

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Einflußfaktoren auf die Maturation und auf die Erstellung von Kerntransferkomplexen beim Rind untersucht. Die Kerntransferversuche sollen dazu beitragen, die Erstellung geklonter Tiere zu verbessern.

Bei den Versuchen wurden im einzelnen folgende Ergebnisse erzielt:

1. Nach Reifung der Oozyten für eine Zeitdauer von 18 bis 44 Stunden wurden nach In-vitro-Befruchtung die besten Weiterentwicklungsraten bis zum Blastozyststadium mit 34,1% nach einer Maturationsdauer von 18 bis 28 Stunden erzielt.
Nach 44 stündiger Maturationsdauer konnte keine Weiterentwicklung der in vitro befruchtete Eizellen festgestellt werden.
2. Bei den Versuchen zeigte das Medium MPM gegenüber MMM eine leichte Überlegenheit bei der Langzeitkultivierung in vitro befruchteter Eizellen. Im MPM erreichten maximal 37,1%, in MMM 30,7% das Blastozyststadium.
3. Nach Benutzung zweier verschiedener Fusionsmedien (L1 und L3) wurden Fusionsraten von 43,6% bei L3 und bis zu 59,2% bei L1 ermittelt. Maximale Fusionsraten wurden nach Verwendung von zwei Pulsen mit einer Pulsstärke von 1,30 kV/cm und einer Pause zwischen den Pulsen von 0,5 Sekunden erzielt.
4. Eine wiederholte Pulsgebung zur Fusion brachte eine Erhöhung der Fusionsrate von 59,2% auf 75,0%.
5. Die Fusionsraten wurden von der Maturationsdauer nicht beeinflusst, (75,0% für 24 Stunden maturierte Oozyten gegenüber 71,6% für 48 Stunden maturierte Oozyten). Dagegen traten bei den Weiterentwicklungsraten deutliche Unterschiede auf.
Nach 48 Stunden Maturation entwickelten sich 15,4% zum Morula- beziehungsweise Blastozyststadium gegenüber 1,9% nach einer Maturation von 24 Stunden.
6. Die Lage der Elektroden in der Fusionskammer hat einen deutlicher Einfluß auf die Fusions- und Teilungsraten. Es wurden 84,5% Fusionsraten für eine Kammer mit waagerechte Lage der Elektroden gegenüber 62,4% für eine Kammer mit senkrechte Lage der Elektroden erzielt. Die Teilungsraten entsprachen den Fusionsraten.

7. Nach Verwendung von Donorzellen verschiedener Herkunft wurde ermittelt, daß frisch gespülte Embryonen als Kerntransferdonoren am besten geeignet sind. Mit ihnen wurden Fusionsraten von 80,7%, gegenüber 73,4 % für in vitro erstellte und 61,8% für TG-Embryonen erreicht.

8. Nach Transfer einer Blastozyste auf ein Empfängertier ist ein geklontes Kalb geboren worden.

Jantscho Todorov:

The influence of different factors on the in vitro fertilization and nuclear transfer results with bovine oocytes.

Summary

The aim of the study was to test the possibility to produce a living calf using the method for nuclear transfer. Different parameters, media and chambers for electrofusion were tested. The possibility to use bovine oocytes matured for prolonged time as recipient cytoplasm was also tested.

The following results were obtained:

1. After maturation of the bovine oocytes for 18 through 44 h and after IVF the best developmental results were achieved for the maturational period between 18 and 28 hours. As much as 34,1% of the embryos reached the blastocyst stage. After a maturational time for 44 hours there was no further development at all.
2. There were no significant differences between the two media (MPM and MMM) used for culture. In MPM 37,1% of the embryos reached blastocyst stage, compared 30,7% for MMM.
3. Using two different media for electrofusion (L1 and L3), 59,2% fused in L1 to 43,6% in L3. The maximum fusion rates were obtained using two pulses of 1,3 kV/cm field strength, a pulse duration of 30 μ s and a pause between the pulses of 0,5 s.
4. After a repeated pulse sequence for electrofusion better results were obtained. 59,2% of the nuclear transfer complex fused after one pulse sequence versus 75,0% after a repeated pulse sequence for electrofusion.
5. There were no significant differences between the fusion rates of oocytes matured for 24 (75,0%) and 48 (71,6%) hours.

Significant differences existed between the developmental capacity of the embryos. From the oocytes which were matured for 48 hours 15,4% reached the morula/blastocyst stage, as for the oocytes matured for 24 hours only 1,9% reached a transferable stage.

6. The position of the electrodes in the fusion chamber showed a significant influence upon the fusion- and developmental rates. 84,5% of the nuclear transfer complexes pulsed in a chamber with horizontal position of the electrodes fused , whereas 62,4% fused in a chamber with vertical position of the electrodes.

The developmental rates were similar to the fusion rates.

7. Using donor blastomeres from different sources (in vivo, in vitro and frozen/thawed) it was found that fresh embryos are the best source of donor blastomeres.

From the in vivo produced blastomeres 80,7% fused, against 73,3% from in vitro and 61,8% from the frozen/thawed blastomeres.

8. After transfer of a nuclear transfer embryo to a synchronized recipient heifer a cloned calf was born.