkeitstag deutlich an, sodass eine verlässliche Trächtigkeitsdiagnose ab dem 30. Tag p.i. möglich ist (Friedrich & Holtz, 2010, *Reprod Dom Anim* 45, 142-146; Wallace et al., 2015, *Reproduction* 149, R115-R126).

Alle bisher beschriebenen Testsysteme für die Analyse der PAG benötigen ein Labor, mit Ausnahme eines vor kurzem entwickelten Lateral-Flow-Testsystems, welches es ermöglicht, anhand eines Tropfens Blut innerhalb von 10 min ein Trächtigkeitsergebnis vor Ort zu erhalten (Fassisi GmbH, 2017. Fassisi BoviPreg [WWW Document]. <https://www.fassisi.at>. URL <https://www.fassisi.at/produkte/großtiere/rinder-fassisi-bovipreg/> (accessed 7.19.17)).

Ziel der hier vorgestellten Arbeit ist es, ein Lateral-Flow-Testsystem für die Matrix Milch zu entwickeln. Damit wäre es dem Landwirt ohne größeren Aufwand möglich, bei vermutlich geringen Kosten, innerhalb kurzer Zeit Trächtigkeitsdiagnosen seiner Tiere zu erhalten.

Es wurden Kotyledonen auf Schlachthöfen gewonnen und anhand der Scheitel Steiß Länge der Föten in vier verschiedene Trächtigungsabschnitte eingeteilt (frühe Trächtigkeit 20-90 Tage n=46; mittlere Trächtigkeit 91-180 Tage n=59; späte Trächtigkeit 181-240 Tage n=18; 240 Tage-Geburt n=5). Die Proben werden mittels "Fast protein liquid chromatography" (FPLC) aufgereinigt und die daraus erhaltenen PAG in Fraktionen aufgetrennt. Ein Aliquot dieser PAG-Fraktionen wurde für die Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung verwendet (gegenwärtig n=5), während ein zweites Aliquot massenspektrometrisch mittels LC/MS/MS analysiert wird, um die proteinanalytische Identifikation und Differenzierung der PAG zu ermöglichen. Die gewonnenen Antikörper werden auf ihre Eignung überprüft, PAG im Milch Lateral Flow Test nachzuweisen. Dafür werden seitens des HLV Milch- und Blutproben von trächtigen Tieren über die Gesamtdauer der Trächtigkeit im monatlichen Abstand gesammelt.

Weiterhin wird die relative Expression verschiedener PAG-Transkripte (boPAG1, boPAG2, boPAG8, boPAG9, boPAG10, boPAG11, boPAG12 und boPAG21) in den unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien untersucht.

## **Die integral gemessene Sekretionsleistung boviner Corpora lutea; ein aussagekräftiger Fertilitätsparameter**

**J. Schneebeli**

*Summaprada; Schweiz*

Die Progesteronkonzentration (P4) im peripheren Blut oder in der Milch von Kühen ist ein fertilitätsrelevanter Parameter, dessen Aussagekraft durch die Art der Befunderhebung wesentlich beeinflusst wird. Während stichprobenartige Einzelbestimmungen meist nur dazu dienen können, die Anwesenheit eines aktiven Corpus luteum (CL) zu prüfen (z.B. bei der Beurteilung der Spender- oder Empfängertauglichkeit von ET-Tieren), lassen sich mit täglich wiederholten Messungen komplexe Korrelationen zwischen der sekretorischen Aktivität des CL, dem Wachstum dominanter Follikel (DF) und dem uterinen Milieu nachweisen. In dieser Studie wurde ein weiter verfeinertes Interpretationsverfahren getestet, das speziell individuellen Variationen der CL-Aktivität Rechnung trägt.

Anstatt wiederholte P4-Bestimmungen, wie bisher üblich, lediglich als einzelne Messpunkte einer Datenserie anzusehen (serielle Methode), wurden sie nun auch als Komponenten einer sich schrittweise kumulierenden Gesamtmenge betrachtet (integrale Methode). Somit lassen sich innerhalb eines frei definierbaren Zeitraumes die aktuelle und die gesamte Sekretionsleistung eines CL stets direkt miteinander vergleichen. Für die Studie standen Daten aus Verlaufsuntersuchungen der Ovaritätigkeit an Schweizer Braunviehkühen zur Verfügung (360 Lutealphasen; tägliche P4-Messungen im peripheren Blut mittels RIA; kontinuierlich wiederholte palpatorische Ovarkontrollen alle 1 bis 2 Tage). Die statistische Auswertung der Daten basiert auf Boxplot-Diagrammen und der Berechnung von Spearman Korrelationen.

Die Vergleiche zwischen seriell und integral erfassten P4-Messungen ermöglichten eine differenzierte Betrachtungsweise verschiedener bisher unvollständig verstandener Beobachtungen. So zeigte sich, dass die beachtliche Variabilität der P4-Sekretion während der CL-Anbildung insgesamt weit mehr anhaltenden unterschiedlichen Trends als individuellen kurzfristigen Fluktuationen zuzuschreiben ist. Hinsichtlich der schlechten Optimierbarkeit gängiger ET-Verfahren sind mehrere mit der integralen Methode gewonnene Erkenntnisse relevant. Die CLs zyklischer, erfolglos und erfolgreich belegter Tiere unterscheiden sich offensichtlich nicht nur kurz nach der Brunst bezüglich der aktuellen Aktivität sondern später auch hinsichtlich der im gesamten Entwicklungsverlauf freigesetzten P4-Menge. Gemäss integraler Auswertung sind anhaltend erhöhte P4-Werte im Blut kaum die Ursache eines frühen Beginns der 2. DF-Welle wohl aber ein Begleitsymptom. Die sekretorische Kapazität von CLs, die aus mehr als 6 Tage lang (palpatorisch) erkennbaren Brunstfollikeln entstehen, wird durch die Aktivität des in Rückbildung begriffenen Vorgängers mitbestimmt. In dieser Studie erweist sich die integrale Auswertungsmethode als wertvolle Zusatzoption, die den diagnostischen Wert kontinuierlich wiederholter P4-Messungen erhöht, ohne zusätzliche Eingriffe an den Probanden zu erfordern.

## **Sektion III**

### **In vitro-Produktion vom Embryonen**

## **Einfluss einer Vorinkubation der Spermien auf die Entwicklung und die Verteilung des Geschlechts bei bovinen in vitro produzierten Embryonen**

**F. Kotarski, B. Zimmer, C. Wrenzycki**

*Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen*

Die In-vitro-Produktion (IVP) ist beim Rind seit vielen Jahren eine Routinemethode, um Embryonen zu erzeugen. Sie wird im Rahmen eines Ovum Pick Up (OPU)-Programms, nach Schlachtung/Tötung oder Ovarrektomie des Spendertieres angewendet. Ziel dieser Studie war die Optimierung der Entwicklungsgeschwindigkeit boviner Blastozysten. Es wurde verglichen, ob durch eine Vorinkubation der Spermien in HHE (Hypotaurin-Heparin-Epinephrin) –Fertilisierungsmedium, ein Einfluss auf die Entwicklungsgeschwindigkeit der Blastozysten zu erreichen ist. Des Weiteren sollte mittels PCR untersucht werden, ob sich der bekannte Zusammenhang zwischen der Entwicklungsgeschwindigkeit und dem Geschlecht der Blastozysten zeigt.

Es wurden Ovarien geschlechtsgesunder Kühe auf dem Schlachthof Olpe entnommen, Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) mittels Slicing-Methode isoliert und für 24 Stunden bei 39°C und 5% CO<sub>2</sub> in TCM-Reifungsmedium mit 0,1% BSA und 10 IU PMSG/5 IU HCG pro ml gereift. Die In-vitro-Fertilisation der in zwei Gruppen unterteilten gereiften KOK fand in FertTALP-Medium mit HHE statt. Tiefgefriersperma zweier IVF-tauglicher Bullen stand für diesen Versuch zur Verfügung, dargestellt sind die Ergebnisse eines Bullen. Das Sperma wurde bei 38°C im Wasserbad aufgetaut. Die Bestimmung der Motilität und Dichte erfolgte mit Hilfe eines CASA-Systems (AndroVision, Firma Minitüb). Durch Zentrifugation mit einer 90%igen Lösung aus Spermfilter und Fert-Talp-Gebrauchslösung wurde das Tiefgefriersperma aufgearbeitet. Daran schlossen sich zwei weitere Waschschritte des Spermapellets an, der erste mit FertTALP-Gebrauchslösung und der zweite mit FertTALP-Gebrauchslösung plus HHE. Anschließend erfolgte erneut die Ermittlung der Motilität und Dichte. Dies diente dazu, den Einfluss der Motilität und Dichte auf die Entwicklungsraten auszuschließen und beide Gruppen möglichst genau vergleichen zu können. Durch die Aufarbeitung konnte die Motilität der Spermien durchschnittlich fast verdoppelt werden. Für die KOK der Gruppe A wurden 100.000 Samenzellen in 100 µl HHE-Fertilisierungsmedium für 1 Stunde vorinkubiert und anschließend die gereiften KOK hinzugefügt. In Gruppe B wurden die gereiften KOK direkt in den HHE-Fertilisierungstropfen überführt und ebenfalls mit 100.000 Spermien ohne Vorinkubation versetzt. Nach 18 Stunden bei 39°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die Denudierung der vermeintlichen Zygoten. Die Kultivierung in SOFaa-Medium bei 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 39°C (ölüberschichtet) schloss sich an. Die Teilungs- und Entwicklungsraten wurden exakt auf die Stunde genau an Tag 7 und 8 erhoben. Blastozysten von Tag 7 und Tag 8 wurden bei -80°C bis zur Ermittlung des Geschlechts mittels PCR unter Verwendung boviner und Y-Chromosom-spezifischer Primer eingefroren. Die Ergebnisse der PCR stehen noch aus.

Insgesamt wurden in Gruppe A 154 und in Gruppe B 166 KOK (jeweils 4 Wiederholungen) eingesetzt. Die Teilungsrate der Embryonen der Gruppe A lag bei 79,1±5,6% und Gruppe B bei 67,4±4,5%. An Tag 7 betrug in Gruppe A die Gesamt-Entwicklung (Morulae und Blastozysten) 34,8±4,1%, verteilt auf 58,3±11,1% Blastozysten und 41,7±11,1% Morulae. In Gruppe B lag die Gesamt-Entwicklungsrate bei 29,6±6,1%, das Verhältnis lag hier bei 25,1±6,2% Blastozysten und 74,9±9,6% Morulae. An Tag 8 war die Gesamt-Entwicklung der Embryonen in beiden Gruppen ähnlich (Gruppe A: 34,8±4,1; Gruppe B: 31,1. ±4,6).

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass sich durch die Präinkubation der Spermien die resultierenden Embryonen schneller zur Blastozyste entwickeln.

## Intrazytoplasmatische Spermieninjektion mit gesextem Sperma beim Rind

L. Richter, F. Kotarski, B. Zimmer, C. Wrenzycki

*Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen*

Bei der intrazytoplasmatische Spermieninjektion erfolgt die Injektion eines einzelnen Spermiums direkt in das Zytoplasma einer Oozyte. Die ICSI-Technologie wird in dieser Art vor allem zur Produktion transgener Tiere, bei männlicher In- oder Subfertilität und für Untersuchungen grundlegender Faktoren der Gameten-Interaktion genutzt. Beim Rind müssen, im Unterschied zum Pferd, die Oozyten nach der ICSI zusätzlich aktiviert werden. Eine Aktivierung der Oozyten kann dabei auch ohne paternalen Anteil erfolgen und zu einer parthenogenetischen Entwicklung bis über das Blastozystenstadium hinaus führen. Morphologisch sind diese parthenogenetischen Entwicklungsstadien nicht von tatsächlich befruchteten Blastozysten zu unterscheiden. Um einen Nachweis für die paternale Beteiligung zu erlangen, wurde Y-chromosomal-gesextes Bullensperma eingesetzt. An den entwickelten Embryonen kann unter Verwendung boviner Y-chromosom-spezifischer Primer die paternale Beteiligung nachgewiesen werden.

Für die Versuche wurden Ovarien geschlechts gesunder Tiere vom Schlachthof Olpe in das Labor transportiert. Die Gewinnung der KOK erfolgte mittels der Slicing-Methode. Die In-vitro-Maturation der KOK fand in TCM-Reifungsmedium, supplementiert mit 0,1% BSA, 10 IU/ml PMSG und 5 IU/ml HCG, statt. Diese wurden unter einer feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre bei 39°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank für 22 h gereift. Mit Hilfe von 3%iger Hyaluronidase-Lösung konnten die Kumuluszellen entfernt werden. Nur Oozyten, die den ersten Polkörper ausgeschleust hatten, wurden verwendet. Das Tiefgefriersperma wurde vor der Injektion mit einer 90%igen Lösung aus Spermfilter aufgearbeitet und am Mikromanipulator unter Verwendung einer ICSI-Pipette mit einem Durchmesser von 8 µm und Spike in die Oozyten injiziert. Anschließend erfolgte eine chemische Aktivierung mit 5 µM Ionomycin für fünf Minuten, gefolgt von einer Zwischenkultivierung für drei Stunden in TALP- Gebrauchslösung. Im Anschluss daran wurden die Oozyten für drei weitere Stunden in 1,9 mM 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), gelöst in SOFaa- Kulturmedium, aktiviert, gewaschen und für 8 Tage bei 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 39°C ölüberschichtet kultiviert. An Tag 7 und 8 wurden die Teilungs- und Entwicklungsraten erhoben. Eine rein chemisch aktivierte Gruppe, sowie zwei weitere ICSI-Gruppen (nicht gesextes und X-chromosomal-gesextes Sperma) und eine IVF-Gruppe dienten als Kontrolle.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse in den verschiedenen Gruppen, die Anzahl der injizierten Oozyten und die der Durchgänge, sowie die Teilungs- und Entwicklungsraten an Tag 7 und 8.

Gruppe		Spermien	Bulle	Oozyten [n]	Durchgänge [n]	Teilungsrate [%]	Entwicklungsrate	
							Tag 7 [%]	Tag 7+8 [%]
Kontrollgruppen	ICSI	nicht gesext	E	524	25	49,2±18,0	9,5±7,9	11,6±10,6
		X-chrom. gesext	F	70	3	51,4± 7,7	5,7±2,1	7,1±2,8
	chem. aktiviert	---	---	527	23	44,0±11,9	9,1±3,7	9,7±3,5
	IVF	nicht gesext	E	947	15	66,7±9,7	29,8±6,4	33,0±7,4
Versuchsgruppen	ICSI	Y-chrom. gesext	A	205	11	30,0±18,5	6,3±5,2	7,1±6,6
			B	82	4	40,9±13,1	9,8±4,4	11,0±3,6
			C	72	4	27,8±14,7	1,4±3,1	1,4±3,1
			D	76	4	15,8±5,4	0,0	0,0

Die Versuche zur Ermittlung der paternalen Beteiligung nach ICSI mit Y-chromosomal gesextem Sperma werden zurzeit durchgeführt.

Die stark schwankenden Teilungs- und Entwicklungsraten weisen auf eine bullenabhängige Tauglichkeit des Spermias für die ICSI hin.

Wir danken Stephane Alkabas (Masterrind) für die Bereitstellung des gesexten Spermias.



## Theophyllin: Ein Schlüssel zur Verbesserung der In-vitro-Oozyten-Spermien-Interaktion?

S. Bernal-Ulloa, S.E. Ulbrich

*ETH Zürich, Tierphysiologie, Institut für Agrarwissenschaften, Schweiz*

Um eine In-vitro-Fertilisation (IVF) durchzuführen, wird eine gute Spermienqualität benötigt. Bislang wurden viele Anstrengungen unternommen, um die Spermien-normale Penetrationsfähigkeit für die In-vitro-Embryoproduktion (IVP) zu verbessern. Die Spermienkapazität bei Rindern bleibt jedoch ein Flaschenhals für die IVF, da die Spermien unterschiedlich stark auf die verschiedenen Supplemente im IVF-Medium bei unterschiedlichen Spermienkonzentrationen ansprechen, was den Prozess für jeden Bullen suboptimal macht (Seidel, 2016, *Reprod Fertil Dev* 28, 125-129). Theophyllin ist ein Methylxanthin, das als kompetitiver, nicht selektiver Phosphodiesterase (PDE) -Inhibitor wirkt, um intrazelluläres cAMP zu erhöhen. Es wurde kürzlich berichtet, dass es die In-vitro-Blastozystenproduktion aufgrund verlängerter Motilität und Langlebigkeit von Rindersperma während der IVF verstärkt und aufrechterhält (Kang et al., 2015, *J Reprod Dev* 61, 99-105). Hier untersuchten wir die Auswirkungen von Theophyllin-Supplementierung während der IVF auf Entwicklungsraten von Bullen mit bekannter niedriger und durchschnittlicher Blastozystenproduktion unter Standardbedingungen. Rinderovarien wurden von einem örtlichen Schlachthof gesammelt. Insgesamt wurden 3057 Kumulus-Oocyten-Komplexe (KOK) durch Schneiden erhalten. Nur KOK aus den Qualitäten I (>4 Schichten kompakte Kumuluszellen (CC), klares und gleichmäßiges Cytoplasma) und II (<4 CC-Schichten, Cytoplasma mit größerem Aussehen) wurden für 24 h einer In-vitro-Reifung (IVM) unterzogen. Kumulus-Oocyten-Komplexe wurden in DMEM-Medium kultiviert, das mit EGF, eCG und hCG ergänzt war. Die IVF wurde für 19 h mit (2,5 mM) oder ohne Theophyllin unter Verwendung von gefroren-aufgetautem Sperma von 11 verschiedenen Bullen durchgeführt. Die endgültige Spermienkonzentration wurde auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Nach IVF wurden präsumptive Zygoten in vitro in SOFaa-Medium für 8 Tage bis zum Blastozystenstadium kultiviert. Die Teilungs- und Blastozystenraten wurden 3 bzw. 8 Tage nach der IVF bewertet. Die R-Software (R Development Core Team, 2016: R: A language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) wurde verwendet, um die Daten unter Verwendung von Chi-Quadrat-Test zu bewerten. Die Supplementierung von Theophyllin erhöhte sowohl die Teilungsraten als auch die Blastozystenraten für die Bullen A, D, F und J signifikant (Tabelle 1;  $P < 0,05$ ). Die Blastozystenraten unterschieden sich nicht für B, C, E, G, H, I und K mit oder ohne Theophyllin (Tabelle 1;  $P > 0,05$ ). Diese Ergebnisse zeigen, dass die In-vitro-Blastozystenproduktion für leistungsschwache Bullen durch Theophyllin-Supplementierung während der IVF verbessert werden kann. Der zugrundeliegende Mechanismus beinhaltet möglicherweise erhöhte cAMP-Spiegel innerhalb der Spermien, um die Oozyten-Spermien-Wechselwirkung zu verbessern.

Tabelle 1: Entwicklungsraten mit und ohne Theophyllin während der IVF

Bulle	Gesamt- KOK		Teilungsraten % (n)		Blastozystenraten % (n)	
	mit Theophyllin	ohne Theophyllin	mit Theophyllin	ohne Theophyllin	mit Theophyllin	ohne Theophyllin
A	295	304	66.3 (198) <sup>a</sup>	40.3 (124) <sup>b</sup>	34.5 (101) <sup>a</sup>	10.3 (29) <sup>b</sup>
B	219	176	71.3 (162)	77.6 (138)	31.9 (72)	35.1 (63)
C	80	79	70.0 (56)	68.7 (54)	17.5 (14)	14.1 (11)
D	81	78	49.4 (40) <sup>a</sup>	19.2 (15) <sup>b</sup>	18.6 (15) <sup>a</sup>	5.1 (4) <sup>b</sup>
E	79	79	63.6 (51) <sup>a</sup>	22.9 (18) <sup>b</sup>	19.0 (15)	8.9 (7)
F	144	141	78.3 (113) <sup>a</sup>	61.8 (87) <sup>b</sup>	44.0 (62) <sup>a</sup>	24.4 (37) <sup>b</sup>
G	119	119	74.7 (89)	71.4 (85)	36.5 (43)	40.4 (48)
H	147	124	78.1 (116)	69.0 (86)	32.8 (47)	37.2 (46)
I	165	164	72.2 (119)	65.1 (107)	31.4 (52)	40.0 (63)
J	157	147	71.5 (113) <sup>a</sup>	40.1 (63) <sup>b</sup>	28.8 (46) <sup>a</sup>	16.8 (25) <sup>b</sup>
K	80	80	71.6 (57)	68.8 (55)	28.1 (22)	32.5 (26)

Prozentsätze sind der Mittelwert. Unterschiedliche hochgestellte Buchstaben in derselben Zeile für den jeweiligen Parameter zeigen statistische Signifikanz für den untersuchten Bullen;  $P < 0,05$ .

Die Autoren danken Frau Susanne Meese und Dr. Ulrich Witschi von Swissgenetics für die Kooperation und Spende von gefrorenem Bullensperma.

## Effects of melatonin on bovine embryonic developmental competence and kinetics in vitro

J.C. Gutiérrez-Añez<sup>1</sup>, P. Aldag<sup>2</sup>, A. Lucas-Hahn<sup>2</sup>, H. Niemann<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical Surgical Department, College of Veterinary Medicine, University of Zulia, Venezuela

<sup>2</sup>Institute of Farm Animal Genetics, (FLI), Mariensee, Germany

Preimplantation embryo development, including cleavage, compaction, cavitation (blastocoel formation) and hatching from the zona pellucida, is sensitive to the in vitro conditions (Vajta et al. 1999). The formation of the blastocyst is a reliable criterion for the assessment of embryo quality prior to transfer. Oxidative stress has been identified as a major factor affecting embryo development in vitro. Melatonin is a well-known potent free radical scavenger and broad-spectrum antioxidant and could thus protect early embryos from oxidative damage. The goal of the current study was to evaluate the effects of melatonin on developmental competence and kinetics of bovine embryos derived from in vitro fertilization (IVF). IVF was performed under defined conditions according to standard procedures used in Mariensee IVF lab. Oocytes were collected by slicing of ovaries obtained from a local slaughterhouse and were cultured in the presence of melatonin (MT) in different concentrations (MT-10-9 and MT-10-11) during the three in vitro steps IVM, IVF, and IVC. Melatonin was dissolved in ethanol, and an ethanol (ETH) and a standard control group (without any supplements) were included in the experimental setting for a total of four experimental groups (Control, ETH, MT-10-9, and MT-10-11). Variables evaluated included cleavage rate (CR) 72 hours post-insemination (72 hpi), blastocyst rate (BR) (186 hpi), and hatching rates (HR) (210 hpi). Additionally, the embryonic developmental kinetics were analyzed. Data were statistically analysed using the SAS/STAT<sup>®</sup> software (SAS, version 9.3) with the logistic procedure (PROC LOGISTIC). Significant differences were defined as  $P < 0.05$ . A statistical tendency was considered at  $P = 0.08$ . There were no differences ( $P > 0.05$ ) for CR in the control group when compared with the two melatonin concentrations. Ethanol supplementation reduced significantly ( $P < 0.05$ ) CR in comparison with all other groups. The addition of melatonin at the 10-9 concentration revealed a statistical tendency ( $P = 0.08$ ) towards improved BR compared with the control group. Furthermore, the groups supplemented with ethanol and melatonin showed higher ( $P = 0.002$ ) hatching rates than the control group. The hatching rates at 210 hpi (Day 9) for control, ethanol, MT-10-9 and M-10-11 were 20.4 % (11/54), 52.1% (37/71), 52.0% (40/77) and 50.0% (37/74), respectively. No differences ( $P > 0.05$ ) were observed for HR in the ethanol and different melatonin concentrations. Supplementation with ethanol and/or melatonin accelerated embryo development kinetics. The percentage of blastocysts reaching the hatching stage at 186 hpi (Day 8) was lower ( $P < 0.05$ ) in the control Group (14.8%: 8/54), compared with ETH, MT-10-9 and MT-10-11 [36.6% (26/71); 32.0% (24/75) and 33.8% (25/74)], respectively. Likewise, the proportion of blastocysts which reached the advanced blastocyst stage (expanded and hatching) at 186 hpi (Day 8) was higher in MT-10-11 compared with the control group (68.98% vs 51.85%, respectively). In conclusion, the presence of melatonin and ethanol (0.01% v/v) during early embryo development in vitro affects the kinetics of embryo development and increased hatching of bovine oocytes fertilized in vitro.

## **Einfluss der Zygotenherkunft und der Kulturbedingungen auf die Morphokinetik von individuell kultivierten Rinderembryonen**

**M. Hölker<sup>1,2</sup>, S. Aouliyaou<sup>1,2</sup>, F. Rings<sup>1,2</sup>, E. Held-Hölker<sup>1,2</sup>, D. Tesfaye<sup>2</sup>, S. Etay<sup>2</sup>, K. Schellander<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Lehr- und Forschungsgut Frankenforst Landwirtschaftliche Fakultät, Universität Bonn, Königswinter*

<sup>2</sup>*Institut für Tierwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung, Universität Bonn, Bonn*

Obwohl die In Vitro Produktion (IVP) von Rinderembryonen eine etablierte Technik darstellt, bestehen immer noch qualitative Unterschiede zwischen In-vivo und In-vitro entwickelten Rinderembryonen. Leider mangelt es jedoch an geeigneten Kriterien die Qualität der Embryonen ohne Transfer auf Empfängertiere zu bestimmen. Darüber hinaus ist die Verbesserung und Validierung geeigneter Kulturbedingungen aufwendig und aufgrund der Notwendigkeit, zur Bestimmung dieser Eignung sehr viele Embryonen auf Empfängertiere zu übertragen, kostspielig. Eine Alternative Methode zur Qualitätsbestimmung von Rinderembryonen könnte die nichtinvasive Bestimmung der Morphokinetik mittels geeigneter TimeLaps-Systeme darstellen. Ziel der vorliegenden Studie war deshalb die Analyse der Morphokinetik von Rinderembryonen im Zygotenstadium aus unterschiedlichen Herkünften (In-vivo vs. In-vitro) sowie während der In vitro Kultur in unterschiedlichen Kultursystemen (SOF-Serum vs. SOF-BSA). Hierzu wurden einerseits Ex-vivo-Zygoten mittels minimalinvasiver endoskopischer Eileiterspülung gewonnen und andererseits Zygoten durch In-vitro Maturation und In-vitro Fertilisation unter Nutzung von Schlachthofovarien generiert. Alle Zygotengruppen wurden in der Folge in SOFaa-Medium (supplementiert mit 0,3% BSA-FAF oder 10% Serum) individuell für 200h im TimeLaps-System (Miri TL) in 20µl Tropfen unter Öl weiterkultiviert (38,8°C, 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Hierbei zeigten Ex-vivo-Zygoten eine deutlich höhere Entwicklungsrate zur Blastozyste verglichen mit Embryonen aus der In-vitro Maturation und In-vitro Fertilisation die entweder SOF-BSA oder SOF-Serum kultiviert worden waren (62,5% vs. 25,0% vs. 17,0%). Da bei Ex-Vivo-Zygoten der Zeitpunkt des Fertilisationsbeginns schwierig zu bestimmen ist, wurden sämtliche morphokinetischen Daten für die Folgeanalysen in Relation zur 1. Zellteilung zum 2-Zeller gesetzt (Zeitpunkt der 1. Teilung = 0h). Hierbei zeigte sich, dass bei Ex-vivo Embryonen die 2. Zellteilung zum 4-Zellstadium signifikant ( $p < 0,05$ ) früher nach der 1. Zellteilung eintrat als bei den IVP-Embryonen (SOF-BSA & SOF-Serum; 11,3h vs. 13,4h vs. 14,8h). Gleiches galt für die 3. Zellteilung zum 8-Zellstadium (26,5h vs. 33,3h vs. 35,3h). Im Gegensatz dazu erreichten die IVP Embryonen (SOF-BSA & SOF-Serum) signifikant ( $p < 0,05$ ) früher das Blastozystenstadium als die Ex-vivo Zygoten (137,6h vs. 139,6h vs. 150,9h).

Für die tiefergehende Analyse wurden danach die Embryonen welche sich zur Blastozyste entwickelt hatten (Ex-Vivo-High & SOF-BSA-High) retrospektiv mit den Embryonen verglichen, die Ihre Entwicklung im 8-Zellstadium eingestellt hatten (Ex-Vivo-Low und SOF-BSA-Low). Hierbei zeigte sich, dass sowohl die kompetenten Ex-Vivo-Embryonen (9,7h vs. 14,4h) wie auch die kompetenten SOF-BSA-Embryonen (11,0h vs. 14,2h), die 2. Zellteilung signifikant schneller abgeschlossen hatten als die deren Entwicklung im 8-Zellstadium geendet hatte. Während die Herkunft der Zygoten keinen Einfluss auf die Zeitdauer bis zur 2. Teilung innerhalb der kompetenten Embryonen (EX-Vivo-High vs. SOF-BSA-High) aufwies, erreichten die kompetenten Ex-Vivo-Zygoten jedoch das 8-Zellstadium signifikant ( $p < 0,05$ ) schneller als die kompetenten SOF-BSA-Embryonen (23,5h vs. 31,6h).

Zusammen fassend bestätigen diese Ergebnisse einerseits frühere Berichte nach denen IVP-Embryonen im Vergleich zu Ex-vivo-Embryonen länger für die ersten Teilungen benötigen und im Gegensatz das Blastozystenstadium schneller erreichen. Darüber hinaus zeigen diese Ergebnisse aber auch, dass kompetente Zygoten, unabhängig von ihrer Herkunft, die ersten 3 Zellteilungen schneller durchlaufen als weniger kompetente Embryonen.

# Workshop

## Einflussfaktoren auf den Befruchtungserfolg

# Notizen