

### 3. Material und Methode

#### 3.1 Tiermaterial

Für die Analyse der auf die Aberrationsfrequenzen wirkenden Einflussfaktoren (Eimasse, Alter bzw. Legephase) wurden zwei Reinzuchtlinien, eine Hahnenlinie (Rhodeländer/Linie A) und eine Hennenlinie (White Rock/Linie D), der Lohmann Tierzucht GmbH verwendet. In der Tabelle 1 sind die betreffenden Linien näher charakterisiert.

**Tabelle 3.1:** Charakteristik der untersuchten Linien, Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (s) für Leistungsmerkmale der Linien A und D (modifiziert nach PREISINGER u. SAVAS, 2000)

Merkmal	Linie A			Linie D		
	$\bar{x}$	s	Legerate	$\bar{x}$	s	Legerate
Eizahl 20.-24. Lebenswoche	15,4	6,0	55	18,2	5,3	65
Eizahl 25.-32. Lebenswoche	53,1	3,3	95	53,6	3,0	96
Eizahl 33.-44. Lebenswoche	79,0	5,0	95	80,2	3,8	95
Eizahl 45.-60. Lebenswoche	91,6	11,6	82	95,3	9,3	85
Eizahl 20.-60. Lebenswoche	239,1	16,4	85	247,3	13,6	88
	$\bar{x}$	s		$\bar{x}$	s	
Körpergewicht (g)	2030	171		1910	162	
Eigewicht (g)	59,6	3,4		57,7	3,3	
Eimasse (g/Tag)	51,2	4,1		51,2	3,7	
Futtermittelverzehr (g)	112,6	10,8		105,8	10,4	
Futtermittelverwertung (g/kg)	455	50		485	49	
Schlupfrate	59,1%* 72,7%**	-		66,2%* 75,5%**	-	

\*: Schlupfrate bezogen auf eingelegte Eier

\*\* : Schlupfrate bezogen auf befruchtete Eier (Test auf Befruchtung = 18. Bruttag)

Von jeder Linie wurden 20 Hennen für die Untersuchung ausgewählt. Die Hennen wurden mit Mischsperma von Hähnen der gleichen Linie zweimal pro Woche (Donnerstag u. Freitag) besamt. Die Eier wurden in der folgenden Woche vom Montag bis Mittwoch, mit Käfignummer, Legedatum und Typ beschriftet, in der Lohmann Tierzucht GmbH Cuxhaven gesammelt, in Valo-Kartons verpackt und in die Brüterei in Merbitz/Halle (Saale) geliefert. Bevor die Eier im Brutschrank eingelegt wurden, wurde das Eigewicht jedes Eies erfasst. Die Eier wurden 3-4 Wochen je Legeabschnitt gesammelt.

Zum Erfassen von eventuellen Transporteinflüssen auf Merkmale frühembryonaler Mortalität und Chromosomenaberrationen wurden auch im Tierzuchtlabor der Lohmann Tierzucht GmbH/Cuxhaven Chromosomenpräparate angefertigt.

Zur Erfassung von Altereinflüssen wurden Embryonen aus drei Abschnitten der Legeperiode zytogenetisch untersucht; Legebeginn (Alter der Hennen (Nachkommen) 20.-23. Lebenswoche für Linie A und 21.-24. Lebenswoche für Linie D), Legemitte (Alter der Hennen 26.-28. Lebenswoche) und Legeende (Alter der Hennen 61.-65. Lebenswoche).

Für die Analyse wurden neben den zytogenetischen Parametern folgende Merkmale erfaßt:

- 1) Anzahl Eier je untersuchte Henne,
- 2) Anzahl unbefruchteter Eier-UB (Eier, die nach 72 Brutstunden keine Merkmale einer Befruchtung aufwiesen; Durchmesser der unbefruchteten Keimscheibe ist ca. 1,5 mm),
- 3) Anzahl Eier mit frühabgestorbenen Embryonen-FA (Embryonen, die nach 72 Brutstunden als tot identifiziert wurden; Bestimmung erfolgte durch Präpariermikroskop),
- 4) Anzahl unterentwickelter Embryonen-UE (Embryonen, die nach 72 Brutstunden eine deutliche Entwicklungsretardierung zeigten; dazu zählen auch jene Fälle, wo im Zentrum der Keimscheibe lediglich ein undifferenziertes Epithel unterschiedlicher Größe und Form ohne erkennbaren Embryo vorliegt; darunter können sich auch bereits abgestorbene Stadien befinden),
- 5) Eigewicht (g) vor Einlage in den Brüter.

## **3.2 Methode**

### **3.2.1 Chromosomenpräparation**

Die Anfertigung der Chromosomenpräparate erfolgt unter Verwendung des Gesamtembryos nach einer modifizierten Methode, die bei relativ geringem Zeitaufwand die Analyse größerer Individuenzahlen gestattet (VAGT u. SAAR, 1986; VAGT, 1987).

- 1) Bebrütungsdauer: 72 Stunden in einem Brutschrank bei 38 °C
- 2) Colchizinhandlung:
  - a) Entnahme der Eier aus dem Brutschrank, Öffnung der Schalen kleinflächig über den Embryonen und Kontrolle des Bebrütungszustandes unter dem Auflichtmikroskop,

b) Beimpfung der Embryonen mit je 0,1 ml einer 0,005%igen Colchizinlösung; Verschuß der geöffneten Stelle mit einer selbstklebenden Folie, Inkubation der Eier für eine Stunde in einem Wärmeschrank bei 38°C.

3) Embryonengewinnung:

a) Präparation der Embryonen mit anhaftender Keimscheibe unter dem Auflichtmikroskop mittels Schere,

b) Übertragung der Embryonen mittels Pipette in ein mit 2 ml Hank`s-Lösung gefülltes schwarzes Blockschälchen; Spülung der Embryonen und Entfernung von Dotterresten.

4) Hypotonie:

a) Austausch der Hank`s-Lösung gegen 2 ml Hypotonikum (FKS : Aqua dest. = 1:5; 38°C),

b) 25minütige Inkubation bei 38°C im Wärmeschrank.

5) Fixierung:

a) Absaugen des Hypotonikums und Zugabe von 2ml Fixativ (Eisessig : Methanol = 1:3; 0°C); Abdecken der Blockschälchen, um eine Verdunstung des Fixatives zu unterbinden,

b) Dauer: mindestens 45 Minuten bei 4°C, 1x Wechsel des Fixativs

6) Anfertigung der Präparate:

a) Entfernung des Fixatives; Trennung der Keimscheibenreste von den Embryonen unter dem Auflichtmikroskop mit Lanzettnadeln,

b) Überführung der Embryonen in ein Röhrchen mit frischem Fixiermittel,

c) Zerkleinerung der Embryonen und Homogenisierung mit einer Pipette,

d) Auftropfen der Suspension aus einer Höhe von etwa 8-10 cm auf entfettete und eisgekühlte Objektträger und Lufttrocknung der Präparate bei Zimmertemperatur.

7) Färbung der Präparate mit Giemsa-Lösung:

a) Die Giemsa-Lösung setzt sich zusammen aus 94 ml Aqua dest., 3ml Sörensen-Phosphatpuffer 1/15 M, pH 6,7 und 3ml Giemsa-Stammlösung (250 mg MERCK, 13,5 ml Glycerin, 21,0 ml Methanol).

b) Die Färbedauer der angefertigten Präparate betrug ca. 12 min bei Zimmertemperatur und anschließender Lufttrocknung der Präparate.

### **3.2.2 Auswertung der Präparate**

Die Auswertung der Präparate wurde an einem Mikroskop BH-2 (Olympus) durchgeführt. Die Analyse der giemsaefärbten Metaphaseplatten zur Erkennung von Aberrationen erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung.

Je Embryo wurden 20 einzeln liegende Metaphasen beurteilt. In die Beurteilung wurden die Makrochromosomen bis zum Paar Nr. 8 einschließlich der Geschlechtschromosomen einbezogen.

Auftretende Aberrationen wurden anerkannt, wenn euploide Abweichungen (Haploidie, Triploidie oder Tetraploidie) mindestens einmal und aneuploide Veränderungen (Monosomie, Trisomie oder Tetrasomie) in mindestens 3-facher Wiederholung je Embryo auftraten.

### **3.2.3 Statistische Analyse**

Für die Aufbereitung der zytogenetischen und Reproduktionsdaten wurden die Programme MS-Excel 7.0 und SAS 6.12 (SAS INSTITUT, 1990) für Windows genutzt.

Die Aberrationsfrequenz ergibt sich als prozentualer Anteil gefundener aberranter Embryonen an der Gesamtzahl der analysierten Embryonen.

Die statistische Prüfung beim Vergleich von Aberrationsfrequenzen, frühembryonaler Mortalität oder unbefruchteter Eier zwischen den Linien und Legeabschnitten erfolgte mit dem  $\chi^2$  Test und Fischers Exaktem Test (Bedingung für  $\chi^2$  Test nicht erfüllt). Für alle statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit ( $\alpha$ ) von 5% angenommen.