

SEMSEX

WT Sexing von Ziegensperma mit Dichtegradientenzentrifugation



Abschlussbericht SEMSEX

Wissenschaftliche Tätigkeit Nr. 3711

WT Sexing von Ziegensperma mit Dichtegradientenzentrifugation

Sexing of goat semen using density gradient centrifugation

Projektleitung:

Dipl.Tzt. Beate Berger, HBLFA Raumberg-Gumpenstein

Projektmitarbeiter:

Leopold Podstatsky-Liechtenstein, HBLFA Raumberg-Gumpenstein

Ing. Markus Gallnböck, HBLFA Raumberg-Gumpenstein

Projektpartner:

Dr. Sven Budik, Veterinärmedizinische Universität Wien

Josef Stöckl, Landesverband für Ziegenzucht und -haltung Oberösterreich

Projektlaufzeit:

2021 – 2022

Impressum

Medieninhaber und Herausgeber:

HBLFA Raumberg-Gumpenstein

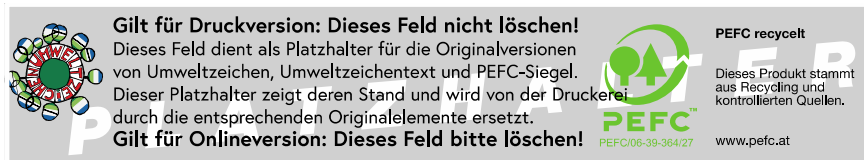
Landwirtschaft

Raumberg 38, 8952 Irdning

raumberg-gumpenstein.at

Autorinnen und Autoren: Dipl.Tzt. Beate Berger

Fotonachweis:



Irdning, 2019. Stand: 11. November 2022

Copyright und Haftung:

Auszugsweiser Abdruck ist nur mit Quellenangabe gestattet, alle sonstigen Rechte sind ohne schriftliche Zustimmung des Medieninhabers unzulässig.

Es wird darauf verwiesen, dass alle Angaben in dieser Publikation trotz sorgfältiger Bearbeitung ohne Gewähr erfolgen und eine Haftung des Bundeskanzleramtes und der Autorin/des Autors ausgeschlossen ist. Rechtausführungen stellen die unverbindliche Meinung der Autorin/des Autors dar und können der Rechtssprechung der unabhängigen Gerichte keinesfalls vorgreifen.

Rückmeldungen: Ihre Überlegungen zu vorliegender Publikation übermitteln Sie bitte an beate.berger@raumberg-gumpenstein.at.

Inhalt

1 Zusammenfassung	5
1.1 Summary	5
2 Einleitung	6
2.1 Material und Methode	7
2.1.1 Samenspender	8
2.1.2 Qualitätskontrolle	8
2.1.3 Besamungsversuche	8
2.1.4 Färbung.....	8
3 Ergebnisse	9
4 Diskussion und Schlussfolgerungen	10
5 Tabellen.....	11
6 Abbildungen	13
7 Tabellenverzeichnis	14
8 Abbildungsverzeichnis	15
9 Literaturverzeichnis.....	16
Abkürzungen	17

1 Zusammenfassung

Männliche Kitze werden in der Zucht von Milchrasen vielfach zum Problem. Die Verwertungsmöglichkeiten für die stoffumsatzbetonten Kitze sind nicht rentabel, bzw. ethisch bedenklich. Die Verwendung von gesextem Sperma kann einen Ausweg aus dieser Situation bieten. Die in der Rinderzucht erfolgreich verwendete Durchflusszytometrie ist für Ziegensperma zu langsam. Daher wurde in dem Versuch die Dichtegradientenzentrifugation als Methode zur Trennung von männlich und weiblich determinierten Spermien überprüft. Es wurden 597 Portionen gesextes Sperma von 4 Böcken produziert. Die Erfolgskontrolle der Zentrifugation wurde mit einem an der Veterinärmedizinischen Universität Wien entwickelten PCR-Test durchgeführt. Besamungsversuche in der Ziegenherde der HBLFA Raumberg-Gumpenstein und in an dem Projekt teilnehmenden Betrieben blieben trotz guter Motilität nach dem Auftauen erfolglos. Eine Lebend/Tot-Färbung von Auftausperma (Kovacs u. Foote 1992) zeigte eine starke Schädigung der Samenzellen, insbesondere der Kopfkappen und Köpfe, bei den untersuchten Ejakulaten aller verwendeter Böcken. Derzeit ist die verwendete Methode zum Sexing von Ziegensperma nicht praxisreif, weiterführende Untersuchungen werden empfohlen.

1.1 Summary

Male kids are an unwanted by-product of dairy-goat breeding. The possibilities to use kids from high-turnover breeds are not profitable and/or ethical. The use of sexed semen could offer a solution. In commercial cattle breeding flow-cytometry is used successfully, but the method is too slow and therefore not suitable for buck semen. In this trial density gradient centrifugation is used to sort male and female determined sperm cells. 597 doses of sexed semen from 4 bucks were produced. For quality control a PCR-test for male and female sperm was developed at the vetmeduni Vienna. Fertility was tested in the goat herd of the AREC Raumberg-Gumpenstein and farms joining the project, showing no pregnancy in the inseminated goats. The live/dead staining (Kovacs u. Foote 1992) showed heavily damaged acrosomes and sperm heads in all ejaculates of all bucks in the trial. Currently the sexing method for goat semen cannot be recommended for practical use, further investigations are needed.

2 Einleitung

Männliche Kitze werden in der Zucht von Milchrassen vielfach zum Problem. Die Tötung zur Verwertung als Tierfutter in den ersten Lebenstagen ist eine Nische, die von den Konsument:innen abgelehnt wird. Die Aufzucht zur Fleischproduktion ist bei Stoffumsatztypen, wie es hoch leistende Milchziegen oder –rinder sind, nicht rentabel. Die Gebrauchskreuzung mit Fleischrassen, beim Rind vielfach angewendet, bringt zwar eine bessere Bemuskelung der Schlachtkörper, aber leider ist Kitzfleisch, anders als Kalb-, Rind- oder Lammfleisch, außerhalb der Osterzeit in Österreich schwierig zu vermarkten.

Einen Ausweg kann die Verwendung von gesextem Sperma bieten. Bei Säugetieren bestimmt der männliche Partner das Geschlecht der Nachkommen. Spermien enthalten je einen halben Chromosomensatz, daher ist entweder ein X- oder ein Y-Chromosom in der Samenzelle vorhanden. Man spricht von weiblich oder männlich determinierten Spermien (X-Spermien und Y-Spermien). Sexing ist die Trennung von X-Spermien und Y-Spermien. X-Spermien enthalten etwas mehr Erbsubstanz (DNA), als Y-Spermien, sie sind daher auch etwas schwerer.

Die Trennmethode der Wahl ist beim Rind die Durchflusszytometrie (DFZ), bei der die DNA der Samenzellen mit einem speziellen fluoreszierenden Farbstoff markiert wird. Anschließend werden sie einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet und in einem elektrostatischen Feld nach der Stärke des reflektierten Lichtes sortiert. In der Rinderzucht ist diese Methode seit mehr als 10 Jahren kommerziell etabliert. In mehr als 90% der Fälle wird ein Kalb mit dem gewünschten, meist weiblichen Geschlecht geboren (Rath 2006, Garner et al. 2013).

Leider ist die beim Rind angewandte Sortiermethode für Ziegensperma derzeit zu zeitaufwendig. Für eine Besamungsportion wird bei der Ziege rund die zehnfache Menge an Spermien benötigt, wie beim Rind (50×10^6 vs. 5×10^6).

Als alternative Methode bietet sich die Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) an. Bei der Anwendung der DGZ zur Trennung von Zellen wird die unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit von Zellen unterschiedlicher Dichte in isotonischen Medien genutzt. Meist kommen Saccharose- oder Kieselgelmedien zum Einsatz (Amann, 1989). In einer Säule werden Medien mit von oben nach unten zunehmender Dichte übereinander geschichtet. Bei Zentrifugation reichern sich Objekte unterschiedlicher Dichte in den entsprechenden Schichten an, daher sinken die schwereren X-Spermien tiefer ab als

Y-Spermien. Die Trennung ist weniger effektiv als bei der DFZ, es wird in der Literatur von bis zu 70% Nachkommen mit dem gewünschten Geschlecht berichtet (Freese, 2009). Diese Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten weiblicher Nachkommen könnte das Problem männlicher Kitze in der Milchziegenzucht zumindest verkleinern.

Spermien mit X- Chromosom enthalten gegenüber Spermien mit Y-Chromosomen etwas mehr DNA. Dieser Unterschied beträgt beispielsweise beim Rind 3,8% und beim Schaf 4,2% (Rath, 2002, 2006). Für Ziegensperma waren keine Daten zugänglich.

Seit den 1970er Jahren wurden Experimente zur Auftrennung männlich und weiblich determinierter Kaninchenspermien mit Hilfe der DGZ durchgeführt (Schilling u. Thormählen, 1976). Die Erfolge waren nachweisbar, für den Einsatz in der Tierzucht bei einem Geschlechterverhältnis von 56% weiblich zu 44% männlichen Nachkommen aber zu unsicher.

2.1 Material und Methode

In dem Versuch sollte die Eignung eines kommerziell erhältlichen cytochromischen Filters (ChromatYc Sex, Fa. Genetica, Spanien) zum Sexing von Ziegensperma erprobt werden.

Dichtegradientenzentrifugation

Das Nativsperma wurde nach der Beurteilung der Menge, Aussehen, Dichte und Motilität mit handelsüblichem Tiefgefrierverdünner (Andromed®, Fa. Minitüb) im Verhältnis 1 : 4 verdünnt.

Der vorgefertigte cytochromische Filter für das Sexing wurde nach Werksangabe in 15ml Zentrifugenröhrchen über einander geschichtet. Nach Einpipettieren von je 1,5ml vorverdünntem Frischsperma pro Röhrchen erfolgte die Zentrifugation bei 700g für 30 Minuten (Abb. 1). Danach wurde die unterste Fraktion mit den weiblich determinierten Spermien entnommen. Die Spermiendichte wurde in einer Makler-Zählkammer® bestimmt und die Konzentration mit Andromed® auf 200 Mio/ml eingestellt. Nach einer Anpassungszeit von mindestens 120 Minuten bei +4°C erfolgte die Konfektionierung in handelsübliche 0,5ml Cassou-Pailletten und die Tiefgefrierkonservierung im Stickstoffdampf bei –140°C für 8 Minuten. Die Samenportionen wurden bis zum Auftauen in Flüssigstickstoff gelagert.

2.1.1 Samenspender

Es wurden 14 Ejakulate von 4 Besamungsböcken (1 Saanenziege, 2 Gemsfarbige Gebirgsziegen und 1 Toggenburger Ziege) mit erprobter Tiefgefrierfähigkeit des Spermas gesext.

2.1.2 Qualitätskontrolle

Die Überprüfung der Motilität des Frisch- und des Tiefgefrierspermas erfolgte im Rahmen des Routinebetriebs der Besamungsstation durch Schätzung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien an einer aufgetauten Probe.

An der Veterinärmedizinischen Universität Wien wurde ein PCR-Test, der speziell auf X- und Y-Spermien reagiert, entwickelt.

2.1.3 Besamungsversuche

Besamungsversuche zur Überprüfung der Fertilität des Spermas und des Geschlechtsverhältnisses der geborenen Kitze wurden in der Ziegenherde der HBLFA Raumberg-Gumpenstein und auf Zuchtbetrieben im Feld nach hormoneller Zyklussynchronisation und Brunstauslösung an insgesamt 30 Ziegen durchgeführt. Die Besamungen erfolgten terminorientiert nach Brunstauslösung. 25 Ziegen wurden mit weiblich gesextem Sperma und 5, als Kontrolle, mit nicht gesextem Sperma besamt.

Die Trächtigkeitskontrolle erfolgte 28 Tage nach der Insemination per Ultraschalluntersuchung.

2.1.4 Färbung

Zusätzlich wurde von jedem Bock eine aufgetaute Samenprobe nach Kovacs und Foote (1992) gefärbt, bei 1000facher Vergrößerung (Ölimmersion) je 200 Samenzellen ausgezählt und in absteigender Reihenfolge nach Schäden an der Kopfkappe, am Kopf und am Schwanz differenziert. Pro geschädigter Zelle wurde nur die ranghöchste Veränderung festgehalten.

Aufgrund der geringen Anzahl der Ejakulate und der eindeutigen Ergebnisse wurde keine vertiefte Statistik durchgeführt.

3 Ergebnisse

Es wurden insgesamt 597 Besamungsportionen mit X-Spermien konserviert (Tab. 1) und 25 Ziegen mit weiblich gesextem Sperma, sowie 5 Ziegen als Kontrollgruppe mit ungesextem Sperma besamt. 4 Ejakulate wurde wegen zu geringer Motilität nach dem Auftauen verworfen, sie wurden aber ebenfalls mit dem PCR auf den Sortiererfolg geprüft.

Tabelle 2 zeigt den Sortiererfolg nach DGZ. Das Verhältnis der als weiblich (X) und männlich (Y) determinierten Spermien beträgt bei den beiden Kontrollejakulaten etwa 1. Es wurden Verschiebungen des Geschlechtsverhältnisses zwischen 1:1,05 und 1:1,35 zugunsten der weiblichen Fraktion erzielt. Daraus wären bis zu 70% Nachkommen mit dem gewünschten Geschlecht zu erwarten.

Alle synchronisierten Ziegen zeigten bei der Besamung eine deutliche Brunst.

Bei der Ultraschalluntersuchung wurden nur 2 Kontrollziegen als trächtig bestätigt, alle mit gesextem Sperma besamten Ziegen waren nicht trächtig.

Um die Schädigung der Spermien sichtbar zu machen wurde von allen vier verwendeten Böcken jeweils eine Spermaprobe aufgetaut und mit der lebend/tot Färbung nach Kovacs und Foote (1992) gefärbt. Die Ergebnisse der Färbung zeigt Tabelle 3. Es wurden bis zu 97% veränderte Samenzellen gefunden. Die meisten Veränderungen betrafen die Kopfkappen mit 36 bis 48%. Abb. 2 zeigt zwei intakte, kräftig rosa gefärbte Kopfkappen und eine zerstörte dunkelviolette Kopfkappe, darüber hinaus sind bei allen drei Samenzellen die Schwänze abgestorben.

4 Diskussion und Schlussfolgerungen

Die Trennung in weiblich und männlich determinierte Spermien war nach den PCR Ergebnissen in einem das Geschlechtsverhältnis ändernden Ausmaß möglich. Die Ausbeute an Besamungsportionen war vor allem wegen der reduzierten Dichte im zweiten Produktionsjahr zufriedenstellend, zusätzlich waren die Böcke bezüglich Spermamenge und -qualität vorselektiert.

Die Auftaumotilität ist nur ein sehr grober Hinweis auf die Befruchtungsfähigkeit von Sperma (Rodriguez-Martinez 2003). Gliozzi et al. (2017) empfehlen eine Kombination von computergestützter Bewegungsanalyse des Auftauspermas mit DFZ-Parametern zur Beurteilung der Fertilität von Rindersperma im Labor. Leider stehen die für das Rind entwickelten weiterführenden in vitro Tests für die Ziege nicht zur Verfügung.

In der Literatur wird von einer geringeren Befruchtungsleistung von Sperma nach einer DGZ und Tiefgefrierkonservierung berichtet (Freese 2009, Rahman et al. 2008). Auch mithilfe der DFZ sortiertes Rindersperma hat eine um etwa 10% niedrigere Befruchtungsrate als unsortiertes Sperma (Rath 2002), für die Ziege waren keine Literaturangaben verfügbar.

Laut Hersteller Genetica wurden bei 225 mit gesextem, tiefgefrorenen Sperma besamten Ziegen bei einer Trächtigkeitsrate von 35,6%, 64,8% weibliche Kitze geboren (Genetica 2021). Allerdings steht fest, dass eine derart starke Schädigung der Zellmembranen, wie in unserer Untersuchung an den gefärbten Präparaten, keinen Befruchtungserfolg mehr erwarten lässt.

Eine Quelle für die Schäden vor allem an den Akrosomen könnte die vom Hersteller des Dichtegradienten angegebene Zentrifugationsdauer von 30 Minuten sein. Carvajal et al. (2004) empfehlen für Ebersperma eine kürzere Zentrifugationsdauer bei höherer Geschwindigkeit um die Kopfkappen zu schonen.

Derzeit kann die Methode für die Praxis in dieser Form nicht empfohlen werden. Alternativen wie eine niedrigere Zentrifugationsgeschwindigkeit, eine geringere Dichte des Tiefgefrierspermas oder die Verwendung von gesextem Frischsperma bedürfen weiterführender Untersuchungen.

5 Tabellen

Datum	Bock_Ejakulat	Menge ml	Dichte 10 ⁹ /ml	Mot frisch%	Volumen weibl ml	Pailletten	Dichte End 10 ⁶ /ml	Mot Kontr%
18.03.2021	516	1	3500	70	2,8	5	100	10
22.03.2021	516	0,9	3700	75	2	16	200	40
22.03.2021	531_1	2	5900	70	3	14	200	20
22.03.2021	531_2	3	4000	70	2	20	200	50
29.03.2021	516	0,5	3800	75	4	7	200	50
29.03.2021	531	3	3200	70	4,7	7	200	50
19.01.2022	531	3,5	4300	70	16	72	50	50
25.01.2022	531	1,7	3500	70	26,4	48	50	40
01.02.2022	531	3,7	3200	70	93,5	170	50	10
28.02.2022	535_1	1	6000	70	22,5	41	50	10
28.02.2022	535_2	1	5700	70	19,6	36	50	55
14.03.2022	535_1	0,5	5800	65	9,2	15	50	40
14.03.2022	535_2	1	5700	70	12	21	50	55
21.03.2022	537	1	4300	85	25,7	47	50	55
21.03.2022	535	0,5	5000	70	16,9	31	50	50
21.03.2022	537	1	8800	85	25,7	47	50	55

Tabelle 1: Spermatologische Kennzahlen und gesexte Ejakulate nach Datum und Samenspende

	Kopien/μl					Ratio	
Probe	X	Y	SC	X+Y	SC/(X+Y)	X / Y	
1	2417	2265	4745	4682	1.01	1.07	
2	1864	1767	3659	3631	1.01	1.05	
3	1540	1368	2894	2908	1.00	1.13	
6	1850	1507	3197	3357	0.95	1.23	
7	1581	1679	3359	3260	1.03	0.94	
9	864	877	1737	1741	1.00	0.99	Kontrolle
10	1165	1168	2356	2333	1.01	1.00	Kontrolle
11	483	454	924	937	0.99	1.06	
13	498	368	806	866	0.93	1.35	
14	604	491	1012	1095	0.92	1.23	

Tabelle 2: Sortiererfolg nach PCR von 8 gesexten Ejakulaten und 2 Kontrollen

	Bock	Kopfkappe	Kopf	Schwanz	Summe
29.03.2021	531	42	29	1	72
28.02.2022	535	36	22	12	70
25.01.2022	516	48	44	5	97
21.03.2022	537	46	26	7	79

Tabelle 3: Prozent veränderter Samenzellen nach Sexing und Tiefgefrieren, Färbung nach Kovacs und Foote (1992)

6 Abbildungen

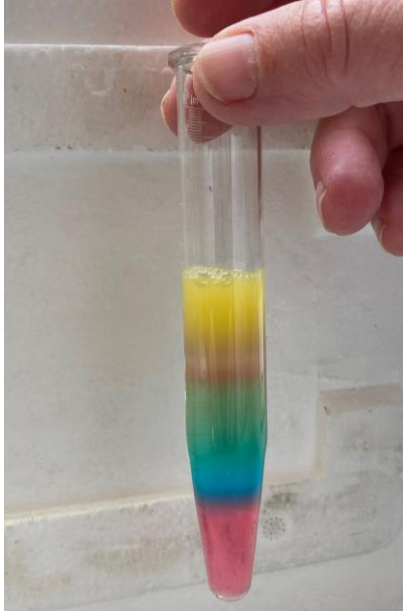


Abbildung 1: Für die DFZ werden 6 farbcodierte ölige Medien übereinander geschichtet. Darüber ist der mit Eidotterverdünner verdünnte Frischsamen zu sehen.

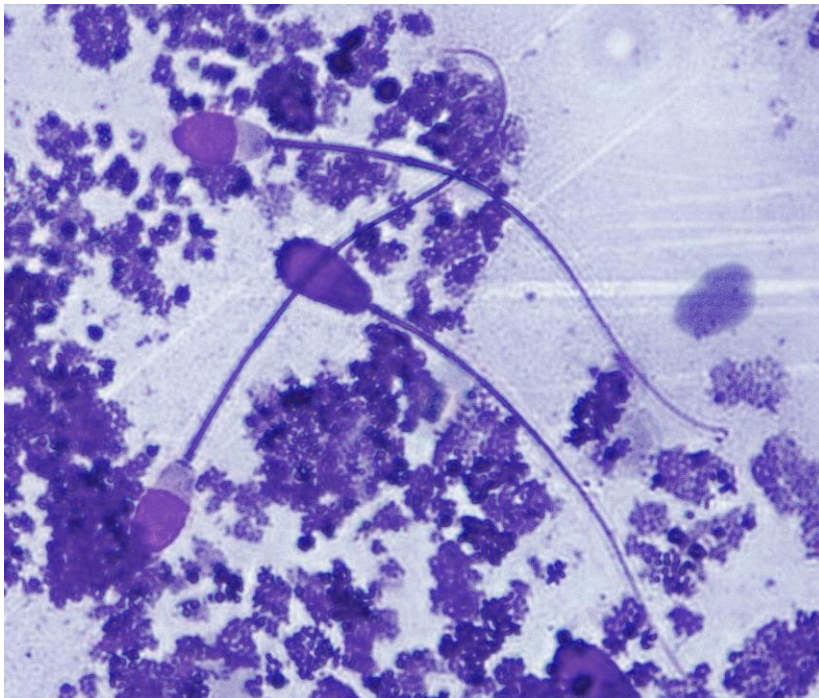


Abbildung 2: In der Lebend-Tot-Färbung erscheinen intakte Kopfkappen kräftig rosa, zerstörte Kopfkappen dunkelviolet, intakte Spermienköpfe hellgrau, tote Spermienköpfe fast schwarz, intakte Schwänze lebhaft rot und tote Schwänze dunkelblau.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Spermatologische Kennzahlen und gesexete Ejakulate nach Datum und Samenspender	11
Tabelle 2: Sortiererfolg nach PCR von 8 gesexten Ejakulaten und 2 Kontrollen	11
Tabelle 3: Prozent veränderter Samenzellen nach Sexing und Tiefgefrieren, Färbung nach Kovacs und Foote (1992)	12

8 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Für die DFZ werden 6 farbcodierte ölige Medien übereinander geschichtet. Darüber ist der mit Eidotterverdünner verdünnte Frischsamen zu sehen. 13
- Abbildung 2: In der Lebend-Tot-Färbung erscheinen intakte Kopfkappen kräftig rosa, zerstörte Kopfkappen dunkelviolet, intakte Spermienköpfe hellgrau, tote Spermienköpfe fast schwarz, intakte Schwänze lebhaft rot und tote Schwänze dunkelblau. 13

9 Literaturverzeichnis

Amann, R. P. (1989). Treatment of sperm to predetermine sex. *Theriogenology* 31, 49-60.

Carvajal, G., Cuello, C., Ruiz, M., Vázquez, J. M., Martínez, E. A., & Roca, J. (2004). Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *Journal of Andrology*, 25(3), 389-396.

Freese, D. (2009). Sperma Sexing in der praktischen Anwendung. *Züchtungskunde*, 81(1), 7–13.

Garner, D., K. Evans, G. Seidel, (2013). Sex-Sorting Sperm Using Flow Cytometry/Cell Sorting. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 927. 279 – 95. 10.1007/978 – 1-62703 – 038-0_26.

Genetica (2021). Validation Study of the Chromatyc Sex Product. Unveröffentlicht.

Gliozzi, T. M., F. Turri, S. Manes, C. Cassinelli, F. Pizzi, (2017). The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, 11(11), 1975-1982.

Kovács, A., R. H. Foote (1992) Viability and Acrosome Staining of Bull, Boar and Rabbit Spermatozoa, *Biotechnic & Histochemistry*, 67:3, 119-124, DOI: 10.3109/10520299209110020

Rahman, A. N. M. A., Ramli, A., & W. K. Embong, (2008). A review of reproductive biotechnologies and their application in goat. *Biotechnology*, 7(2), 371-384.

Rath, D. (2002). Einsatz von gesextem Sperma in Rinderzuchtprogrammen. *Landbauforschung Völkenrode Sonderheft* 242, pp. 37 – 42.

Rodriguez - Martinez, H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. *Reproduction in domestic animals*, 38(4), 312-318.

Schilling, E., D. Thormählen, (1976). Dichtegradientenzentrifugation von Kaninchenspermien und das Geschlechtsverhältnis bei den Nachkommen. *Reprod.Dom.Anim.* Vol. 11, 3, pp.113 – 121.

Abkürzungen

Abk.	Abkürzung
BGBI.	Bundesgesetzblatt
Art.	Artikel
usw.	und so weiter

HBLFA Raumberg-Gumpenstein

Landwirtschaft

Raumberg 38, 8952 Irdning-Donnersbachtal

raumberg-gumpenstein.at