

# **37. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d)**



**am 8./9. Juli 2010  
am Institut für Tierwissenschaften der  
Universität Bonn**

**Organisation und Leitung:  
Michael Hölker & Uwe Küchenmeister**

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

**Goldsponsor**



**Silbersponsor**



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

## **Bronzesponsoren**

**Wörrlein  
Medizintechnik**



**Bodenco B.V.**



**minitube**



## **Weitere Sponsoren**



**Pharmanovo**

## Sponsorenadressen

### **Bodenco B.V.**

Otterkoog 9A  
1822 BW Alkmaar, Holland

### **Labotect Labor Technik Göttingen GmbH**

Willi-Eichler-Str. 25  
37079 Göttingen

### **Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH**

Bingerstr.173  
55216 Ingelheim

### **Minitüb GmbH**

Hauptstr.41  
84184 Tiefenbach

### **Ceva Tiergesundheit GmbH**

Kanzlerstr. 4  
40472 Düsseldorf

### **Pfizer GmbH**

Pfizerstr.1  
76139 Karlsruhe

### **Consarctic GmbH**

Postfach 1138  
63821 Schöllkrippen

### **Pharmanovo GmbH**

Sudetenstr.19  
30559 Hannover

### **GEA Farm Technologies GmbH**

Postfach 1348  
Bönen

### **Virbac Tierarzneimittel GmbH**

Rögen 20  
23843 Bad Oldeslohe

### **IMV Technologies**

Rue Clemenceau  
Postfach 61300 L'aigle, France

### **Veyx Pharma GmbH**

Söreweg 6  
34639 Scharzenborn

### **Intervet Deutschland GmbH**

Feldstraße 1a  
85716 Unterschleißheim

### **Walter Wörrlein Medizintechnik**

Breitstr.8  
91522 Ansbach

# **Programm**

---

13:00     **Begrüßung**  
M. Hölker und K. Schellander  
*ITW Bonn*

Sektion I:   Moderation F. Becker und J. Detterer

13:15     **GENERIERUNG TRANSGENER KANINCHEN UND  
RINDER FÜR DIE PRODUKTION REKOMBINANTER  
ANTI-KÖRPERFRAGMENTE ZUR TUMORTHERAPIE**  
Prof. Gottfried Brem  
*VetmedUni Wien*

14:00     **Epigenetische Analyse geprägter Gene in bovinen Eizellen  
unterschiedlichen Ursprungs**  
J. Heinzmann  
*FLI Mariensee*

14:15     **Untersuchungen epigenetischer Modulation unterschiedlicher  
Gene in präpuberalen und adulten bovinen Oozyten**  
Mike Diederich  
*FLI Mariensee*

14:30     **Bovine pre-transfer endometrium and embryo transcriptome  
fingerprints as predictors of pregnancy success after embryo  
transfer**  
Dessie Salilew Wondim  
*ITW Bonn*

14:45     **Influence of Reproductive Tract Environment in Unstimulated  
vs. Superovulated Heifers on Development and Global  
Transcriptome Profile of Bovine Blastocysts**  
Ahmet Yehia Gad  
*ITW Bonn*

15:00     **Kaffepause/ Industrieausstellung**

---

Sektion II: Moderation W. Holtz und R. Pokorny

- 16:00      **USE OF BOVINE EMBRYO TRANSFER TECHNOLOGIES:  
OPU/IVP, EMBRYO TRANSFER AND EMBRYO  
GENOTYPING**  
Hiemke Knijm  
*CRV, Niederlande*
- 16:45      **Saisonale Abhängigkeit der Qualität von Stutenoozyten und  
deren meiotische Kompetenz in vitro**  
Vernunft  
*FBN Dummerstorf*
- 17:00      **Einfluss eines kommerziell erhältlichen Kulturmediums (evolve  
®) auf die Entwicklung und Qualität präimplantatorischer  
boviner Embryonen**  
Friederike Poppich  
*TiHo Hannover*
- 17:15      **Einfluss unterschiedlicher Progesteronkonzentrationen auf die  
präimplantatorische Embryonalentwicklung des Rindes in vitro  
-Erste Ergebnisse-**  
Katharina Knauer  
*TiHo Hannover*
- 17:30      **Einfluss des Embryotransfer Zeitpunktes und des  
Embryontypes auf die präimplantative Entwicklung beim  
Rind**  
Eva Held  
*ITW Bonn*
- 17:45      **Vortrag unseres Goldsponsors Pfizer  
Fruchtbarkeit nach terminorientierter künstlicher Besamung  
oder nach Brunsterkennung bei Anwendung von CIDR-  
Synchronisationsprotokollen bei französischen Milch- und  
Fleischrindern**  
Claire PONSART  
*UNCEIA R&D*
- 18:00      Abendveranstaltung
-

Sektion III: Moderation C. Wrenzycki und H. Tenhumberg

8:45            **BOVINE EMBRYO TRANSFER: ARE EFFICIENCIES IMPROVING? and GENOMIC ANALYSIS OF BOVINE EMBRYOS USING SNPS**

John F. Hasler

*Bioiniche Animal Health, Washington, USA*

9:45            **Elternschaftskontrolle bei Burenziegen mit Hilfe von Mikrosatelliten**

M. Saleh

*Universität Göttingen*

10:00          **Kaffepause/ Industrieausstellung**

Sektion IV: Moderation D. Tesfaye und E. Hasenpusch

11:00          **Etablierung einer Methode zur intrafollikulären Injektion und Granulosazellgewinnung in vivo**

A. Hanstedt

*TiHo Hannover*

11:15          **Sind Rinder während 2- bzw. 3-Wellen-Zyklen unterschiedlich geeignet als Embryonenempfängerinnen?**

Schneebeli Jürg

*Summaprada, Schweiz*

11:30          **Auswirkungen von modifizierten Ovsynch-Programmen auf die Fertilität bei Holstein Friesian Kühen**

A. Forró

*TiHo Hannover*

11:45          **Transperitoneale Spermienmigration beim Schwein – Mythos oder Realität?**

Klaus-Peter Brüssow

*FBN Dummerstorf*

---

Sektion V: U. Besenfelder und H. Hauschulte

- 12:00 **Einfluss einer gestaffelten CLA-Supplementation auf die periphere IGF1-Konzentration bei Kühen während der Frühträchtigkeit**  
Hanna Stinshoff  
*TiHo Hannover*
- 12:15 **Bestimmung des Pregnancy-Associated Glycoproteins (PAG) bei der Ziege mittels Elisa mit zwei verschiedenen Antisera**  
M. Shahin  
*Universität Göttingen*
- 12:30 **IVP und Kryokonservierung von Embryonen bei der Maus zur Zucht definierter Linien**  
Wiesalw Kryzak,  
*LIMES-Institut Bonn*
- 13:00 **Welche Rolle spielt die *Zona pellucida* bei der Kryokonservierung von Mäuseembryonen mittels OPS Vitrifikation?**  
M. El-Gayar  
*Universität Göttingen*
- 13:15 **Schlusswort, Einladung nächstes AET-d Treffen**  
M. Hölker und U. Küchenmeister  
*Bonn, Bernau*
-

**Zusammenfassungen  
der Vorträge**

---

## **37. AET-d      Zusammenfassung der Vorträge Sektion I**

---

### **GENERIERUNG TRANSGENER KANINCHEN UND RINDER FÜR DIE PRODUKTION REKOMBINANTER ANTIKÖRPERFRAGMENTE ZUR TUMORTHERAPIE**

Prof. Gottfried Brem

Veterinärmedizinische Universität Wien

**(Eingeladener Redner ohne Abstract)**

## Epigenetische Analyse geprägter Gene in bovinen Eizellen unterschiedlichen Ursprungs

J. Heinzmann<sup>1</sup>, T. Hansmann<sup>2</sup>, C. Wrenzycki<sup>3</sup>, U. Zechner<sup>4</sup>, T. Haaf<sup>2</sup> und H. Niemann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Höltystrasse 10, 30535 Mariensee

<sup>2</sup>Institut für Humangenetik, Julius-Maximilians-Universität, Am Hubland, 97070 Würzburg

<sup>3</sup>Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

<sup>4</sup>Institut für Humangenetik, Johannes Gutenberg Universität, Langenbeckstrasse 1, 55131 Mainz

### 1. Einleitung

Die *in vitro* Reifung der Eizelle ist der erste wesentliche Schritt in den assistierten Reproduktionstechniken (ART). Die Qualität der Eizelle ist hierbei entscheidend für eine erfolgreiche Befruchtung und Embryonalentwicklung. Auch aufgrund der rechtlichen und ethischen Beschränkungen der Forschung an menschlichen Oozyten und Embryonen, werden die bovinen Oozyten und die Embryonalentwicklung zunehmend als Modell für ART im Menschen eingesetzt. In verschiedenen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass assistierte Reproduktionstechniken (inkl. des somatischen Klonens) ein erhöhtes Risiko fetaler und plazentarer Fehlentwicklungen mit sich bringen können (Knijn et al., 2003: Biol. Reprod. **69**, 1371-1378; Maher, 2005: Hum. Mol. Genet. **14**, 133-138). Das Expressionsprofil einer großen Anzahl von Genen ist in *in vitro* gereiften bzw. produzierten Embryonen im Vergleich zu *in vivo* Oozyten und Embryonen teilweise erheblich verändert (Wrenzycki et al., 2005: Reprod. Fertil. Dev. **17**, 23-35; Kues et al., 2008; PNAS **105**, 19768-19773). Epigenetische Veränderungen der DNA, wie abweichende Methylierung entwicklungspezifischer DNA Sequenzen einschließlich geprägter Gene werden als ein zu Grunde liegender Mechanismus für das Auftreten von Abnormalitäten nach ART vermutet (Farin et al., 2006: Theriogenology **65**, 178-191).

Ziel dieses Kooperationsprojektes ist es, die Effekte spezifischer *in vitro* Reifungsbedingungen auf das Methylierungsprofil ausgewählter entwicklungsrelevanter Gene boviner Oozyten und früher Embryonen zu untersuchen und mögliche Zusammenhänge zwischen DNA Methylierung und mRNA Expression zu untersuchen.

### 2. Material und Methoden

#### In vitro Reifung boviner Oozyten

Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden in zwei unterschiedlichen Medien, das häufig verwendete TCM 199 (Tissue Culture Medium) + 0.1 % BSA faf bei 39 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, oder

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion I

---

SOF (Synthetic Oviduct Fluid) + 0.4 % BSA faf, 10 mM Glukose + 1 mM Glutamin bei 39 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 5 % O<sub>2</sub>, jeweils supplementiert mit 10 IU PMSG and 5 IU hCG (Suigonan®, Intervet) 24 h gereift.

### qPCR

Poly(A)<sup>+</sup> RNA von einzelnen Oozyten wurde präpariert und nach Reverser Transkription für die qPCR eingesetzt. Standardkurven gepoolter Blastozysten cDNA wurden verwendet, um die relative Menge der untersuchten Gene normalisiert auf das Signal der zugesetzten Globin mRNA zu erhalten. Die anschließende Quantifizierung wurde mittels Sequence Detection Software 1.3.1 durchgeführt.

### Methylierungsanalyse

Bisulfit-behandelte DNA aus 10 bovinen Eizellen wird mittels einer Kombination aus “Limiting Dilution” und Multiplex-PCR amplifiziert und anschließend durch Sequenzierung analysiert. Für *OCT4* findet eine Analyse mittels Pyrosequenzierung statt, während die geprägten (imprinted) Gene an einem Kapillarsequenzierer (ABI) direktsequenziert werden.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Mit dem Standard-IVM System (TCM) und dem auf SOF-basierenden System wurden vergleichbare Reifungs- und Blastozystenraten erreicht.

Die Ergebnisse der qPCR zeigen die Expression wichtiger entwicklungsrelevanter geprägter und nicht-geprägter Gene. Bei einigen Genen (*PEG3*, *GDF9*, *PRDX1*, *DNMT1a*, *DNMT1b*, *DNMT3a*, *DNMT3b*) wird deutlich, dass die relative Expression der Gene in in SOF-Medium gereiften Eizellen dem “physiologischen Standard” der *in vivo* gereiften Eizellen sehr nahe kommt und dieses Reifungssystem möglicherweise eine Verbesserung darstellt.

Mit der etablierten Kombination aus Limiting Dilution und Multiplex PCR konnten 2-6 Allele für die untersuchten geprägten Gene sowie 6-10 Allele für *OCT4* (Kontrollgen) gewonnen werden. Bis jetzt konnten allerdings zwischen den untersuchten Pools (ungereifte und *in vitro* gereifte Eizellen) keine signifikanten Unterschiede der Methylierungsmuster festgestellt werden.

Für eine tiefer gehende Analyse und die Verifizierung der bereits beobachteten Effekte der verschiedenen Reifungsbedingungen auf die Eizellen sind jedoch weitere Analysen und größere Gruppen notwendig.

Finanziert im Rahmen der DFG Forschergruppe, FOR1041 „Germ Cell Potential“.

# 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion I

---

## Untersuchungen epigenetischer Modulation unterschiedlicher Gene in präpuberalen und adulten bovinen Oozyten

Mike Diederich<sup>1</sup>, Julia Heinzmann<sup>1</sup>, Wilfried Kues<sup>1</sup>, Brigitte Barg-Kues<sup>1</sup>, Doris Herrmann<sup>1</sup>,  
Richard Reinhardt<sup>3</sup>, Thomas Haaf<sup>2</sup> und Heiner Niemann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Höltystrasse 10, 30535 Mariensee

<sup>2</sup>Institut für Humangenetik, Julius-Maximilians-Universität, Am Hubland, 97070 Würzburg

<sup>3</sup>Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Ihnestr. 63-73, 14195 Berlin

### Einleitung

Mit Eintritt der Geschlechtsreife kommt es im Ovar zur Weiterreifeung der vor der Geburt angelegten Primordialfollikel bis zur zum Ovulationsbereiten Follikel mit der befruchtungsfähigen Oozyte. Die Anzahl der vorhandenen Oozyten verringert sich ab diesem Entwicklungsstadium durch Ovulation oder Atresie. Eine Vielzahl von Untersuchungen an Oozyten präpuberaler Rinder belegt, dass diese sich hinsichtlich der Entwicklungsfähigkeit und somit in ihrem Reproduktionspotential deutlich von Oozyten adulter Tiere unterscheiden (STEVENS et al. 1999; ARMSTRONG 2001; KAUFFOLD et al. 2005). In verschiedenen Vorarbeiten konnte u. a. nachgewiesen werden, dass durch intraovarielle Injektion von Insulin-like-Growth Factor 1 (IGF-1) die Entwicklungsfähigkeit von Oozyten aus präpuberalen Rindern deutlich verbessert werden kann (OROPEZA et al. 2004).

Epigenetische Vorgänge wurden als mögliche Ursache für diese reduzierte Entwicklung in Betracht gezogen. Verschiedene Umweltsignale bewirken eine Modifikation im Chromatin, beeinflussen dadurch die Genexpression, verursachen aber keine Änderung der DNA-Sequenz. Genspezifische DNA-Methylierungen und Veränderungen an den Histonen sind prominente epigenetische Veränderungen.

Im Rahmen dieses Projekts sollen durch vergleichende Untersuchung von mRNA-Expression und DNA Methylierungsgrad von vier entwicklungsrelevanten Genen an Oozyten präpuberaler und adulter Rinder Erkenntnisse über eine Beteiligung epigenetischer Mechanismen an der Erlangung des vollen Entwicklungspotentials boviner Oozyten gewonnen werden.

### Material und Methoden

#### Oozytengewinnung

Bovine Oozyten werden mit Hilfe der Ultraschall geleiteten Follikelpunktion Ovum-Pick-up (OPU) von präpuberalen Kälbern (6-9 Monate) und adulten Tieren ( $\geq 2$ . Laktation) nach unterschiedlicher Vorbehandlung (Tabelle 1) gewonnen.

Tabelle 1: Behandlungsgruppen

Gruppe	Kontrolle	FSH	FSH+ IGF1	FSH +IGF Kon*
Kuh	+	+	-	-
Kalb	+	+	+	+

\*IGF Kon = 0.01 M Essigsäure

### Analysen

Für die Expressionsanalyse mittels qPCR wurden die folgenden Gene, die für verschiedene Aspekte der Entwicklung von Oozyten und die frühe Embryonalentwicklung wichtig sind, ausgewählt: GLUT1 – Glucosetransporter 1; GDF-9 – Growth differentiation factor-9; PRDX1 – Peroxidoredoxin 1; ZAR1 – Zygotic arrest 1 Gen.

Die Bestimmung des Methylierungsmusters erfolgt unter anderem durch die Analyse zweier Satellitensequenzen (Bovine testis satellite I (1.725 g/ml) DNA, segment 2 und Bos taurus  $\alpha$ -Satellite I DNA, clone pBtKB5) mittels der Repeatanalyse an einem Pool von 5 Oozyten je Behandlungsgruppe. Für diese Analyse werden die Oozyten Bisulfit-behandelt und nach Amplifikation ligiert, transformiert und die Klone anschließend sequenziert.

### Ergebnisse und Diskussion

Mit Hilfe von OPU konnten durchschnittlich 6-7 Oozyten von den verschiedenen Kälbergruppen bzw. 4-6 Oozyten je Kuh gewonnen werden.

Erste Ergebnisse der qPCR Analysen zeigen, dass für die Gene zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bestehen.

Die bisherigen Ergebnisse der Repeatanalyse zeigen für eine der beiden Satellitensequenzen zum Teil hohe bis sehr hohe Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen.

Das bessere Verständnis des Entwicklungspotentials präpuberaler Eizellen könnte eine Verbesserung der Verwendung dieser Tiere in der *In vitro* Produktion möglich machen, was das Generationsintervall verkürzen und eine Optimierung der Nutzung des weiblichen Keimzellpotentials erlauben würde. Somit könnten genetisch wertvolle Tiere, schon vor Erreichen der eigentlichen Zuchtreife, Nachkommen produzieren. Des Weiteren könnten die Ergebnisse als Modell für andere Tierarten dienen, deren genetische Erhaltung im Vordergrund steht.

Reference:

ARMSTRONG, D. T. (2001):  
Effects of maternal age on Oocyte development competence.  
*Theriogenology* 55, 1303-1322

KAUFFOLD, J., H. A. AMER, U. BERGFELD, W. WEBER und A. SOBIRAJ (2005):  
The in vitro development competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter.  
*J. Reprod. Dev.* 51, 323-352

STEEVENS, T. E., D. K. GARDNER, K. A. ZUELKE, T. S. SQUIRES und R. C. FRY (1999):  
In vitro development and nutrient uptake by embryos derived from oocytes of prepubertal and adult cows.  
*Mol. Reprod.* 54, 49-56

OROPEZA, A., C. WRENZYCKI, D. HERRMANN, K. G. HADELER und H. NIEMANN (2004):  
Improvement of the development capacity of oocytes from prepuberale cattle by intraovarian insulin-like growth factor-I application.  
*Biol. Reprod.* 70, 1634-1643

**Bovine pre-transfer endometrium and embryo transcriptome fingerprints as predictors of pregnancy success after embryo transfer**

Dessie Salilew-Wondim<sup>1</sup>, Michael Hölker<sup>1</sup>, Franca Rings<sup>1</sup>, Nasser Gahnem<sup>1</sup>, Mehmet Ulas-Cinar<sup>1</sup>, Jaana Peippo<sup>2</sup>, Ernst Tholen<sup>1</sup>, Christian Looft<sup>1</sup>, Karl Schellander<sup>1</sup>, Dawit Tesfaye<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institut für Tierzuchtwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung Universität Bonn, Bonn*

<sup>2</sup> *MTT Biotechnology and Food Research, Genetics Research, 31600 Jokioinen, Finland.*

Abweichende Genexpressionen sowohl des Embryos als auch des Endometriums sind ein Grund für verminderte Trächtigkeitsraten nach dem Embryotransfer beim Rind. Die Selektion der Embryonen einerseits und der Empfängertiere andererseits an Hand des Endometriums andererseits basierend auf den Genexpressionsmustern, stellt eine große Herausforderung dar. Um herauszufinden, ob Korrelationen zwischen der Genexpression des Endometriums vor dem Transfer und der des Embryos auf der einen Seite und einer erfolgreichen Trächtigkeit auf der anderen Seite, vorliegen, wurde eine globale Transkriptionsanalyse der Biopsien des Endometriums und des Embryos mittels des GeneChip® Bovine Genome Arrays und einem präimplantations spezifischen cDNA Arrays durchgeführt.

In diesem Versuch wurden 54 Simmeltaler Färsen synchronisiert und deren Endometrium an Tag 7 und 14 des Östrus biopsiert. Im folgenden Zyklus wurden in vivo Blastozysten an Tag 7 gespült und auf diese Empfängertiere übertragen, nachdem ca. 30 – 40% der Blastozysten als Biopsieprobe für die Transkriptomanalyse entnommen wurden.

Nach der Trächtigkeitsuntersuchung und am Ende des Gestationszyklus wurden die Tiere bezüglich des Trächtigkeitserfolgs in rezeptives und nicht-rezeptives Endometrium klassifiziert. Die Embryonen wurden ebenfalls basierend auf dem Trächtigkeitserfolg kategorisiert.

Die Biopsieproben der Endometrien gliederten sich nochmals innerhalb der Gruppen bezüglich des Zeitpunktes der Probennahme in Tag 7 und Tag 14 (CDd7 und CDd14 für die trächtigen Färsen und NPd7 und NPd14 für die nicht-trächtigen Färsen).

Der GeneChip® Bovine Genome Array diente dem Nachweis unterschiedlicher Genexpressionen zwischen und innerhalb der Gruppen.

Mittels eines präimplantations spezifischen cDNA Arrays (Blue Chip®) wurden Unterschiede in der Menge der Transkriptome der Embryonen in Abhängigkeit des Trächtigkeitserfolgs untersucht.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der Endometrien zeigen, dass insgesamt 1126 Gene unterschiedlich expremiert wurden, wobei 612 Gene in CDd7 und 517 in NPd7 hoch reguliert waren

Die Analyse der KEGG der Genontologie der biologischen Prozesse und molekularen Funktionen ergab funktionelle Änderungen zwischen dem rezeptiven und nicht- rezeptiven

Endometrium an Tag 7 des Östrus. Jedoch zeigten sich nur minimale Unterschiede in der Genexpression an Tag 14 zwischen den beiden Gruppen.

Im Folgenden wurden die Unterschiede im Transkriptom der rezeptiven und nicht-rezeptiven Endometrien an Tag 7 und 14 untersucht, wobei besonders die temporäre Transkriptomdynamik des rezeptiven Endometiums betrachtet wurde, um die Veränderungen im Endometrium, die zwischen Tag 7 und Tag 14 ablaufen, besser verstehen zu können. Hierfür wurden die Genexpressionsprofile von CDd7 und CDd14 gegenübergestellt. Insgesamt wurden 1867 Gene unterschiedlich expremiert

In ähnlicher Weise konnten Veränderungen im nicht- rezeptiven Endometrium zwischen Tag 7 und Tag 14 festgestellt werden. Insgesamt wurden 254 Gene unterschiedlich reguliert. Verglichen mit der Transkriptionsdynamik des rezeptiven Endometriums an Tag 7 und 14, war die Anzahl der expremierten Gene und funktionalen Kategorien im nicht- rezeptiven Endometrium um 1613 Gene geringer. Das lässt auf eine sehr hohe Plastizität des rezeptiven Endometrium zwischen Tag 7 und 14 des Östrus schließen.

Die Entwicklungskompetenz der Blastozysten ist in gleichem Maße entscheidend für den Trächtigkeitserfolg wie die Rezeptivität des Endometriums.

Neben der Analyse des Endometriums wurden ebenfalls die Unterschiede in der Transkriptommenge der Embryobiopsien gemessen, gegliedert in Embryonen, die eine Trächtigkeit induzierten und die, die nicht zu einer Trächtigkeit führten. Mittels der Microarray Analyse konnten 70 Gene detektiert werden, die in den beiden Gruppen unterschiedlich expremiert wurden. Im Vergleich zur Expressionsanalyse der Endometrien, waren die Unterschiede jedoch zwischen den Gruppen der Embryonen deutlich geringer. Daraus lässt sich allerdings nicht schließen, dass das Endometrium und die maternale Umgebung einen größeren Einfluss auf den Trächtigkeitserfolg haben, als der Embryo selbst. Die Unterschiede resultieren vermutlich aus den verschiedenen Microarray Plattformen.

In der vorliegenden Studie wird ein deutlicher Zusammenhang zwischen den Genexpressionprofilen des Endometriums und der Blastozysten zum Trächtigkeitserfolg gezeigt. Die Daten heben besonders das Potential der endometrialen und embryonalen Transkripte hervor, die als Prediktoren für eine erfolgreiche Trächtigkeit dienen und eine Vorstufe für die Entwicklung von Kandidatengenen sind, die eine Selektion von optimalen Empfängertieren und potenten Embryonen möglich machen. Es sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, um die exakte funktionale Wirkung der unterschiedlich expremierten Gene, die eine Trächtigkeit induzieren, zu verstehen. Zusätzliche Untersuchungen sind nötig, um zu verstehen, inwiefern sich die molekulare Signatur in aufeinanderfolgenden Zyklen gleicht.

Insgesamt bringen diese Daten beachtliche Informationen hervor um die Trächtigkeitserfolge beim Rind mittels Genexpressionsanalysen vorherzusagen.

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion I

---

### **Influence of Reproductive Tract Environment in Unstimulated vs. Superovulated Heifers on Development and Global Transcriptome Profile of Bovine Blastocysts**

A. Gad<sup>1</sup>, U. Besenfelder<sup>2</sup>, F. Rings<sup>1</sup>, N. Ghanem<sup>1</sup>, D. Salilew-Wondim<sup>1</sup>, D. Tesfaye<sup>1</sup>, P. Lonergan<sup>3</sup>, U. Cinar<sup>1</sup>, K. Schellander<sup>1</sup>, V. Havlicek<sup>2</sup> and M. Hölker<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institut für Tierzuchtwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung Universität Bonn, Bonn*

<sup>2</sup> *Reproduktionszentrum– Wieselburg, Reproduktionsmedizinische Universität Wien, Österreich*

<sup>3</sup> *School of Agriculture, Food Science and Veterinary Medicine, College of Life Sciences, University College Dublin, Dublin, Ireland.*

Die Superovulation wird seit einigen Jahren routinemäßig in der Embryotransfer Industrie eingesetzt um eine große Anzahl Embryonen wertvoller Tiere zu erhalten und diese auf Leihmütter zu übertragen.

Jedoch variieren sowohl die Anzahl der Embryonen als auch deren Qualität sehr stark, was möglicherweise aus dem Einfluss des Follikelwachstums auf die Eizelle und/oder der Umgebung des Eileiters und des Uterus auf den Embryo, resultiert. Sicher ist, dass Eizellen und Embryonen in superovulierten Tieren sich unter abnormalen endokrinen Konditionen entwickeln. Die transvaginale Endoskopie ermöglicht einen einzigartigen Zugang zum Eileiter und ermöglicht es die Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien zu spülen und zu übertragen. Dies bietet die Möglichkeit die frühe Kinetik der embryonalen Entwicklung, sowie die Einflüsse der hormonellen Stimulation auf den Embryo auf molekularem Level zu untersuchen. Es ist bekannt, dass die Superovulation einen negativen Einfluss auf die Maturation im Follikel und auf die endokrine Umgebung im Eileiter und Uterus hat.

In dieser Studie versuchten wir diese zwei Prozesse zu separieren und den Einfluss der abnormalen endokrinen Umgebung auf die Embryonalentwicklung bis Tag 7 und auf das Transkriptom der Blastozysten zu analysieren.

Insgesamt wurden 19 Färsen superovuliert und 3 Mal mit Tiefgefriersperma besamt. 9 der Tiere wurden an Tag 2 gespült und die Embryonen im 2- bis 4- Zellstadium ipsilateral auf 4 synchronisierte, unstimulierte Empfängertiere endoskopisch in den Eileiter übertragen. Die restlichen 10 Tiere wurden gemeinsam mit den 4 nichtstimulierten, synchronisierten Tieren an Tag sieben gespült und die Embryonen bezüglich der uterinen Umgebung in superovuliert und unstimuliert/synchronisiert eingeteilt. Das Transkriptomprofil der Blastozysten wurde mit dem Affimetrix GeneChip Bovine Genome Array analysiert.

Der Prozentsatz der Embryonen, die sich zur Morula und Blastozyste entwickelten war in den superovulierten Tieren signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als in den unstimulierten, synchronisierten Tieren. Allerdings war die Blastozystenrate in den synchronisierten Färsen signifikant höher als in den superovulierten. Auch die Geschwindigkeit der Entwicklung (definiert als

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion I

Blastozysten: Morula Verhältnis) war bei den synchronisierten Färsen signifikant höher. (s. Tabelle 1)

**Tabelle 1: Übersicht über die Spülergebnisse der superovulierten und unstimulierten Färsen**

	Gespülte Embryonen (n)	Findungsrate (%)	Transferierbare Embryonen n (%)	Anzahl Morulae n (%)	Anzahl Blastozysten n (%)	Blastozysten/Morulae Verhältnis
superovuliert (n=10)	145	0.78*	99 (68.3) <sup>a</sup>	67 (46.2) <sup>a</sup>	32 (22.1) <sup>a</sup>	0.48 <sup>a</sup>
unstimuliert (n=4)	146	0.89**	76 (52.1) <sup>b</sup>	27 (18.5) <sup>b</sup>	49 (33.6) <sup>b</sup>	1.81 <sup>b</sup>

\* Findungsrate = Anzahl gefundener Embryonen/ Anzahl Gelbkörper x 100

\*\* Findungsrate = Anzahl gefundene Embryonen/ Anzahl transferierte Embryonen x 100

<sup>a,b</sup> Spalten die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind signifikant verschieden voneinander (p < 0,05)

Die Analyse der Microarray ergab, dass 454 Gene zwischen den Blastozysten beider Gruppen unterschiedlich expremiert waren (p < 0.05, fold change ≥ 2 and FDR ≤ 0.3). Insgesamt wurden 429 Gene in den Blastozysten der superovulierten Tiere höher expremiert, aber lediglich 25 Gene in der Gruppe der synchronisierten Tiere.

Ein relativ großer Anteil der unterschiedliche regulierten Gene (40%) die in den Blasotzysten der superovulierten Tiere hoch reguliert waren gliederten sich in die Kategorien metabolischer Prozesse, wie Kohlenhydrat-, Lipid-, Nukleinsäure-, Aminosäure-, Vitamin- und Mineralmetabolismus. Des Weiteren waren in dieser Gruppe Gene hochreguliert, die in die Proteinsynthese, die RNA posttranskriptionale Modifikation, die Genexpression, die Zell-Zell-Signalisierung, die Energieproduktion und den molekularen Transport involviert sind.

Interessanterweise war der Pathway der oxidativen Phosphorilierung (ATP-Synthase) der dominante Pathway und alle 26 unterschiedlich regulierten Genen, die in diesen Pathway involviert sind, waren in den Blastozysten der Gruppe der superovulierten Tiere hochreguliert, im Gegensatz zu den Blastozysten der unstimulierten, synchronisierten Tiere.

In der vorliegenden Studie wurden die vorwiegenden Unterschiede der Entwicklung und Transkriptionsprofile von Embryonen, die unter verschiedenen Bedingungen in vivo, zum einen in superovulierten oder zu anderen ab dem 2- bis 4- Zellstadium in unstimulierte, synchronisierten Tieren bis Tag 7 kultiviert wurden, gezeigt. Es sind jedoch weitere funktionale Untersuchungen nötig um, die Interaktionen zwischen der Umgebung im Reproduktionstrakt und den Embryonen während der präimplantativen Phase unter verschiedenen metabolischen und oxidativen Konditionen genau zu determinieren.

## **37. AET-d      Zusammenfassung der Vorträge Sektion II**

---

### **USE OF BOVINE EMBRYO TRANSFER TECHNOLOGIES: OPU/IVP, EMBRYO TRANSFER AND EMBRYO GENOTYPING**

Hiemke Knijm

CRV, Research and Development, Arnhem, The Netherlands

**(Eingeladener Redner ohne Abstract)**

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion II

---

### Saisonale Abhängigkeit der Qualität von Stutenoozyten und deren meiotische Kompetenz *in vitro*

A. Vernunft, H. Alm, A. Tuchscherer, Y. Suliman und W. Kanitz

*Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf*

Trotz intensiver Forschung zur In-vitro-Fertilisation bei Pferden in der vergangenen Dekade ist eine effiziente und zuverlässige Embryonenerzeugung *in vitro* bei dieser Spezies noch nicht möglich. Die Grundlage der Embryonenerzeugung bildet die Verfügbarkeit einer ausreichend hohen Anzahl an Eizellen lebender Donoren von guter Qualität. Aufgrund der vorherrschenden Inhomogenität der Eizellqualität in tertiären Follikeln bei Pferden wurden Eizellgewinnungsprogramme mit dem Ziel entwickelt, eine möglichst homogene Eizellpopulation für die In-vitro-Embryonenproduktion zu erzeugen (Kanitz et al., 2000, J Reprod Fert Suppl). Zusätzlich zur Beurteilung der Chromatinkonfiguration der Eizellen konnten in den letzten Jahren zunehmend zytoplasmatische Eigenschaften charakterisiert werden (Vernunft et al., 2010, Pferdeheilkunde; Torner et al., 2007, Reprod Domest Anim). Neben einem Einfluss des Zyklusstandes des Donors auf die Eizellqualität (Rödiger, 2000, Diss TiHo) könnten bei der saisonal polyöstrischen Spezies Pferd auch jahreszeitliche Effekte im Zusammenhang mit der Zyklusaktivität eine Rolle spielen.

Ziel der Arbeit war es daher, saisonale Einflüsse auf ausgesuchte strukturelle und zytoplasmatische Qualitätsparameter sowie die meiotische Kompetenz von equinen Oozyten *in vitro* zu untersuchen. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Transitperiode zwischen der azyklischen Winterperiode und der ovulatorischen Zuchtsaison gerichtet.

Die Gewinnung von Kumulus-Oozyten-Komplexen (KOK) erfolgte in der Transitperiode von Februar bis März 2010 mit Hilfe einer wiederholten ultraschallgeleiteten transvaginalen Follikelaspilation im Abstand von drei Wochen an 14 Mecklenburger Warmblutstuten. Zum Zeitpunkt der Eizellgewinnung durften die Stuten noch keinen Gelbkörper aufweisen. Sofort nach der Gewinnung wurden die KOK unter einem Stereomikroskop aufgesucht und entsprechend ihrer Kumulismorphologie den Gruppen der kompakten KOK, expandierten KOK und KOK mit Corona radiata zugeordnet. Die Oozytengruppen wurden in Abhängigkeit vom Kumulus in 26µM Brillant-Cresyl-Blau-Färbelösung (BCB<sup>-</sup>) für 90 Minuten inkubiert und anschließend nach ihrer BCB-Reaktion einem Aktivitätsstatus der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) im Ooplasma zugeordnet. Wachsende Oozyten zeigen eine hohe G6PDH-Aktivität (farbloses Zytoplasma - BCB<sup>-</sup>), ausgewachsene Oozyten haben eine verringerte G6PDH-Aktivität (blaues Zytoplasma - BCB<sup>+</sup>). Getrennt nach Kumulismorphologie und G6PDH-Aktivität wurden die KOK in TCM 199 mit 10% östrischem Stutenserum und FSH maturiert. Anschließend wurden die Oozyten mechanisch denudiert und die Polkörperausschleusung beurteilt. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden mit den IVM-Ergebnissen der Zuchtsaison 2009 verglichen, in denen Oozyten im Östrus und im Diöstrus sowie in der herbstlichen Transitperiode gewonnen wurden.

Unter den in der Frühjahrestransitperiode gewonnen KOK wurden signifikant häufiger kompakte KOK gefunden. Der Anteil der Oozyten, die nach ihrer Gewinnung nur noch von den Zellen der Corona radiata umgeben waren, war dagegen im Vergleich zu den während der Zuchtsaison (Oozyten aus Östrus und Diöstrus addiert) gewonnenen KOK verringert. KOK, die während der Transitperiode im Frühjahr gewonnen wurden, wiesen einen signifikant höheren Anteil Oozyten mit einer niedrigen G6PDH-Aktivität (BCB<sup>+</sup>) im Ooplasma auf und

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion II

zeigten insgesamt eine signifikant höhere Polkörperrate nach der IVM (s. Tabelle).

### Einfluss des Gewinnungszeitraums auf die KOK-Morphologie und den Anteil reifungskompetenter Oozyten der Stute

Zeitraum der Gewinnung	KOK-Morphologie in %			Anteil Oozyten (%) mit	
	kompakt	expandiert	Corona rad.	BCB+ Färbung	Polkörper nach IVM
Transitperiode (Frühjahr)	50,6 ± 5,6 <sup>a</sup>	23,5 ± 4,7	25,9 ± 4,9 <sup>a</sup>	82,6 ± 4,6 <sup>a</sup>	73,2 ± 4,8 <sup>a</sup>
Zuchtsaison (Östrus + Diöstrus)	34,6 ± 3,9 <sup>b</sup>	27,5 ± 3,6	37,9 ± 3,9 <sup>b</sup>	66,7 ± 3,8 <sup>b</sup>	57,2 ± 5,4 <sup>b</sup>

LSM ± SE; in Spalten: a:b p<0,05; Shi-Quadrat-Test

Während der Frühjahrestransitperiode konnten bei den Oozyten Abhängigkeiten der Polkörperrate nach IVM von der Kumulismorphologie und der G6PDH-Aktivität festgestellt werden. Die mit 33% geringsten Polkörperraten wiesen Oozyten mit gleichzeitig kompaktem Kumulus und hoher G6PDH-Aktivität (BCB<sup>-</sup>) nach der IVM auf, während Oozyten mit expandiertem Kumulus und einer niedrigen G6PDH-Aktivität (BCB<sup>+</sup>) zu 100% einen Polkörper während der IVM ausgeschleusst hatten.

Insgesamt betrachtet besitzen Oozyten, die in der Transitperiode im Frühjahr gewonnen wurden, eine höhere meiotische Kompetenz *in vitro* als Oozyten, die in der Zuchtsaison gewonnen wurden. Ihre hohe meiotische Kompetenz steht im Zusammenhang mit dem häufigeren Vorkommen von Oozyten mit einer positiven BCB-Färbung (BCB<sup>+</sup> = niedrige G6PDH-Aktivität). Es wurde bereits beschrieben, dass equine Oozyten mit einer niedrigen G6PDH-Aktivität (BCB<sup>+</sup>) zum Zeitpunkt ihrer Gewinnung eine höhere Entwicklungskompetenz nach erfolgreicher IVM besitzen (Mohammadi-Sangcheshmeh et al., 2009, AET-d). Im Kontrast zu früheren Arbeiten von Hinrichs et al. (2005, Biol Reprod) lässt sich in der vorliegenden Untersuchung aufgrund des hohen Anteils an BCB<sup>+</sup>-Oozyten und ihrer hohen meiotischen Kompetenz eine besondere Eignung der Oozyten der Transitperiode für die In-vitro-Embryonenproduktion ableiten. Jedoch wiesen die Oozyten der Transitperiode auch gehäuft einen kompakten Kumulus auf. Equine Oozyten, die bei ihrer Gewinnung einen kompakten Kumulus besitzen, haben sich bei einer konventionellen IVF in vorherigen Studien gegenüber denen mit expandiertem Kumulus als nachteilig erwiesen (Alm et al., 2001, Theriogenology). Mit der Einführung der Intrazytoplasmatischen-Spermieninjektion bei der Befruchtung von equinen Oozyten *in vitro* und veränderten IVM-Bedingungen können jedoch bereits heute auch bei Oozyten mit einem kompakten Kumulus Blastozytenentwicklungsraten erreicht werden, die denen von Oozyten mit expandiertem Kumulus equivalent sind (Hinrichs et al., 2005, Biol Reprod).

Oozyten, die in der Frühjahrstransitperiode gewonnen wurden, dürften somit insgesamt besser für In-vitro-Reproduktionstechniken geeignet sein als Oozyten, die von zyklischen Stuten gewonnen wurden.

Endokrine Einflussfaktoren von dominanten Follikeln, die während der zyklischen Saison auf untergeordnete Follikel einwirken, könnten für die unterschiedliche Qualität der Eizellen in tertiären Follikeln zwischen anovulatorischen und ovulatorischen Perioden bei Stuten verantwortlich sein.

### **Einfluss eines kommerziell erhältlichen Kulturmediums (evolve®) auf die Entwicklung und Qualität präimplantatorischer boviner Embryonen**

Friederike Poppicht<sup>1</sup>, Christine Wrenzycki<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

<sup>2</sup> *Reproduktionsmedizinische Einheiten der Kliniken, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

Die In-vitro-Produktion (IVP) boviner Embryonen ist in den letzten Jahren zu einer bedeutenden Methode der assistierten Reproduktion geworden. Da die Zahl der Anfragen zur IVP stetig zunimmt, ist es von großer Bedeutung, die Qualität der Embryonen zu verbessern und die Anzahl transfertauglicher Embryonen zu steigern. Einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Embryonen haben bei der IVP vor allem die Medien, in denen die einzelnen Schritte durchgeführt werden. Das Kultivierungsmedium hat dabei den größten Einfluss auf die Qualität der sich entwickelnden Embryonen (LONERGAN et al. 2003). Eines der am häufigsten genutzten Medien für die In-vitro-Kultur boviner Embryonen ist das definierte Medium

SOFaa (synthetic oviduct fluid, amino acids; TERVIT et al. 1972). Es basiert auf der biochemischen Analyse der ovinen Eileiterflüssigkeit und ist standardmäßig mit Aminosäuren und BSA (bovines Serumalbumin) versetzt. Das zu testende Medium evolve® bovine culture Medium ist ein kommerziell erhältliches Produkt, das auf die Bestandteile von KSOMaa (potassium simplex optimized medium, amino acids) basiert, welches wiederum auf der Zusammensetzung der Eileiterflüssigkeit von Mäusen beruht und durch verschiedene Versuche und den Zusatz von Kalium optimiert wurde (LAWITTS und BIGGERS 1991).

In der vorliegenden Studie wurden vier IVP-Durchgänge mit insgesamt 389 Oozyten durchgeführt, um das kommerziell erhältliche evolve® bovine culture Medium mit dem standardmäßig verwendeten SOFaa-Medium zu vergleichen. Dabei wurden als Kriterien sowohl die Teilungs- und Entwicklungsraten als auch die Embryonenqualität, morphologisch bewertet nach den Standards des IETS-Manuels und durch Auszählung der Gesamtzellzahl, herangezogen.

Die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass keine signifikanten Unterschiede in den Kriterien Teilungs- und Entwicklungsrate zwischen den beiden Medien festgestellt werden konnten. Das evolve® bovine culture Medium führt tendenziell eher zu schlechteren Entwicklungsraten der Embryonen.

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion II

---

Tab. 1 Übersicht der Teilungs- und Entwicklungsraten

	<b>Anzahl Oozyten</b>	<b>Teilungsrate ± SD [%]</b>	<b>Entwicklungsrate Tag 7 ± SD [%]</b>	<b>Entwicklungsrate Tag 8 ± SD [%]</b>
evolve® bovine culture medium	140	58,4 ± 22,3	16,9 ± 6,3	17,0 ± 5,5
SOFaa Medium	249	50,4 ± 8,3	21,5 ± 6,5	22,7 ± 6,7

Die Ergebnisse aus der Bestimmung der Gesamtzellzahl durch Färbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342 sind in Tabelle 2 dargestellt. Zwischen den Zellzahlen der Embryonen, die in den unterschiedlichen Kulturmedien generiert wurden, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Allerdings zeigten Embryonen aus der Kultur mit evolve® bovine culture Medium eine tendenziell höhere Gesamtzellzahl als Embryonen, die in SOFaa-Medium generiert wurden.

Tab. 2 Übersicht der Gesamtzellzahlen

	<b>Anzahl Blastozysten</b>	<b>Gesamtzellzahl</b>
evolve® bovine culture medium	8	150,3 ± 42,7
SOFaa Medium	26	125,9 ± 28,4

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von evolve® bovine culture Medium keinen Vorteil gegenüber dem standardmäßig verwendeten SOFaa-Medium hat.

Wir danken Don Rieger von der Firma LifeGlobal® (Canada) für die Bereitstellung des evolve® bovine culture medium.

**Einfluss unterschiedlicher Progesteronkonzentrationen auf die präimplantatorische  
Embryonalentwicklung des Rindes in vitro  
-Erste Ergebnisse-**

Katharina Knauer<sup>1</sup>, Hanna Stinshoff<sup>1</sup>, Ana Hanstedt<sup>1</sup> und Christine Wrenzycki<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

<sup>2</sup> Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Die In-vitro-Produktion (IVP) boviner Embryonen ist mittlerweile fest in die züchterische Praxis integriert, dabei haben die In-vitro-Produktionssysteme enorme Fortschritte erfahren. Bei der Verwendung von Kumulus-Oozyten-Komplexen aus Schlachthofovarien werden Reifungsraten von 90%, Befruchtungsraten von 60-70% und Blastozystenraten von 30-40% erzielt. Dennoch kann, trotz einer steten Weiterentwicklung und Optimierung der Kultursysteme und Kulturbedingungen, die In-vitro-Produktion von Embryonen nicht an die Verhältnisse in vivo heranreichen. Dabei spielt das Kulturmedium in der IVP eine große Rolle, da es einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität des Embryos hat.

Interaktionen zwischen Corpus luteum, respektive dem von ihm sezernierten Progesteron, und dem Embryo sind entscheidend für eine erfolgreiche Etablierung und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit. Dabei beeinflusst Progesteron unter anderem die Sekretion von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren, Enzymen und Ionen im Eileiter.

Die Ergebnisse bezüglich eines direkten Progesteroneinflusses auf die frühe Embryonalentwicklung in vitro variieren und sind widersprüchlich, was sich nur teilweise durch die verwendeten Kultursysteme erklären lässt.

Zur Produktion von Embryonen in vitro werden Ovarien von Schlachttieren eingesetzt. Der Prozess der In-vitro-Produktion (IVP) erfolgt nach einem Standardprotokoll.

Ziel des Projektes ist es, den Einfluss des Hormons Progesteron auf die Embryonalentwicklung in vitro in einem kontrollierten System (SOF-Medium) in der In-vitro-Kultur zu untersuchen. Nach Standardprotokoll werden die vermeintlichen Zygoten in einem ölüberschichteten Medium kultiviert, um eine Evaporation zu verhindern. Für diese Arbeit wird anstatt dessen ein Kulturmedium ohne Übersichtung mit Silikonöl verwendet, um eine Diffusion des lipophilen Progesterons in die Ölphase zu verhindern. Das Kulturmedium wird dann an verschiedenen Tagen (Tag 4 bzw. Tag 5; IVF = Tag 0) mit Progesteron in unterschiedlichen Konzentrationen (sich orientierend an der physiologischen Konzentration von Progesteron im Eileiter, 4 ng/ml) supplementiert. Da das verwendete Progesteron für die Zugabe zum Medium in Ethanol gelöst wird, gibt es eine Kontrollgruppe mit Ethanolzusatz, außerdem eine Negativkontrolle ohne jeglichen Zusatz.

Die morphologische Beurteilung der Embryonen erfolgt an Tag 8. Weiterhin findet zur Qualitätsbeurteilung auf molekularer Ebene eine Analyse entwicklungsrelevanter Gentranskripte mittels RT-qPCR statt.

Die ersten Ergebnisse stellen sich wie folgt dar: In der Kontrollgruppe (n=304) ergab sich eine Teilungsrate von 48,0% (146) und eine Entwicklungsrate von 18,8% (57). In der Ethanolgruppe (n=157) lag die Teilungsrate bei 45,2% (71) und die Entwicklungsrate bei 19,8% (31). In der Progesterongruppe (n=348) waren 52,0% (181) geteilt und 24,7% (86) waren bis zur Blastozyste entwickelt.

Es lässt sich also feststellen, dass sowohl die Teilungs- als auch insbesondere die Entwicklungsraten der mit Progesteron-supplementierten vermeintlichen Zygoten tendenziell etwas höher liegen.

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion II

---

### Einfluss des Transferzeitpunktes und des Embryontyps auf die präimplantative Entwicklung beim Rind

E.Held<sup>1</sup>, U. Besenfeder<sup>2</sup>, V. Havlikec<sup>2</sup>, F.Rings<sup>1</sup>, K. Schellander<sup>1</sup>, M. Hölker<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institut für Tierzuchtwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung Universität Bonn, Bonn*

<sup>2</sup> *Reproduktionszentrum– Wieselburg, Reproduktionsmedizinische Universität Wien, Österreich*

Die aberrante Entwicklung von Rinderembryonen in der prä- und postimplantativen Phase, sowie hohe Abortraten und das Large Offspring Syndrom stellen ein großes Problem in der assistierten Reproduktion beim Rind dar. Bereits im Blastozystenstadium zeigen sich morphologische und molekulargenetische Unterschiede zwischen in vivo und in vitro Embryonen. Das large Offspring Syndrom tritt vermehrt bei Kerntransfer und IVP Kälbern auf und geht mit einer Fehlentwicklung der Plazenta einher, als mögliche Ursache wurde bereits ein Zusatz von Serum in die Kulturmedien diskutiert. In verschiedenen Studien beim Rind und Schaf wurden bereits phänotypische und molekulargenetische Unterschiede in elongierten Tag 16 Embryonen aufgedeckt. Es wurde festgestellt, dass sich die Elongationsraten, die Länge der Embryonen und die Morphologie der Trophectoderme der IVP Embryonen signifikant von den AI Embryonen unterscheiden (Bertolini et al 2002). Die Embryonen wurden in diesen Versuchen jedoch immer im Blastozystenstadium in den Uterus übertragen.

Im vorliegenden Versuch transferierten wir die IVP Embryonen im 4- und 16 Zellstadium und die Kerntransfer Embryonen im 4- Zellstadium endoskopisch in den Eileiter und kultivierten diese bis Tag 16 in vivo. Ziel dieses Versuches war es zu untersuchen, welchen Einfluss der Transferzeitpunkt und der Embryontyp auf die präimplantative Entwicklung von bovinen Embryonen haben.

Insgesamt wurden 5 Gruppen von elongierten Embryonen (Abb 1a) phänotypisch hinsichtlich ihrer Entwicklungsrate bezogen auf die Anzahl der transferierten Embryonen und ihrer Länge an Tag 16 untersucht.

In der ersten Gruppe wurden vier Tiere an Tag 7 nach der künstlichen Besamung gespült und die Blastozysten auf vier synchronisierte Empfängertiere übertragen (vivo). Beim endoskopischen Eileitertransfer wurden jeweils 16 bis 17 Embryonen der folgenden Gruppen auf je vier synchronisierte Empfängertiere übertragen. Gruppe 2 sind IVP Embryonen im 4-Zellstadium, die ipsilateral übertragen wurden (IVP 4-Zeller ipsi), Gruppe 3 IVP im 4-Zellestadium, contralateral (IVP 4- Zeller contra). Gruppe 4 IVP Embryonen im 16-Zellstadium ipsilateral (IVP16-Zeller ipsi). Die letzte Gruppe sind die Kerntransferembryonen, die ebenfalls im 4- Zellstadium ipsilateral übertragen wurden (NT 4 Zeller ipsi).

Die elongierten Embryonen wurden jeweils an Tag aus den Uteri der geschlachteten Empfängertiere gespült.

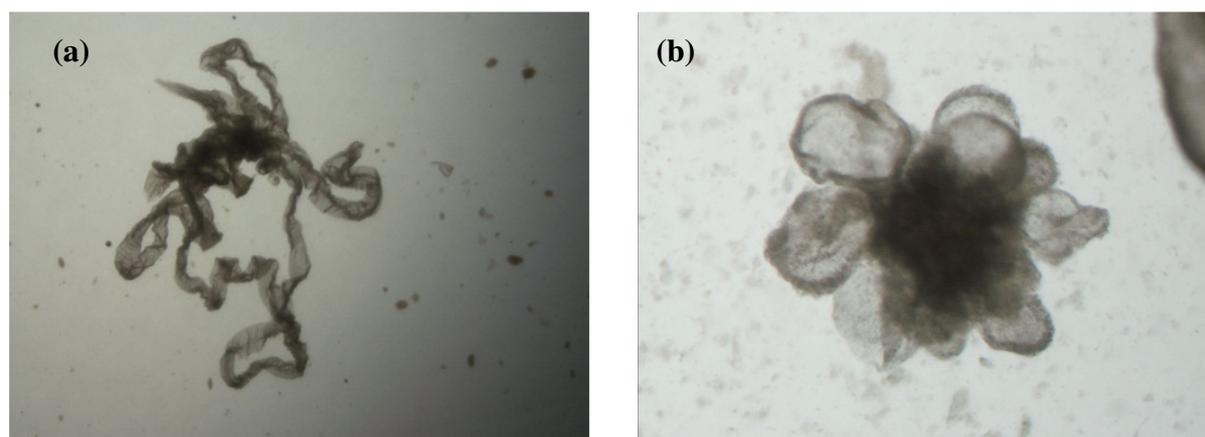
Die Ergebnisse zeigen, dass sich die vivo Embryonen mit einer Elongationsrate von 100% und einer durchschnittlichen Länge von 23 cm hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) von allen in vitro Gruppen unterscheiden. Zwischen den Gruppen der endoskopisch in den Eileiter transferierten Embryonen zeigen sich sowohl in der Elongationsrate, als auch in der Länge deutliche Unterschiede. Bei den übertragenen NT Embryonen fanden wir signifikant weniger elongierte Embryonen, als bei den IVP 4-Zeller ipsi und IVP16-Zeller ipsi (Tab. 1). Des Weiteren waren die IVP 4-Zeller ipsi signifikant länger als die IVP 4- Zeller contra und die IVP16-Zeller ipsi. Keine signifikanten Unterschiede bestanden jedoch zwischen der Gruppe

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion II

IVP 4-Zeller ipsi und der Gruppe NT 4-Zeller ipsi. Ein weiterer Unterschied war bei Betrachtung der morphologischen Formgebung der einzelnen Embryonen zu erkennen. Hinsichtlich der Morphologie des Trophectoderms traten häufig kugelähnliche Verformungen auf, zum Beispiel in der Gruppe der IVP 4-Zeller contra (Abb. 1b) Ähnliche abnormale Verformungen waren bei den NT Embryonen festzustellen. Dies deckt sich mit den deutlich schlechteren Entwicklungsraten von geklonten Embryonen (Campbell 2008). Betrachtet man einzelne elongierte Embryonen, wird deutlich, dass die IVP 4-Zeller ipsi eine Länge von bis zu 14 Zentimetern aufweisen, die somit der in vivo Gruppe am ähnlichsten sind. Der längste elongierte Embryo aus der IVP 16 Zell Gruppe wies hingegen nur eine Länge von 5 cm auf, was auf einen Einfluss der IVP Kulturbedingungen während der kritischen Phase des *Maternal- embryonic Transition* zurückzuführen sein könnte.

Die unterschiedliche Entwicklung der Trophectoderme könnte eine Ursache für die aberante Morphologie der Plazenta und der einzelnen Plazentome beim Large Offspring Syndrom sein. Um jedoch, genauere Aussagen über die Entwicklung und Elongation treffen zu können, sind molekulargenetische Analysen unabdingbar.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl der Transferzeitpunkt, der Embryontyp als auch die Transferlokalisierung (ipsi vs. contra) der Embryonen einen deutlichen Einfluss auf deren Entwicklung haben.



**Abb.1:** Mikroskopische Aufnahmen von elongierten Embryonen an Tag 16. (a) typischer elongierter Embryo direkt nach der Spülung. (b) Embryo mit verformtem Trophectoderm.

**Tabelle 1.:** Übersicht über die Länge der elongierten Embryonen und deren Entwicklungsraten.

	Transfer / Tiere (n/n)	Gefundene Embryonen / Tier	Elongations- rate (%)	Länge der Embryonen (cm)
Vivo	4 / 4		100	23,0 <sup>a</sup> ±9,09
IVP 4- Zeller ipsi	61/ 4	6,5 <sup>a</sup> ±3,00	42,6	5,28 <sup>b</sup> ±3,62
IVP 4- Zeller contra	61/ 4	8,5 <sup>ab</sup> ±5,32	66,6	2,27 <sup>c</sup> ±1,92
IVP 16-Zeller ipsi	61/ 4	6,75 <sup>a</sup> ±2,87	42,8	2,03 <sup>c</sup> ±1,41
NT 4- Zeller ipsi	66/ 4	2,75 <sup>b</sup> ±0,95	16,6	3,13 <sup>bc</sup> ±2,84

Spalten die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind signifikant verschieden voneinander (p <0,05 bzw. p < 0,01)

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion II

### Fruchtbarkeit nach terminorientierter künstlicher Besamung oder nach Brunsterkennung bei Anwendung von CIDR- Synchronisationsprotokollen bei französischen Milch- und Fleischrindern

Claire PONSART (1), Julie GATIEN (1), Patrice HUMBLLOT (1)

(1) UNCEIA R&D, 13 rue Jouët, 94704 Maisons Alfort cedex

Das CIDR Synchronisationsprotokoll wurde 2008 in Frankreich eingeführt und sieht eine 7 Tage vaginale Progesteronbehandlung (Dosis 1,38 g) mit anschließender künstlicher Besamung aufgrund von Brunstanzeichen. Das Ziel dieser Studie war es die Synchronisations-, Ovulations und Konzeptionsraten nach terminorientierter Besamung (Fixed Time Artificial Insemination: FTAI) oder Besamung nach Brunsterkennung (Heat Artificial Insemination: HAI) im Anschluss an ein CIDR-Synchronisationsprogramm bei Milch- und Fleischrindern unter Feldbedingungen zu untersuchen. Insgesamt wurden 548 Rinder (Färsen, Erstkalbskühe und Kühe der Rassen Holstein Frisian, Limousin und Charolais) von Oktober 2008 bis März 2009 synchronisiert und durch 4 Besamungstechniker von 4 französischen Besamungsstationen (Amélie, CECNA, COPELSON, Groupe Altitude) besamt. Die CIDR Spange wurde 7 Tage in der Vagina belassen, während am Tag vor der Entnahme eine Prostaglandinapplikation (PGF<sub>2a</sub>) und bei der Entnahme eine eCG-Injektion erfolgten. Kühe innerhalb einer jeweiligen Herde wurde zwei Besamungsgruppen zugeordnet. In der FTAI wurde die Besamung 56 h nach CIDR-Herausnahme realisiert, während die Rinder der anderen Gruppe 6 bis 18 h nach Brunsterkennung einmalig besamt wurden. Bei jedem Rind wurde die Zyklusaktivität durch 2 Progesteronmessungen im Abstand von 10 Tagen gemessen. Der Grad der Östrussynchronisation wurde durch eine Progesteronmessung 56 Stunden nach Entnahme der CIDR-Spange bestimmt. Die Ovulationsrate, ausgelöst durch die Anwendung der CIDR-Protokolle wurde ebenfalls durch eine Progesteronmessung, diesmal am 14. Tag nach Besamung ermittelt. Die Trächtigkeitsdiagnose erfolgte mittels Ultraschall am 35. Tag nach der künstlichen Besamung.

Die Synchronisationsrate (n=369, Rinder die vor dem Versuch regelmäßig im Zyklus waren) 95,6 % und 94,3 % in der HAI bzw. FTAI Gruppe. Die Ovulationsrate, kalkuliert aus 399 synchronisierten oder azyklischen Tieren betrug im Schnitt 93,4 % und 91,6 % in der HAI bzw. FTAI Gruppe. Die Konzeptionsrate nach Erstbesamung betrug im Schnitt 51,9 % (HAI : 52,6 % vs. FTAI : 47,4 %, p>0,05), und die Konzeptionsrate nach Brunstsynchronisation (berechnet nur aus ovulierenden Rindern) lag bei durchschnittlich 55 % (HAI : 55,3 % VS. FTAI : 52,2 %, p>0,05). Die Konzeptionsrate wurde massgeblich durch die Rasse und das Alter bestimmt, und erstreckte sich von 34 % bei erstlaktierenden HF-Kühen bis zu 58,7 % bei HF Färsen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Konzeptionsraten nach Rassen und Alter

Holstein Frisian		Charolais Kühe und Färsen heifers (n=72)	Limousin	
Kühe (n=103)	Färsen (n=92)		Kühe (n=95)	Färsen (n=55)
34 %	58.7 %	54.2 %	53.7 %	58.2 %

Somit kann die terminorientierte Besamung die Besamung nach Brunsterkennung sowohl in Milch- wie in Fleischrindern ersetzen und an bestehende CIDR Synchronisationsprotokolle angeknüpft werden.

## **37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion III**

---

**BOVINE EMBRYO TRANSFER: ARE EFFICIENCIES IMPROVING?**

*and*

**GENOMIC ANALYSIS OF BOVINE EMBRYOS USING SNPS**

**John F. Hasler**

Bioiniche Animal Health, Inc., Pullman, Washington, USA

**(Eingeladener Redner ohne Abstract)**

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion III

---

### Elternschaftskontrolle bei Burenziegen mit Hilfe von Mikrosatelliten

M Saleh<sup>a</sup>, R Charoensook<sup>b</sup>, W Holtz<sup>a</sup> and C Knorr<sup>b</sup>

Department für Nutztierwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen, <sup>a</sup>Abteilung Produktionssysteme landwirtschaftlicher Nutztiere. <sup>b</sup>Abteilung Reproduktion und Biotechnologie landwirtschaftlicher Nutztiere.

#### Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Effizienz der Elternschaftskontrolle bei Burenziegen mit Hilfe von caprinen und ovinen Mikrosatelliten zu beurteilen. Mit dem Set an Mikrosatelliten wurde zum einen die genetische Vielfalt innerhalb der Göttinger Burenziegenpopulation, zum anderen die Abstammung von 13 ET-Lämmern untersucht. Die statistische Auswertung des Ausschlusses bzw. der Bestätigung der korrekten Abstammung wurde mit Hilfe der Programme CERVUS und GenAIEX vorgenommen. Der Inzuchtkoeffizient wurde mit Hilfe des Programms F-STAT berechnet. An 112 mit 13 Mikrosatellitenloci analysierten Tieren wurden insgesamt 97 Allele ermittelt. Alle untersuchten Marker erwiesen sich als polymorph, wobei die Anzahl der Allele zwischen vier (CSR247) und 11 (MAF65) lag. Die mittlere Anzahl an Allelen betrug 7,46. Die erwartete Heterozygotität erstreckte sich von 0,42 (*BM1818*) bis 0,85 (*INRA5*) und betrug im Durchschnitt 0,63. Sie lag somit höher als die, die von in Südafrika gezüchteten Burenziegen bekannt ist. Der PIC (Polymorphism Information Content), der Ausdruck der Anzahl Allele sowie der Häufigkeit mit der sie in der Population auftreten, auf einer Skala von 0 bis 1 ist, reichte von 0,34 (*BM1818*) bis 0,82 (*INRA5*) mit einem Mittelwert von 0,59. Die Allelfrequenzen von vier Loci (*McM527*, *OarFCB20*, *BM1258* und *INRA0132*) wichen signifikant ( $p < 0,01$ ) vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab. Diese Abweichungen können sowohl auf Inzucht als auch auf Uneinheitlichkeit innerhalb der Population zurückzuführen sein. Bei drei dieser Marker (*McM527*, *BM1258* und *INRA0132*) gibt es Hinweise auf das Vorliegen von Nullallelen. Der Inzuchtkoeffizient war mit 0,18 sehr gering. Der geringe Inzuchtkoeffizient ist sowohl auf eine auf Vermeidung von Inzucht ausgerichtete Zuchtstrategie als auch dem Import von Tiefgefriersperma und -embryonen zurückzuführen. Die mit Hilfe der 13 Mikrosatelliten erzielbare Ausschlusswahrscheinlichkeit betrug 99,99% und wurde auch erreicht, nachdem die Mikrosatelliten *CSR247*, *McM527* und *BM1818* nicht berücksichtigt wurden. Es gelang, die vermeintliche Elternschaft von 2 der 13 ET-Lämmer aufgrund der Nichtübereinstimmung an mindestens vier Loci auszuschließen. Der Stammbaumfehler betrug somit 14,3%.

### Etablierung einer Methode zur intrafollikulären Injektion und Granulosazellengewinnung in vivo

Hanstedt A<sup>1</sup>, Onnen-Lübben E<sup>1</sup>, Stinshoff H<sup>1</sup> und Wrenzycki C<sup>1,2</sup>

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, <sup>1</sup>Klinik für Rinder

<sup>2</sup>Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken

Das Ovum pick-up (OPU) bietet beim Rind die Möglichkeit, individuelle, in vivo gewonnene Oozyten bzw. Kumulusoozytenkomplexe zu gewinnen. Das Equipment für die transvaginale ultraschallgeleitete Follikelpunktion lässt sich jedoch auch derart anpassen, dass es für weitere Anwendungen genutzt werden kann. Einerseits lässt sich Follikelflüssigkeit entnehmen, andererseits ist auch die Injektion von Substanzen in den Follikel (intrafollikuläre Injektion, IFI) möglich. Dies eröffnet die Chance, den Einfluss verschiedenster Stoffe auf den Follikel als Ganzen und im Einzelnen auf die sich darin befindlichen Zellen, wie Oozyte oder Granulosazellen, zu untersuchen.

In Vorversuchen wurden an Ovarien von Schlachttieren sowohl Kanülen verschiedener Längen (23 - 40 mm) und Durchmesser (0,3 – 0,45 mm) als auch der Injektionsweg getestet. Kanülen mit einer Länge von 23 mm und einem Durchmesser von 0,45 mm und eine Injektion durch das Stroma erwiesen sich dabei als jeweils die günstigste Lösung. Weiterhin fanden eine Minimierung des Totraums und eine Bestimmung der Verluste im Applikationssystem mit anschließender Korrektur des Injektionsvolumens von 300 µl auf 305 µl statt.

Daraufhin erfolgte die Anwendung der Methode in vivo an Follikeln einer Größe zwischen 0,8 und 1 cm, später an präovulatorischen Follikeln (> 1,2 cm). Der Ablauf der Prozedur war wie folgt: Der Follikel wurde in der Form vor dem OPU-Träger platziert, dass die Injektionsstrecke mindestens 0,3 cm durch das Ovarstroma betrug. Die Applikation der Lösung erfolgte langsam nach Aufforderung durch den Punkteur, um eine Ausdehnung des Follikels zu ermöglichen.

Für den Hauptversuch standen 12 Rinder zur Verfügung. Zunächst erfolgte nach der IFI in einem Durchgang die Flüssigkeitsgewinnung aus präovulatorischen Follikeln und die Isolierung von Granulosazellen aus den Punktaten. In vier weiteren Durchgängen wurde die Ovulation nach IFI überprüft und die Gelbkörperanbildung untersucht.

Die Applikation der Lösung scheiterte in einem von 54 Fällen daran, dass der Follikel während der Manipulation auslief. Die Größe der Follikel 36 Stunden nach der Injektion zeigte sich um durchschnittlich 2 mm (n = 11) verringert. Die Ovulation fand in allen Fällen statt (43/43), ebenso die Anbildung eines Gelbkörpers.

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass ein angepasstes OPU-Equipment genutzt werden kann, um eine intrafollikuläre Injektion sowie Follikelflüssigkeits- und Granulosazellengewinnung mit Erfolg durchzuführen.

### **Sind Rinder während 2- bzw. 3-Wellen-Zyklen unterschiedlich geeignet als Embryonenempfängerinnen?**

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

Im Falle zyklischer Ovaraktivität wird beim Milchvieh in der Regel entweder der zweite oder dritte post ovulationem heranwachsende dominante Follikel [DF] wieder zu einer Brunstblase. Gemäss früheren Erhebungen können diese beiden als 2- bzw. 3-Wellen-Zyklen [2-WZ; 3-WZ] bezeichneten Varianten nicht ohne weiteres als physiologisch gleichwertig eingestuft werden. So scheint in den im Mittel nur unwesentlich verlängerten 3-WZ die Anbildung eines zusätzlichen Follikels durch eine unvollständige funktionelle Kompetenz des ersten DF begünstigt zu werden. Um die Bedeutung der 2- und 3-WZ besser verstehen zu können, wurde in der hier vorgestellten Studie geprüft, inwiefern in den ersten Stadien der Frühgravidität ebenso unterschiedliche Muster des DF-Wachstums zu beobachten seien wie während zyklischer Lutealphasen.

Bei insgesamt 87 Braunvieh-Milchkühen und -Rindern wurde die Ovaritätigkeit während der ersten 4 DF-Wellen in der Frühgravidität kontinuierlich beobachtet (Ovarpalpationen im Intervall von 1-2 Tagen) und mit gleicherweise erhobenen Befunden aus 133 2-WZ und 76 3-WZ verglichen. Das DF-Wachstum wurde anhand der Parameter "Anbildung" (erste Erkennung eines DF) [A], "Verweildauer" (Dauer der palpatorischen Erkennbarkeit eines DF) [VD] und "Wellenintervall" (Zeit zwischen der Anbildung aufeinanderfolgender DF) [WI] beschrieben. Alle statistischen Angaben basieren auf Box Plot-Auswertungen oder auf der Berechnung von Spearman Korrelationen ( $p < 0.05$ ). Während der ersten DF-Welle post ovulationem lagen die Korrelationskoeffizienten [r] bei den graviden Tieren für A/VD ( $r = -0.360$ ) und für A/WI ( $r = -0.252$ ) zwischen den (differierenden) Werten der 2-WZ und 3-WZ und für VD/WI ( $r = 0.416$ ) im gleichen Bereich wie bei diesen. Im Verlauf der nachfolgenden 3 DF-Wellen liessen sich zwischen dem Beginn einer Welle und den übrigen Parametern keine Beziehungen mehr erkennen, aber die Korrelation VD/WI wurde stärker ausgeprägt. Während die DF in 2-WZ und zu Beginn einer Trächtigkeit in auffallend ähnlichem Rhythmus heranwachsen, waren in 3-WZ die zweite und die dritte Follikelwelle gegenüber jenen graviden Tiere signifikant vorverlagert, bei deutlich verkürzter Verweildauer der beiden anovulatorischen DF.

Obwohl die Variabilität der Einzelbefunde beachtlich ist, kann aufgrund der vorliegenden Beobachtungen angenommen werden, das DF-Wachstum entspreche zu Beginn einer Gravidität viel eher dem Muster der 2-WZ als jenem der 3-WZ. Während die Vergleiche mit 2-WZ insofern vorsichtig zu gewichten sind, als sie sich stets nur auf 1 anovulatorische und 1 ovulatorische Welle beziehen können, so sind insbesondere die von Welle zu Welle deutlicher werdenden Unterschiede zwischen 3-WZ und der Frühgravidität eindrucklich. Die Ergebnisse der Studie erhärten insgesamt die Vermutung, 3-WZ seien eine physiologisch nicht völlig gleichwertige Variante der "standardmässig" eher nur 2 Follikelwellen aufweisenden Ovarzyklen des Rindes. Zweifellos verdienen die Eigenarten der DF-Bildung in der frühen Luteinisierungsphase weiterhin besondere Aufmerksamkeit. Im Hinblick auf Optimierungsmöglichkeiten der Anwachsrate nach Embryonenübertragungen stellt sich zum Beispiel die Frage, inwiefern Rinder während eines 3-WZ gleicherweise als Empfängertiere geeignet sein können wie während eines 2-WZ. Allein der Nachweis eines (allfälligen) Unterschiedes wäre allerdings vorläufig praktisch kaum nutzbar, weil die Möglichkeiten noch weitgehend fehlen, zum Zeitpunkt eines anstehenden Transfers den weiteren Verlauf einer Lutealphase als potenziellen 2-WZ oder 3-WZ zu prognostizieren.

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion IV

---

### AUSWIRKUNGEN VON MODIFIZIERTEN OVSYNCH-PROGRAMMEN AUF DIE FERTILITÄT BEI HOLSTEIN FRIESIAN KÜHEN

A. Forró, G. Tsousis, N. Beindorff, H. H. D. Meyer, H. Bollwein

Aus der Klinik für Rinder der Stiftung der Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173, Deutschland, der Klinik für Nutztiere der Veterinärmedizinische Fakultät der Aristotle Universität Thessaloniki, St. Voutyra str. 11, 54627, Griechenland und dem Lehrstuhl Physiologie des Wissenschaftszentrums Weihenstephan der TU München, Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising-Weihenstephan, Deutschland

#### 1. EINLEITUNG

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen von Modifikationen des OvSynch-Programmes auf die Fruchtbarkeit von Holstein Friesian Kühen überprüft. Einerseits wurde dabei die Zeitspanne zwischen der Prostaglandin- und der zweiten GnRH-Applikation verlängert, andererseits wurde nach der Besamung (p.i.) Progesteron supplementiert.

#### 2. MATERIAL UND METHODEN

Es wurden 300 Holstein Friesian Kühe in einem Zeitraum von 55 bis 63 Tagen p.p. (post partum) entweder nach dem klassischen OvSynch- (GnRH D0- PGF<sub>2α</sub> D7- GnRH 48h später, n=195) oder einem modifizierten OvSynch-60-programm (GnRH D0- PGF<sub>2α</sub> D7- GnRH 60h später, n=105) behandelt. Nach terminierter künstlicher Besamung (TAI; TAI 14-20h nach der 2. GnRH- Applikation) wurde randomisiert bei der Hälfte der Tiere der OvSynch-Gruppe (n=98) PRID alpha 1,55g<sup>®</sup> (CEVA Tiergesundheit) am 4.Tag p.i. (mit TAI als Tag 0) eingeführt und für 14 Tage belassen. An Tag 5 p.i. wurde von der Hälfte der Tiere jedes Behandlungsschemas randomisiert eine Blutprobe zur Bestimmung von Progesteron (P4) genommen. Die Graviditätsrate (GR) wurde durch Untersuchung auf Trächtigkeit mittels transrektaler Sonographie am 33. Tag p.i. bestimmt.

Die Daten der Studie wurden mittels logistischer Regression der Backward Eliminationsmethode ausgewertet. Es wurde überprüft, ob die Art des OvSynch-Programmes, die Jahreszeit, die 100-Tage-Milchleistung, das Auftreten einer Retentio secundinarum (Ret. sec.), der Body Condition Score an Tag 60 (BCS60) und die Laktationsnummer die GR beeinflusst. Two-way Interaktionen zwischen den OvSynch-Programmen und anderen Faktoren wurden getestet.

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion IV

---

### 3. ERGEBNISSE

Zwischen den Tieren, die mit dem klassischen OvSynch- und dem modifizierten OvSynch-60-Programm behandelt wurden und den Tieren, bei denen kein P4 mittels PRID supplementiert wurde, waren keine Unterschiede ( $p > 0,05$ ) in den GR festzustellen (38,1 vs. 38,1%). Die Daten dieser beiden Tiergruppen wurden daher für die weiteren Analysen gepoolt. Vergleicht man die GR dieser Tiere mit derjenigen der Tiere, denen PRID verabreicht wurde, so war ein Anstieg in der Fertilität durch die P4-Applikation festzustellen (50,0 %,  $p=0,06$ ).

Die P4-Werte der Tiere lagen an Tag 5 p.i. bei  $3,77 \pm 2,29$  ng/ml. Die GR war bei den Tieren mit  $P4 > 2$  ng/ml höher als bei den Tieren mit  $P4 < 2$  ng/ml (50,5 vs 32,7%,  $p= 0,04$ ).

Tiere mit einem  $BCS60 \leq 2,75$  zeigten im Gegensatz zu Tieren mit einem  $BCS60 \geq 3,0$  eine herabgesetzte GR (31,3 vs 46,9 %,  $p= 0,002$ ). In der BCS60-Untergruppe ( $BCS \geq 3,0$ ) hatten Tiere mit PRID ( $n= 60$ ) eine signifikant höhere GR zu den Tieren ohne PRID ( $n= 134$ ) (58,3 vs 41,8%;  $p= 0,03$ ). Weiterhin zeigten Tiere mit Ret. sec. eine signifikant herabgesetzte Graviditätsrate im Vergleich zu Tieren ohne Ret. sec. (21,4 vs 42,7 %,  $p= 0,03$ ).

### 4. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Verlängerung des Intervalls zwischen der Prostaglandin- und der zweiten GnRH-Applikation von 48 auf 60 Stunden hatte keine Auswirkungen auf die Fertilität. Dagegen hat die Progesteronsupplementation p.i. nach Anwendung eines OvSynch Programmes einen positiven Effekt auf die Fruchtbarkeit. Der Einfluss der Nachgeburtshaltung und der Körperkondition auf die Trächtigkeitsraten unterstreicht aber auch die Bedeutung des peripartalen Managements auf die Fertilität der Holstein Friesian Kühe.

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion IV

### Transperitoneale Spermienmigration beim Schwein – Mythos oder Realität?

Klaus-Peter Brüssow und Helmut Torner

FB Fortpflanzungsbiologie, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Wilhelm-Stahl-Allee 2,  
18196 Dummerstorf

Die tiefintrauterine und "low dose" Insemination mit speziellen Kathetern gewährleistet die Spermideponierung nur in ein Uterushorn. Trotzdem erfolgt beidseitig eine Befruchtung der Oozyten im Eileiter. Dabei ist ungeklärt, auf welchem Wege die Spermien den gegenüberliegenden Eileiter erreichen. Es werden sowohl transuterine als auch transperitoneale Migrationswege diskutiert (Vazquez *et al.*, *Theriogenology* 2005). Ziel unseres Experimentes war es, diese Migrationswege genauer zu untersuchen.

Bei insgesamt 24 peripuberalen Jungsaunen der Deutschen Landrasse (Alter 185 Tage) wurden Follikelwachstum und Ovulation mit 1000 IE eCG (Pregmagon®, IDT Dessau-Roßlau) und nachfolgend mit 500 IE hCG (Ovogest®, Intervet, Unterschleißheim) 72h nach eCG stimuliert. Die Jungsaunen wurden 31-32 h *post* hCG endoskopisch (Brüssow *et al.* *JRD* 2006) mit 20 ml verdünntem Frischsperma ( $60 \times 10^6$  Spermien, 70 % Motilität) wie folgt besamt (Abb. 1):

Gruppe KONTROLLE: intrauterine Insemination (IUI) in das rechte Uterushorn (etwa 10-15 cm kaudal der utero-tubalen Verbindung); das linke Uterushorn diente als unbeeinflusste Kontrolle.

Gruppe LIGATUR (LIG): IUI in das rechte Uterushorn; das linke Uterushorn wurde endoskopisch mit einer Doppel-Ligatur 3-5 cm lateral der Bifurkation verschlossen.

Gruppe INTRAPERITONEAL (IPI): IUI in das rechte Uterushorn; das linke Uterushorn wurde endoskopisch mit einer Doppel-Ligatur verschlossen und das Sperma intraperitoneal auf die Oberfläche des linken Ovars verabreicht.

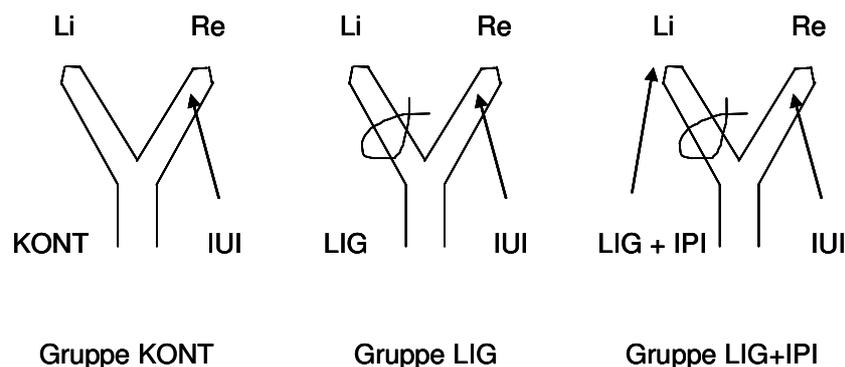


Abb. 1: Inseminationsschema für die Gruppen KONTROLLE, LIGATUR und INTRAPERITONEAL

Alle Jungsaunen wurden 65-66 h *post* hCG ovario-hysterektomiert. Nachfolgend wurden die Eileiter gespült und die aufgefundenen Eizellen nach Färbung (Hoechst 33258, Sigma) auf Befruchtung (Befruchtung = ein Pronukleus + ein dekondensierter Spermienkopf und alle Teilungsstadien bis  $\geq 4$  Zellen) und auf Teilung untersucht.

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion IV

Weiterhin wurden die akzessorischen Spermien/Oozyte gezählt und wie folgt graduiert; 0: ohne, 1: < 5, 2: 5-50, 3: 50-100 und 4: > 100 Spermien. Die Befruchtungs- und Teilungsergebnisse der Oozyten in Abhängigkeit von der Behandlung (Insemination und Ligatur) sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Grad der akzessorischen Spermien und Befruchtungsergebnisse (n = 23 Jungsaugen)

Gruppe	Uterushorn	Akz. Spermien (mittlerer Grad)	Anzahl Oozyten	befruchtet n (%)	geteilt %	≥ 4-Zeller %
KONTROLLE	rechts - IUI <sup>1)</sup>	2.75	49	39 (79.6)	47.0	16.6
	links - unbehandelt	1.57	55	35 (63.7)	40.0	7.3
LIGATUR	rechts - IUI	2.50 <sup>a</sup>	62	44 (71.0) <sup>a</sup>	56.6 <sup>a</sup>	8.1
	links - Ligatur	0.12 <sup>b</sup>	63	9 (14.3) <sup>b</sup>	1.6 <sup>b</sup>	1.6
IPI	rechts - IUI	3.17 <sup>c</sup>	41	31 (75.6) <sup>c</sup>	63.4 <sup>c</sup>	14.6
	links - Ligatur+IPI <sup>2)</sup>	0.29 <sup>d</sup>	50	7 (14.0) <sup>d</sup>	4.0 <sup>d</sup>	0

<sup>a,b, c,d</sup> p < 0.05; <sup>1)</sup> – Intra-Uterine Insemination, <sup>2)</sup> – Intra-Peritoneale Insemination

Die Ergebnisse zeigen, dass die *low dose* IUI in ein Uterushorn im ipsilateralen Eileiter eine hohe Spermienpräsenz (gemessen am Grad der akzessorischen Spermien) im Vergleich zur kontralateralen Kontroll-Seite gewährleistet. Ebenfalls war im gegenüberliegenden Eileiter die Entwicklung zum 4-Zellembryo verzögert. Eine Ligatur des kontralateralen Uterushornes sowie die intraperitoneale Spermienapplikation verringerten sowohl das Vorhandensein von Spermien als auch die Befruchtung. Eine geringfügige Anzahl befruchteter Eizellen wurde bei 3 von 15 Tieren der Gruppen LIGATUR und IPI gefunden. Dies könnte durch den bei diesen Tieren ermittelten unzureichend durchgeführten Verschluss des Uterushorns bedingt sein.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass für eine Befruchtung nach einer *low dose* IUI ein transuteriner jedoch kein transperitonealer Migrationweg der Spermien realistisch ist.

### **Einfluss einer gestaffelten CLA-Supplementation auf die periphere IGF1-Konzentration bei Kühen während der Frühträchtigkeit**

Hanna Stinshoff<sup>1</sup>, Eike Onnen-Lübben<sup>1</sup>, Ana Hanstedt<sup>1</sup>, Sandra Wilkening<sup>1</sup>,

Marion Piechotta<sup>1</sup>, Heinrich Bollwein<sup>1</sup>, Christine Wrenzycki<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule

<sup>2</sup>Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken, Stiftung Tierärztliche Hochschule

Der Wachstumsfaktor Insulin Growth Faktor I (IGF-I) wirkt unter anderem am Ovar und verstärkt dort die Effekte von FSH und LH beim Wachstum und der Reifung von Follikeln (Spicer et al., 1993; Lucy 2000). Zusätzlich wird ein hoher Plasma-IGF-I-Spiegel mit einer besseren Konzeptionsfähigkeit in Verbindung gebracht (Taylor et al., 2004). Der Plasma-IGF-I-Spiegel bei Erstkalbinnen ist kurz vor und nach der Geburt signifikant höher als bei Kühen (Taylor et al., 2004).

Die Möglichkeit den endogenen IGF-I-Spiegel durch die Fütterung zu beeinflussen, ist schon länger bekannt (Wathes et al., 1998). Durch ihre Fähigkeit, die negative Nettoenergiebilanz post partum durch die Depression des Milchfettgehaltes positiv zu beeinflussen, ist der Einsatz von konjugierten Linolsäuren (CLA) für die Praxis von großem Interesse.

In der vorliegenden Studien wurden Kühe (n=17) in 3 Gruppen eingeteilt. Die Tiere der ersten Gruppe (CLA 0; n=4) erhielten keinerlei CLA-Supplementation, die der zweiten Gruppe (CLA 50; n=6) erhielten 50g CLA-Gemisch und die der dritten Gruppe (CLA 100; n=7) 100g CLA.

Alle Tiere wurden an Tag 59 ± 3 p.p. synchronisiert (d 59 p.p. Einsetzen PRID®-Spirale; d 66 p.p. Entfernen der PRID®-Spirale und Gabe von 2 ml PGF2α; d 68 p.p. 2ml GnRH) und nach Abschluss des Synchronisationsprogrammes besamt (KB).

Am Tag der Besamung sowie an den Tagen 6, 13, 20 und 32 p.i. wurden Blutproben aus der A./V. sacralis mediana genommen. Bei den Tieren, bei denen an Tag 32 eine Trächtigkeit festgestellt werden konnte (CLA 0 n=3; CLA 50 n=3; CLA 100 n=4), wurde an Tag 45 p.i. eine weitere Blutprobe genommen.

Die Blutproben wurden anschließend mittels eines Radio-Immuno-Assays (RIA) auf ihren IGF-I Spiegel hin untersucht.

Die in Tabelle 1 abgebildeten Ergebnisse des RIAs zeigen, dass die Fütterung eines CLA-Gemisches den Plasma-IGF-I-Spiegel während des Zyklus resp. der Frühträchtigkeit erhöht. Hierbei erscheint eine Supplementation mit 100g CLA pro Tier und Tag eine deutlichere Auswirkung auf den Plasma-IGF-I-Spiegel zu haben, als die Supplementierung mit 50g/Tier/Tag.

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion V

---

Tabelle 1: Blutplasmagehalt an IGF-I in ng/ml in Abhängigkeit von der Menge der CLA-Supplementation (a:b:c  $p \leq 0,05$  innerhalb einer Spalte)

	<b>KB</b>	<b>d 6 p.i.</b>	<b>d 13 p.i.</b>	<b>d 20 p.i.</b>	<b>d 32 p.i.</b>	<b>d 45 p.i.</b>
<b>CLA 0</b> n= 4	51,8 <sup>a</sup>	52,6 <sup>a</sup>	45,4 <sup>a</sup>	50,8 <sup>a</sup>	43,0 <sup>a</sup>	47,2 <sup>a</sup> n=3
<b>CLA 50</b> n=6	53,6 <sup>a</sup>	62,6 <sup>a</sup>	63,7 <sup>a</sup>	67,1 <sup>ab</sup>	60,1 <sup>b</sup>	73,6 <sup>b</sup> n=3
<b>CLA 100</b> n=7	69,8 <sup>b</sup>	81,6 <sup>b</sup>	83,5 <sup>b</sup>	90,2 <sup>b</sup>	85,0 <sup>c</sup>	84,6 <sup>b</sup> n=4

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten darauf hin, dass sich der Plasma-IGF-I-Spiegel während des Zyklus resp. der Frühträchtigkeit durch eine CLA-Supplementierung positiv beeinflussen lässt.

Gefördert durch die DFG (PAK 286/1; WR 54/1-1)

### **Bestimmung der Pregnancy-Associated Glycoproteins (PAG) bei der Ziege mittels ELISA mit zwei verschiedenen Antiseren**

**Shahin M, Friedrich M, Gaulty M, Holtz W**

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

Pregnancy-Associated Glycoproteins (PAG) sind Makromoleküle, die von ein- und mehrkernigen Zellen des Trophoblasts bzw. der Plazenta sezerniert werden. Diese Glykoproteine sind im maternalen Blut nachweisbar und dienen bei Schaf und Rind als zuverlässige Methode einer genauen und frühen Trächtigkeitsdiagnose. Ziel dieser Arbeit war die Adaptation des bovinen ELISA für die Bestimmung von PAG bei der Ziege. Von 8 synchronisierten und künstlich besamten pluriparen Burenziegen wurde in den ersten sieben Wochen der Trächtigkeit zweimal wöchentlich, anschließend, bis 4 Wochen vor der Ablammung, wöchentlich eine Blutprobe entnommen. Im letzten Monat der Trächtigkeit wurde zweimal, und in den ersten 4 Wochen nach der Ablammung einmal wöchentlich eine Probe entnommen. Die PAG-Konzentration wurde mittels eines kompetitiven ELISA bestimmt. Gereinigtes bovines PAG wurde als Standard und Tracer verwendet. Spezifische Antikörper wurden aus Immenserum von Kaninchen gewonnen, die entweder mit bovinem (AS726) oder ovinem (AS780) PAG immunisiert worden waren.

Wie aus Abb.1 hervorgeht, stieg die PAG-Konzentration bei Verwendung von Immenserum AS726 auf 3.0 ng/ml an und fiel eine Woche nach der Ablammung wieder auf 1.8 ng/ml ab. Bei Verwendung von Immenserum AS780 nahm die PAG-Konzentration zwischen Trächtigkeitstag 21 und 56 drastisch zu (Max. 92 ng/ml), fiel dann allmählich wieder ab um vier Wochen postpartum basales Niveau zu erreichen. Bei Ziegen mit Mehrlingen wurde eine höhere PAG-Konzentration nachgewiesen als bei Tieren mit Einlingslämmern; der Unterschied war jedoch nur bei Verwendung von Immenserum AS780 und nur am 56. und 63. Tag der Trächtigkeit signifikant. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zwar eine PAG-Bestimmung bei trächtigen Ziegen mittels Verwendung von bovinem Immenserum AS726 im ELISA möglich ist, doch verlässliche Ergebnisse nur bei Verwendung von ovinem Immenserum AS780 zu erwarten sind. Auf diese Weise lässt sich auch bei der Ziege mit Hilfe der PAG-Konzentration im Blut ab dem 28. Trächtigkeitstag eine zuverlässige Trächtigkeitsdiagnose stellen.

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion V

---

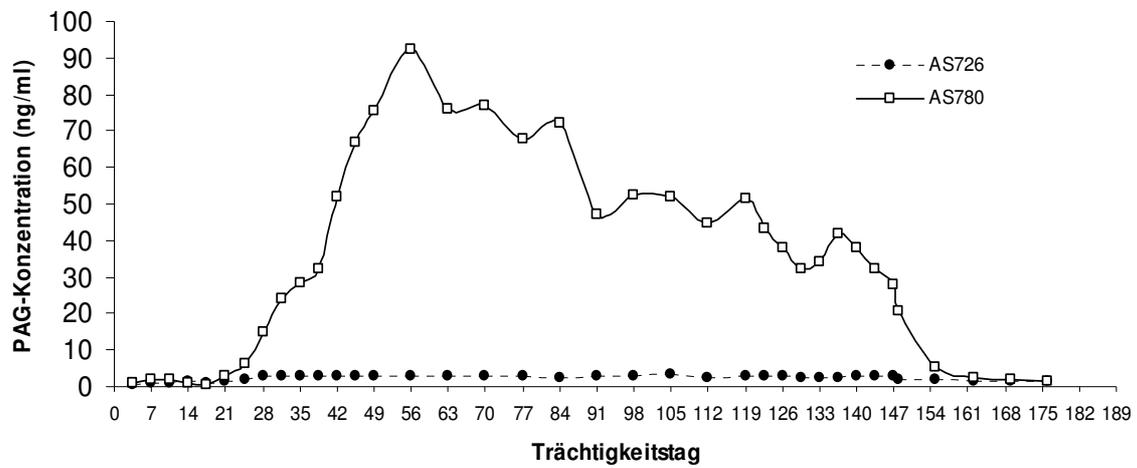


Abb.1: PAG-Verlauf bei Burenziegen bei Verwendung von bovinem (AS726) oder ovinem (AS780) Antiserum.

### Kryokonservierung von Mausembryonen

Wiesław Krzyzak, Joachim Degen, Michael Hoch

*Universität Bonn, LIMES-Institut*

Hier werden ein paar Aspekte der Mausembryo-Kryokonservierung dargestellt um einen Vergleich der Einfriertechnik zwischen Nutztieren zu ermöglichen. Maus als eines der kleinsten Säugetiere könnte möglicherweise Dank ihrer sehr große Vermehrungsrate auch zur Erfahrungsgewinnung im Bereich der Nutztierzucht verwendet werden. Die Mausembryo-Kryokonservierung wird hauptsächlich bei genmanipulierten Mauslinien eingesetzt, die es in einer großen Vielfalt gibt. Aus verschiedenen Gründen müssen oft laufende Forschungsuntersuchungen abgebrochen werden, wobei die hergestellten, Transgenen-Mauslinien zwecks weiterer Einsatzmöglichkeiten möglichst nicht eliminiert werden sollten. Ein Töten der Mauslinie ist zu schade, die weitere Zucht ist zu teuer und Betreuungs-intensiv – eine Alternative ist die Mausembryo-Kryokonservierung, die eine Kosten-arme, preiswerte und Betreuungs-arme Möglichkeit bietet! Eingefrorene Mausembryonen sind bei korrekter Lagerung mindestens 10 Jahre ohne Qualitätsverlust lagerbar so, dass jederzeit kryokonservierte Linien nach Bedarf wieder revitalisiert werden können. Wichtige Punkte für die Vorbereitung der Spendertiere, wie: Superovulation der Spenderweibchen, Verpaarung mit den meist transgenen Spender-Männchen sowie der Plugcheck der Spenderweibchen resultieren in der Auswahl der Embryo-Spendertiere. Beurteilung der Qualität den Embryonen ist sehr viel strenger als bei andern Tieren, weil die Anzahl der bearbeiteten Embryonen wesentlich größer ist. Alternativ kann man auch Spermien kryokonservieren. Das hat folgende Vorteile: theoretisch reicht nur 1 Männchen für die Wiederbelebung einer Mauslinie; das Spendersystem erfordert weniger Zuchtaufwand. Das Spermfreezing hat aber auch Nachteile: die IVF – kann abhängig vom Maus-Stamm sehr schwierig sein und somit nicht immer erfolgreich; die ICSI –Methode ist zeit- und arbeitsaufwändig und bedarf große Erfahrung; der Vorteil ist jedoch, dass die intrazelluläre Sperma-Injektion eine Befruchtung auch mit toten Spermien ermöglicht. Weiter wird das Embryotransfer bei einer der kleinsten Säugetier unter dem Stereomikroskop operativ durchgeführt. Zum Schluss wird eine Zusammenfassung eigener Erfahrung der Jahre 1980 – 2010 in Form von einer Tabelle geschildert. Hiermit verdeutlicht man, dass mit steigender Erfahrung die Erfolgsaussichten stark steigen.

### Welche Rolle spielt die *Zona pellucida* bei der Kryokonservierung von Mäuseembryonen mittels OPS Vitrifikation?

M. El-Gayar<sup>1,2</sup>, M. Gauly<sup>1</sup> und W. Holtz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department für Nutztierwissenschaften, Albrecht-Thaer-Weg 3, 37075 Göttingen.

<sup>2</sup>Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Suez Canal University, 41522 Ismailia, Egypt.

Zur Vitrifikation von Säugerembryonen entwickelten Vajta et al. [1] unter Verwendung dünn ausgezogener Pailletten das sogenannte „open pulled straw“ (OPS) Verfahren. Es erwies sich, dass dies Verfahren sich gut zur Kryokonservierung von Mäuse und Ziegenembryonen eignet [2,3,4]. Ziel der vorliegenden Untersuchung war, zu ermitteln ob sich das OPS-Verfahren auch zur Kryokonservierung von Mäuseembryonen mit fehlender oder beschädigter *Zona pellucida* eignet.

Weibliche Mäuse der Linie NMRI, im Alter von 5-8 Wochen, wurde i.p. 7.5 I.E. eCG, gefolgt, 45 bis 48 h später, von 5 I.E. hCG, verabreicht. Die Tiere wurden gedeckt, und 84 - 86 h danach wurden Embryonen im kompaktierten Morulastadium gewonnen. Von insgesamt 300 Embryonen wurden 100 mit, 100 ohne Zona, und 100 mit per Mikromanipulation punktierter Zona vitrifiziert. Die Embryonen wurden für 1 min in TCM 199 mit 20% Ziegenserum (Haltemedium) sowie 10% Ethylenglykol (EG) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) gebracht, anschliessend für 20 sec in Haltemedium mit 20% EG und 20% DMSO. Mit Hilfe von Kapillarkraft wurden sie in extrem dünne und dünnwandige Pailletten aufgezoogen und sofort in flüssigen Stickstoff gebracht. Nach dem Erwärmen in saccharosefreiem Haltemedium [4] bei 37°C wurden die Embryonen in M16-Medium kultiviert um die Entwicklungspotenz zu prüfen.

Die Wiederfindungsrate der Embryonen nach dem Auftauen betrug 100%. Die anschliessende in vitro-Entwicklungsrate aller kultivierter Embryonen war zufriedenstellend (Tab. 1). Da die Überlebensrate der Mäuseembryonen mit, ohne und mit punktierter Zona kaum differierte, lässt sich vermuten, dass das Vorhandensein einer intakten *Zona pellucida* für die Vitrifikationstauglichkeit der Embryonen nicht essentiell ist.

## 37. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion V

**Tabelle 1.** In vitro Entwicklung von vitrifizierten Mäuseembryonen mit und ohne oder mit punktierter *Zona pellucida*

<i>Zona pellucida</i>	Anzahl kultivierter Embryonen	Expandierte Blastozysten		Geschlüpfte Blastozysten	
		n	%	n	%
Intakt	100	93	93 <sup>a</sup>	80	80
Entfernt	100	77	77 <sup>b</sup>	77	77
Punktiert	100	89	89 <sup>a</sup>	83	83

<sup>a,b</sup> Innerhalb Spalten sind Werte mit verschiedenen Indizes signifikant verschieden ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2$ -test)

- **Literatur:**

- [1] G. Vajta, P. Holm, M. Kuwayama, P.J. Booth, H. Jacobsen, T. Greve, H. Callesen, Open Pulled Straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51 (1998) 53-58.
- [2] A. AlYacoub, M. Gauly, W. Holtz, Open pulled straw (OPS) vitrification of caprine embryos at various stages of development. *Theriogenology* 73 (2010), 1018-1023.
- [3] M. El-Gayar, W. Holtz, Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. *J. Anim. Sci.* 79 (2001) 2436-2438.
- [4] M. El-Gayar, M. Gauly, W. Holtz, One-step dilution of open-pulled-straw (OPS)-vitrified mouse blastocysts in sucrose-free medium. *Cryobiology* 57 (2008) 191-194.

- **Danksagung:** The Fellowships Program, The Arab Fund for Economic and Social Development, Kuwait, State of Kuwait.