

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob durch eine Dichtegradientenzentrifugation von Bullensperma in einem 10-schichtigen Percoll-Gradienten eine Trennung des Spermas in X- und Y-Chromosom-tragende Fraktionen möglich ist.

Zu diesem Zweck wurde eine In-vitro-Fertilisation von Rinderoozyten mit Spermien, die sich in der oberen bzw. unteren Fraktion des Dichtegradienten angereichert hatten, durchgeführt. Bei den dabei produzierten Embryonen wurde das Geschlechtsverhältnis mit Hilfe der PCR-Technik ermittelt. Außerdem wurden die Vorwärtsbeweglichkeitsraten der Spermien, sowie die Befruchtungs- und Weiterentwicklungsraten von Oozyten bzw. Embryonen, bestimmt.

Weiterhin wurde untersucht, ob bei unterschiedlich entwickelten Rinderembryonen nach In-vitro-Befruchtung eine Verschiebung des Geschlechts feststellbar ist. Dabei wurden die kommerziell erhältlichen Konzentrate von Aminosäuren und Vitaminen für BME- und MEM-Zellkulturen als Zusatz zu modifiziertem Ménézo-Medium (MMM) miteinander verglichen.

Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse ermittelt:

1. Die Teilungsrate der Oozyten betrug bei Verwendung der oberen Spermienfraktion für die In-vitro-Fertilisation 24,7 %, bei Verwendung der unteren Fraktion 23,0 %. Die Unterschiede waren nicht signifikant.
2. Die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien der unteren Fraktion (61,3 %) war besser als die der oberen Fraktion (51,3 %). Die höhere Vorwärtsbeweglichkeitsrate hatte keinen Einfluß auf die Befruchtungsrate.
3. Bei Verwendung der oberen Spermienfraktion für die In-vitro-Fertilisation war die Weiterentwicklungsraten größer als bei Verwendung der unteren Fraktion (18,5 % vs. 15,7 %).

4. Weder bei den Embryonen, die mit der oberen Spermienfraktion, noch bei denen, die mit der unteren Spermienfraktion produziert wurden, war eine Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses festzustellen.
5. Zwischen den beiden Aminosäure- und Vitaminkonzentraten BME bzw. MEM als Mediumzusatz zu MMM konnten keine Unterschiede hinsichtlich Befruchtungs- (40,2 % vs. 42,5 %) und Weiterentwicklungsrate (22,5 % vs. 20,6 %) festgestellt werden.
6. Eine schnellere Entwicklung der Embryonen findet bei Kultivierung in MMM mit BME-Zusätzen statt. In der betreffenden Versuchsgruppe erreichten 20,0 % der Blastozysten dieses Stadium bereits an Tag 6, während es in der Gruppe mit den MEM-Zusätzen nur 11,6 % waren.
7. Die Geschlechtsverteilung bei den produzierten Embryonen war bei beiden verwendeten Mediumzusätzen gleich. Je weiter entwickelt (expandiert) die Blastozysten nach einer bestimmten Kultivierungsdauer waren, desto größer war der Anteil an männlichen Embryonen; dementsprechend war der Anteil der weiblichen Embryonen um so größer, je weniger entwickelt die Blastozysten waren. Männliche Embryonen wuchsen etwas schneller als weibliche und erreichten früher das Blastozystenstadium.
8. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Embryonen bei allen 181 produzierten Blastozysten war 62,4 % zu 37,6 % und unterschied sich signifikant von einem 50:50-Verhältnis.

Jürgen Christian:

Experiments on density gradient centrifugation of bull spermatozoa and investigations of developmental velocity of bovine in vitro embryos to influence resp. determine sex.

SUMMARY

The aim of the present study was to investigate the possibility of separating bull sperm into fractions rich in X- and Y-chromosome bearing sperm by density gradient centrifugation through ten steps of a Percoll density gradient.

For this purpose an in vitro fertilization of bovine oocytes was carried out using spermatozoa that had been concentrated in the top respectively bottom fraction of the density gradient. The produced embryos were sexed by the PCR-method.

Moreover the forward motility rate of spermatozoa was determined as well as in vitro fertilization rate of oocytes and the rate of further development of the resulting embryos.

Furthermore it was examined if an altered sex ratio between bovine embryos of different rate of development could be detected. Thereby the commercially available concentrates of amino-acids and vitamins for BME- and MEM-cell-culture were compared as a supplement for modified Ménézo-medium (MMM).

In detail the following results were obtained:

1. When the top fraction of sperm was used for in vitro fertilization the cleavage rate of the oocytes was 24.7 %, the use of the bottom fraction resulted in a cleavage rate of 23.0 %. The difference was not significant.
2. In the bottom fraction the forward motility of spermatozoa was better than in the top fraction (61.3 % vs. 51.3 %). Better forward motility had no effect on the in vitro fertilization rate.

3. Utilization of the top fraction of spermatozoa for in-vitro-fertilization resulted in a better rate of development than utilization of the bottom fraction (18.5 % vs. 15.7%).
4. Neither embryos produced with the top fraction of spermatozoa nor those produced with the bottom fraction showed an alteration of the sex ratio.
5. No differences were observed between BME and MEM amino acid and vitamin concentrates as a supplement for MMM concerning the fertilization rate (40.2 % vs. 44.5 %) and the rate of further development.
6. In cultivation of embryos in MMM with BME-supplement a faster development took place. In the concerning group 20.0 % of the blastocysts reached that stage at day 6 already, while there were only 11.6 % in the group with the MMM supplement.
7. The sex ratio of the produced embryos was the same in both employed medium supplements. The further developed (expanded) the blastocysts after a certain time of cultivation, the higher was the part of male embryos; corresponding the part of female embryos was all the higher, the less developed the blastocysts. Male embryos develop a bit faster and sooner reach the stage of blastocyst than female embryos do.
8. In all 181 produced blastocysts the rate of male to female embryos was 62.4 % to 37.6 % and differed significantly from a 50:50 ratio.