

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Entwicklung einer Methode für den Vaterschaftsnachweis von Schweineembryonen zur Fertilitätsbeurteilung von Ebern nach heterospermer Insemination wurden 11 Sauen mit Mischsperma zweier Eber besamt. Zur Kontrolle wurden je 7 Sauen mit Sperma nur eines Ebers besamt. Die Besamung erfolgte 24 h nach Feststellung des Duldungsreflexes, ausgelöst durch einen Sucheber. Die Besamungsdosis betrug in allen Gruppen 1 Milliarde Spermien. Als Verdüner wurde BTS (PURSEL u. JOHNSON 1975) angewendet.

Am Tag 5 bis 6 nach der Besamung wurden die Sauen geschlachtet und die Embryonen aus dem Uterus gespült. Die Zona pellucida wurde mit dem Mikromanipulator entfernt und die normal entwickelten Embryonen eingefroren. Die Befruchtungsrate und die Anzahl akzessorischer Spermien in den isolierten Zonae wurden ermittelt.

In einem Vorversuch wurden 5 DNA-Marker aus Publikationen ausgewählt und getestet. Von den getesteten DNA-Markern wurden drei (TNFm2, S0082 und S0097) für den Vaterschaftsnachweis eingesetzt. Die Elterntiere und die normal entwickelten Embryonen (n = 243) wurden nach DNA-Isolierung mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) mit den DNA-Markern typisiert. Zwei DNA-Marker (S0082 und S0097) wurden in einem PCR-Ansatz amplifiziert (Multiplex-PCR).

Bei dem Reaktionsgemisch für den Marker TNFm2 wurde Spermidin zugegeben, um die Effizienz der PCR zu steigern. Bei der Multiplex-PCR wurde die AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase, Stoffel Fragment (Perkin Elmer) verwendet. Die Eigenschaften dieser Polymerase erleichtern die Optimierung der Multiplex-PCR.

Die amplifizierten DNA-Fragmente der Elterntiere und der Nachkommen wurden nebeneinander in Polyacrylamidgele aufgetragen und unter Elektrophorese aufgetrennt. Nach der Silberfärbung wurden die entstandenen Banden ausgewertet.

Mittels der einzelnen Marker konnte bei 65 - 72 % der Embryonen ein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Die Amplifikationsrate schwankte zwischen 52,1 % und 80,4 %. Bei 207 Embryonen (85,2 %) aus den drei Besamungsgruppen wurde ein auswertbares PCR-Produkt nachgewiesen. Der Vater konnte bei 47 der Embryonen (19,3 %) nicht bestimmt werden. Von den Embryonen, die aus heterospermer Insemination stammten (n = 107) konnten 95 ausgewertet und bei 76 (25 Eber A und 51 Eber B) die Vaterschaft nachgewiesen werden. Bei 19 Embryonen war der Vaterschaftsnachweis nicht möglich, weil die Sauen die gleichen Allele zur

Differenzierung der Eber besaßen. Bei 17 Embryonen (4 Gruppe Eber A, 4 Gruppe Eber B und 9 Gruppe Eber A + B) entstand kein PCR-Produkt.

Bei der Befruchtungsrate nach homospermer Insemination sind keine Unterschiede zwischen beiden Eber zu erkennen. Die Anzahl akzessorischer Spermien pro Zona pellucida bei den von Eber B gezeugten Embryonen war doppelt so hoch wie bei denen von Eber A.

Mit Hilfe der Typisierung der Embryonen aus Mischspermabesamungen konnte der Anteil befruchteter Embryonen von 67 % für Eber B mit 51 gezeugten Embryonen gegenüber Eber A mit 25 nachgewiesen werden.

Somit stellt die Methode der Amplifikation von DNA-Markern mittels Polymerasekettenreaktion einen brauchbaren Vaterschaftsnachweis im Rahmen der wissenschaftlichen Untersuchung der heterospermen Insemination dar.

Rubens Stahlberg

**"Paternal Identification of Embryos with Polymorphic DNA Markers for the Evaluation of Boar Fertility following Heterospermic Insemination"**

**7 SUMMARY**

In developing a method for the paternal identification of swine embryos to determine the fertility of boars following the use of pooled semen, a total of 11 sows were inseminated with such semen from two boars. Seven sows each inseminated with semen from a single boar served as the control. The inseminations were made 24 h after standing heat was determined by a teaser boar. The insemination dosage in all groups was one billion spermatozoa. All semen samples were extended with BTS (PURSEL and JOHNSON, 1975).

The sows were slaughtered on day 5 or 6 after insemination, and the uteruses were flushed to recover the embryos. The Zona pellucida of each embryo was removed using a micromanipulator, and the normally developed embryos were frozen. The fertilization rates and the numbers of accessory spermatozoa in the zones were determined.

In preliminary studies five DNA markers selected from various publications were tested. Three of the DNA markers tested (TNFm2, S0082, and S0097) were used for paternal identification. Following DNA isolation, the adult swine and normally developed embryos were typed with the DNA markers by means of the polymerase chain reaction (PCR). Two DNA markers (S0082 and S0097) were amplified in a PCR reaction (multiplex PCR).

In order to increase the efficiency of the PCR, spermidine was added to the reaction mixture for the TNFm2 marker. For the multiplex PCR, AmpliTaq<sup>(®)</sup> DNA polymerase, Stoffel fragment (Perkin Elmer), was used. The characteristics of this polymerase simplify the optimization of the multiplex PCR.

The amplified DNA fragments of the adult swine and of the embryos were applied to polyacrylamide gels and separated by means of electrophoresis. The bands obtained were evaluated after silver staining.

PCR products could be shown with the individual DNA markers in 65 - 72% of the embryos. The amplification rate ranged between 52.1 and 80.4%. A usable PCR product could be shown for 207 (85.2%) of the embryos from the three insemination groups. The fathers of 47 (19.3%) of the embryos could not be determined. Of the 107 embryos obtained from insemination with pooled semen, 95 could be evaluated, and in 76 cases the father was shown (25 boar A, 51 boar B). Paternal identification of 19 embryos was not possible, since the sows had the same alleles used for the differentiation of the boars. No PCR products were obtained for 17 embryos (4 from boar group A, 4 from boar group B, and 9 from boar group A+B).

No differences in fertilization rates were seen between the two boars after homospermic insemination. The number of accessory sperm per zona pellucida were approximately twice as high in embryos from boar B than in those from boar A.

By typification of the embryos from inseminations with pooled semen it could be shown that 67% of the embryos were produced by boar B, as compared to only 33% from boar A.

The amplification of DNA markers with the polymerase chain reaction represents an applicable method of paternal identification in the course of studies on heterospermic inseminations.