

Statens Husdyrbrugsforsøg



Embryoteknologi og husdyravl



De afgeleide van $\ln(x)$ is $\frac{1}{x}$. Dus $\frac{d}{dx} \ln(x) = \frac{1}{x}$. Dit kan ook afgeleid worden uit de definitie van de afgeleide:

$$\frac{d}{dx} \ln(x) = \lim_{h \rightarrow 0} \frac{\ln(x+h) - \ln(x)}{h}$$

Gebruikmakend van de logaritme-eigenschap $\ln(a) - \ln(b) = \ln\left(\frac{a}{b}\right)$, wordt dit:

$$\lim_{h \rightarrow 0} \frac{\ln\left(\frac{x+h}{x}\right)}{h} = \lim_{h \rightarrow 0} \frac{\ln\left(1 + \frac{h}{x}\right)}{h}$$

Stel $u = \frac{h}{x}$, dan $h = xu$ en $u \rightarrow 0$ als $h \rightarrow 0$. Dus:

$$\lim_{u \rightarrow 0} \frac{\ln(1+u)}{xu} = \frac{1}{x} \lim_{u \rightarrow 0} \frac{\ln(1+u)}{u}$$

De laatste limiet is een standaardlimiet die gelijk is aan 1. Dus:

$$\frac{d}{dx} \ln(x) = \frac{1}{x}$$

Dit is de afgeleide van de natuurlijke logaritme.

717

30 NOV. 1992

Beretning

Foulum 1992

STATENS HUSDYRBRUGSFORSØG

Foulum, Postboks 39, 8830 Tjele. Telf.: 89 99 19 00. Fax: 89 99 19 19

Statens Husdyrbrugsforsøg, oprettet 1883, er en institution under Landbrugsministeriet.

Statens Husdyrbrugsforsøg har til formål at gennemføre forskning og forsøg og opbygge viden af betydning for erhvervsmæssig husdyrbrug i Danmark og bidrage til en hurtig og sikker formidling af resultater til brugerne.

Der skal i forsknings- og forsøgsarbejdet lægges vægt på ressourceudnyttelse, miljø og dyrevelfærd samt husdyrprodukternes kvalitet og konkurrenceevne.

Abonnement på Statens Husdyrbrugsforsøgs Beretninger og Meddelelser kan tegnes ved direkte henvendelse til Statens Husdyrbrugsforsøg på ovenstående adresse.

Der er følgende afdelinger:

Dyrefysiologi og Biokemi
Forsøg med Kvæg og Får
Forsøg med Svin og Heste
Administration

Forsøg med Fjerkræ og Kaniner
Forsøg med Pelsdyr
Centrallaboratorium
Landbrugsdrift

NATIONAL INSTITUTE OF ANIMAL SCIENCE

**Foulum, P.O. Box 39, DK-8830 Tjele
Tel: +45 89 99 19 00. Fax: +45 89 99 19 19**

The National Institute of Animal Science was founded in 1883 and is a governmental research institute under the Ministry of Agriculture.

The aim of the institute is to carry out research and accumulate knowledge of importance to Danish animal husbandry and contribute to an efficient implementation of the results to the producers.

The research work puts emphasis on utilization of resources, environment and animal welfare and on the quality and competitiveness of the agricultural products.

For subscription to reports and other publications please apply direct to the above address.

The institute consists of the below departments:

Animal Physiology and Biochemistry
Research in Cattle and Sheep
Research in Pigs and Horses
Administration

Research in Poultry and Rabbits
Research in Fur Animals
Central Laboratory
Farm Management & Services

717

Beretning fra Statens Husdyrbrugsforsøg

Report from the National Institute of Animal Science, Denmark

T. Liboriussen, B. Bech Andersen og L. Gjøl Christensen
Afd. for Forsøg med Kvæg og Får, Statens Husdyrbrugs-
forsøg

H. Callesen, S. Smith og T. Greve
Sektion for Reproduktion, Den Kgl. Veterinær- og Land-
bohøjskole

Embryoteknologi og husdyravl

Foulum 1992

Manuskriptet afleveret oktober 1992

Trykt i Frederiksberg Bogtrykkeri a/s 1992

FORORD

Embryoteknologi er i dag en etableret del af dansk husdyrbrug, især i form af ægtransplantation hos kvæg, hvor også dybfrysning af embryoner indgår. Forskningen inden for embryoteknologi har vist nye muligheder for at påvirke reproduktionsprocessen hos pattedyr. Her tænkes på in vitro udvikling, deling, kønsbestemmelse og senest kloning.

I udlandet er der gjort flere tiltag for at udvikle teknikker på disse områder til et niveau, der gør deres anvendelse i avlsarbejdet muligt. I denne rapport er der dels givet en teknisk vurdering af de embryoteknikker, der i dag har størst interesse for husdyrbruget, og dels en vurdering af deres potentielle betydning for kvægbruget.

Arbejdet er bestilt og delvist finansieret af Dansk Udviklingsfinansiering A/S, som hermed takkes for sin aktive rolle og sin økonomiske støtte. Rapporten er udarbejdet i et snævert samarbejde mellem Statens Husdyrbrugsforsøg og Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole og med værdifulde diskussioner med Landskontoret for Kvæg. Alle implicerede takkes hermed for deres indsats.

Oktober 1992

Statens Husdyrbrugsforsøg
Afd. for Forsøg med Kvæg og Får

A. Neimann-Sørensen

INDHOLDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	6
EMBRYOTEKNOLOGI - EN TEKNISK OVERSIGT	7
Ægget - beskrivelse og definitioner	7
De enkelte teknikker	8
1. Produktion af embryoner	8
1.1. Superovulation	8
1.2. In vitro udvikling	10
1.3. Metoder til opsamling af oocytter	13
2. Kønsbestemmelse af sædceller og embryoner	14
2.1. Kønsbestemmelse af sædceller	14
2.2. Kønsbestemmelse af embryoner	15
3. Mangfoldiggørelse af embryoner	17
3.1. Deling af embryoner	17
3.2. Kernetransplantation	19
3.3. Embryonale stamceller	21
4. Frysning af sædceller, oocytter og embryoner	23
4.1. Sædceller	23
4.2. Oocytter	23
4.3. Embryoner	24
5. Genoverførsel til embryoner	25
Konklusion	26
Litteraturliste	27
EMBRYOTEKNOLOGI - ANVENDELSESMULIGHEDER	29
Avlsmæssig betydning	30
1. MOET avlsprogrammer	30
2. Produktion af embryoner	32
3. Kønsspecifikke embryoner	33
4. Genetisk identiske embryoner	33
4.1. Deling af embryoner	34
4.2. Kernetransplantation ("kloning")	34
5. Effekt af gen-teknologi	39

5.1. Genotypning af embryoner	39
5.2. Gen-overførsel	39
Produktion af brugsdyr	39
1. Malkekvægbesætninger	40
2. Kødkvægbesætninger	40
Konklusion	41
Litteraturliste	42

SAMMENDRAG

I det følgende findes en biologisk-teknisk fremstilling og vurdering af embryoteknologi hos vore store husdyr. Samtidig er der givet en avlsmæssig vurdering af denne teknologi.

Den tekniske gennemgang viser, at de biologiske muligheder for in vitro produktion af kønsspecifikke og klonede embryoner er til stede. En betydelig forskningsindsats vil imidlertid være nødvendig for at opnå en teknisk effektivitet, der gør det realistisk at tale om praktisk anvendelse.

Fleere af teknikkerne har store avlsmæssige perspektiver. Forøget produktion af embryoner fra avlsmæssigt overlegne hundyr vil således kunne øge effektiviteten af MOET-avlsprogrammer for kvæg betydeligt, og kønsspecifikke embryoner vil, specielt inden for kvægbruget, kunne give betydelige driftsøkonomiske fordele. Fremstilling af klonede embryoner vil både give store avlsmæssige og driftsøkonomiske fordele. Desuden er mulighederne for at udnytte den hastigt øgende viden om husdyrenes genotyper og de enkelte geners betydning for husdyrenes produktionsevne nøje knyttet til udviklingen af embryoteknologien.

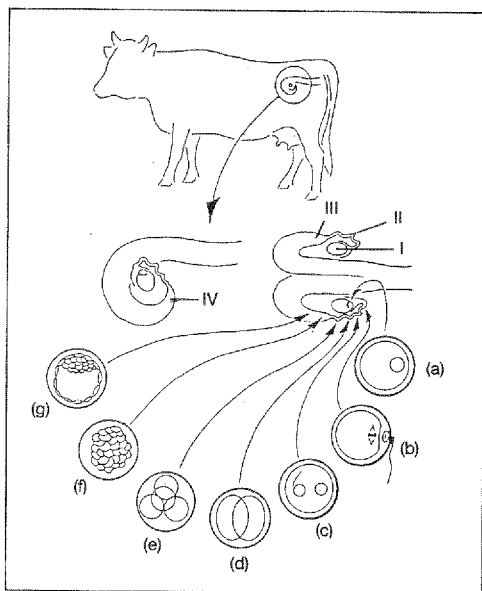
Forskning i embryoteknologi er således et område, hvor der kan forventes gjort betydelige fremskridt i retning af praktisk anvendelighed inden for de nærmeste år, og det er samtidig et område med store forskningsmæssige udfordringer. Det er desuden en forskning, som har stor relevans for landbrugserhvervet, specielt kvægbruget, og dermed det danske samfund.

EMBRYOTEKNOLOGI - EN TEKNISK OVERSIGT

Formålet med dette afsnit er at give et rimelig let tilgængeligt indtryk af eksisterende embryoteknikker, deres status og udviklingsmuligheder. Beskrivelsen vedrører i særlig grad kvæg, men for hver teknik gives der også en kortfattet beskrivelse af status og særlige forhold for de øvrige husdyr. Indledningsvis gives en beskrivelse af de definitioner, der er anset for nødvendige for en så korrekt beskrivelse af teknikkerne som mulig.

Ægget - beskrivelse og definitioner

I embryoteknologien indgår flere udviklingstrin af æg, som i det efterfølgende kort skal defineres og beskrives (jfr. Figur 1).



Figur 1: De forskellige udviklingsstadier af æg hos kvæg. I: æggestok; II: æggeleder; III og IV: livmoder. (a) oocyt, (b) befrugtningen, (c) forkernestadium, (d) 2-celle, (e) 4-celle, (f) morula (brombærstadium), (g) blastocyst (blærestadium) (fra Greve, 1990).

Oocyt (ovum): Den hunlige kønscelle, det ubefrugtede æg, som indeholder de hunlige kromosomer. Æggestokken indeholder tusinder af oocyter, og igennem hver brunstcyklus vil kun nogle få modnes i ægblærer (follikler), og én eller flere vil blive frigjort (ovuleres) og optages af æggelederen i koens brunst. Det er i æggelederen, at befrugtningen af oocyten med sædcellen foregår.

Embryon: Det befrugtede æg, som indeholder både de hunlige og de hanlige kromosomer. Under embryonets udvikling ændres dets udseende, idet dets celler bliver flere og samtidig mere specialiserede.

Det tidlige embryon (1- til 8-celle stadiet) vokser ved delinger af cellerne i de første dage, uden at dets samlede størrelse øges. Dette stadium findes i æggelederen.

Det efterfølgende embryo-stadium indeholder fra omkring 16 til 64 celler, som bliver tættere forbundne, da de klumper sig sammen (kompakterer) og fremstår som et brombær (morula). Stadiet findes i koens livmoder omkring 4-5 dage efter befrugtning.

I embryonet fortsætter cellernes deling, og der begynder på blastocyst-stadiet at samles væske i dets indre. Cellerne adskilles i to hovedtyper - dem, der danner fosterhinderne (trofo-blast), og dem, der danner selve fosteret (embryo-blast). Embryonets samlede størrelse begynder på dette udviklingstrin at øges meget, og omkring på 8. dagen efter befrugtning vil det klækkes fra den "æggeskal" (zona pellucida), der hidtil har omgivet hele embryonet. I praksis betegnes embryoner ofte som "æg" op til dette udviklingstrin.

De enkelte teknikker

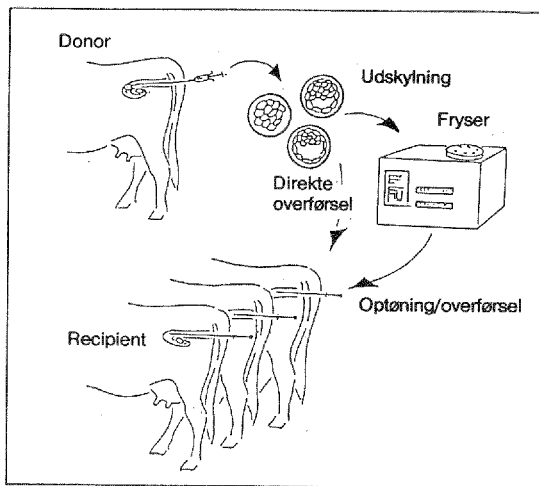
1. Produktion af embryoner

1.1. Superovulation

Med superovulation forstås en hormonbehandling, der har som formål at stimulere koens æggestokke til at producere befrugtningssduelige oocyter i et antal, der er højere end den ene, der normalt løsnes hos kvæg hver 21. dag. Hertil anvendes oftest ét af to typer hormon-præparat, der begge gives fra omkring 8-12 dage, efter at koen har været i brunst. To-tre dage efter at hormonbehandlingen er indledt, gives et prostaglandinpræparat for at fremkalde brunst, som herefter optræder to-tre dage senere. Inseminering foretages da 1-2 gange, og herefter dannes og udvikles embryonerne.

Embryonerne opsamles fra koen (donoren) normalt 6-8 dage efter den første inseminering, og hertil bruges en ikke-kirurgisk udskylning af livmoderen (Figur 2). Ved denne procedure udskylles hvert livmoderhorn med et særligt næringsmedium, som efter at have været inde i livmoderen opsamles i en beholder. Embryonerne vil følge med næringsmediet ved

udskylningen, og de isoleres derfra i den opsamlende væske under stereomikroskopisk overvågning ved hjælp af en pipette. Herefter kan embryonerne forberedes til transplantation til en recipient eller til frysning og opbevaring i flydende kvælstof ved -196°C (afsnit 4.3).



Figur 2: Grundpillen i embryoteknologi hos kvæg: opsamling af embryoner fra en superovuleret donor samt transplantation til recipient enten direkte eller efter frysning/optøning (fra Greve, 1990).

Ved transplantation til en recipient - enten direkte eller efter frysning/optøning - suges embryonet op i et plastikstrå (insemineringsstrå), der anbringes i et særligt transplantations-instrument. Efter forberedelse af recipienten føres instrumentet frem til spidsen af et af livmoderhornene, hvor embryonet deponeres.

Status. Superovulation og ægtransplantation er rutineteknikker, der anvendes i stort omfang. I Europa er der i 1991 således foretaget opsamling af ca. 125.000 embryoner fra ca. 25.000 donorkøer og -kvier. Superovulationen er dog stadig kendetegnet ved en betragtelig biologisk variation. Gennemsnitsresultaterne er som følger: af superovulerede donorer vil 10-15% ikke egne sig til skylning pga. manglende eller uheldig reaktion på superovulationsbehandlingen; ved skylning vil der opsamles omkring 8-10 æg pr. superovuleret donor, og heraf vil 6-7 være embryoner, der egner sig til transplantation. Dette tal varierer fra 0 til 25, og der er beskrevet endnu større tal, der dog hører til undtagelsen. Drægtighedsprocenterne for recipienterne efter transplantation af embryoner er normalt fra 50-60%, og der kan således i gennemsnit fås 3-4 kalve efter superovulation af én donor.

Forudsat at det foregår under dertil indrettede forhold, kan én rutineret dyrlæge med én medhjælper gennemføre skylning og isolering af embryoner fra én donor på omkring 1 time. Transplantationerne kræver ca. 10-15 minutter pr. recipient.

Ressourcer. Superovulation og ægtransplantation kan udføres af en enkelt dyrlæge som en ambulant behandling, dvs. i stalden hvor koen normalt opholder sig. Af særligt udstyr kræves instrumenter til udskylning af embryoner og til transplantation til recipienter, stereomikroskop og endvidere en cellefryser, såfremt embryonerne skal nedfryses (afsnit 4.3).

Forventninger. Resultaterne af superovulation og ægtransplantation har i dag nået et tilfredsstillende niveau, selv om de som nævnt er underlagt en betydelig og uforudsigelig variation med hensyn til donorens reaktion på superovulation. Der kan dog forventes forbedringer på dette område, således at der kan opnås et mere ensartet resultat hvad angår både antal og kvalitet af embryoner fra en enkelt skylning af en donor. Det gennemsnitlige antal embryoner pr. donor skal dog ikke ventes at øges særligt, ligesom variationen ikke vil kunne undgås - men den vil dog kunne formindskes.

Andre husdyr. **Får og ged:** teknikken fungerer rutinemæssigt med resultater og problemer nogenlunde som for kvægets vedkommende. En meget væsentlig forskel er dog, at både skylning og transplantation for begge disse dyrearter normalt kræver kirurgiske indgreb. Der findes ikke længere så udtalt en variation i reaktionen på superovulation hos gederne.

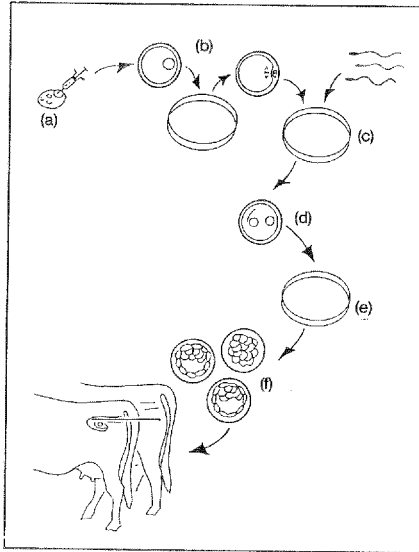
Svin: superovulation fungerer ikke tilfredsstillende, men da svinet i sig selv producerer mange oocytter ved ægløsning, kan der sikkert ikke opnås flere embryoner ved hormonbehandling. Derimod fungerer opsamling, håndtering og transplantation af embryoner rutinemæssigt og med gode resultater. Opsamling og transplantation skal dog foretages ved kirurgiske indgreb.

Hest: superovulation af hopper har ikke givet tilfredsstillende resultater blandt andet på grund af anatomiske og fysiologiske forhold. Udskylning af det ene æg, der normalt frigøres i brunsten, fungerer rutinemæssigt, hvorimod ikke-kirurgisk transplantation til recipienter giver lave drægtighedsprocenter (25-30%) i forhold til resultaterne fra kvæg.

1.2. In vitro udvikling

Ved in vitro udvikling er formålet at producere et stort antal embryoner i laboratoriet (in vitro), og den består af tre særskilte processer: (a) in vitro modning af oocytter, (b) in vitro befrugtning af modne oocytter med sædceller samt (c) in vitro dyrkning af embryoner frem til udviklingsstadier, der kan transplanteres ikke-kirurgisk til recipienter eller nedfryses. Der henvises hyppigt til disse tre processer med forkortelserne IVM (in vitro maturation), IVF

(in vitro fertilization) og IVC (in vitro culture), og under ét IVP (in vitro production) (jfr. Figur 3).



Figur 3: Skematisk fremstilling af in vitro udvikling af embryoner hos kvæg. Oocytter udsuges fra æggestokke (a). Oocytten (b) modnes og befrugtes in vitro (c) og efter ca. 12-18 timer udvikles forkernestadiet (d), som ved yderligere dyrkning (e) i 5 dage udvikler sig til morula- og blastocyst-stadier (f) (fra Greve, 1990).

In vitro modning: Oocytter opsamles som beskrevet i afsnit 1.3. Under stereomikroskop udvælges oocytter af god kvalitet, og grupper af disse oocytter modnes ved dyrkning i 24-26 timer i dråber af modningsmedium under kontrollerede betingelser (39°C, 5% CO₂, vandmættet luftatmosfære). En stor del af disse modnede oocytter er herefter i stand til at blive befrugtet.

In vitro befrugtning: Frisk eller frosset/optøet sæd (afsnit 4.1) anvendes med lige gode resultater. En lille mængde sædopløsning med udvalgte, bevægelige sædceller tilsættes dråber af befrugtningsmedium, hvori modnede oocytter befinder sig. I løbet af en dyrkningsperiode på 18-20 timer under kontrollerede betingelser (39°C, 5% CO₂, vandmættet luftatmosfære) befrugtes en del af oocysterne, og der dannes embryoner på 1-2 cellestadiet.

In vitro dyrkning: Embryonerne dyrkes videre under kontrollerede betingelser i et dyrkningsmedium, der kan være tilsat en opløsning af celler fra æggeledere, og embryonerne udvikler sig til blastocyststadiet i løbet af 5-7 dage.

Status. Teknikken kan karakteriseres som en velfungerende teknik på laboratorieplan, og den anvendes i stort omfang verden over. Antallet af embryoner, der udvikler sig til blastocyst-stadiet, er i et velfungerende in vitro udviklingssystem i bedste fald som følger: in vitro modning 80%, in vitro befrugtning 80-90% og in vitro dyrkning 30-40%, hvilket giver en samlet udviklingsrate på 25 blastocyster ud fra 100 oocytter udvalgt til modning. Disse tal er dog genstand for en vis variation. Drægtighedsraten efter transplantation af in vitro udviklede embryoner er omkring 40% og er meget lavere, hvis embryonerne først fryses (afsnit 4.3).

I betragtning af, at der kan behandles hundredvis af oocytter i samme arbejdsangang, kan in vitro udvikling blive en relativt billig og effektiv teknik til produktion af embryoner. Ydermere er mængden af sæd til befrugtningen begrænset, hvilket kan være fordelagtigt i tilfælde af særlig værdifuld sæd; ligeledes kan sædvalget ske i forbindelse med befrugtningen, hvilket giver mulighed for at anvende sæd fra forskellige tyre til oocytter fra samme donor.

Forudsat at der ikke skal bruges tid på indsamling af æggestokke, kan to personer gennemføre den samlede in vitro udviklingsprocedure med mindst 500 oocytter pr. uge.

Ressourcer. Et embryonalt in vitro udviklingslaboratorium er i princippet et celledyrkningslaboratorium med mikroskoper, inkubatorer, sterilbænke, vandbade, centrifuger og celledrysere som væsentligt udstyr. Laboratoriet skal ledes af en person, som har viden og erfaring vedrørende celledyrkning og embryonaludvikling, og som må assisteres af veltrænede og rutinerede teknikere.

Forventninger. Inden for få år kan det ventes, at in vitro produktion af embryoner bliver en så velfungerende teknik, at den kan anses som et alternativ eller supplement til superovulation i forbindelse med produktion af embryoner. Der resterer dog endnu løsning af problemerne omkring de lidt lave udviklingsrater til blastocyster, ligesom overlevelsen efter frysning af embryonerne fortsat er et væsentligt og endnu ikke løst problem. In vitro udvikling vil fortsat være en udpræget laboratorietechnik, og der vil stadig være en vis variation i produktionens forskellige led.

Andre dyrearter. In vitro udvikling af æg fra får, ged, svin og hest er gennemført med fødsel af normalt, levedygtigt afkom. Udviklingen er dog tidsmæssigt nogle år efter kvæg, men med de hidtidige erfaringer vil der inden for de kommende 4-5 år være velfungerende in vitro systemer for andre husdyrarter, særlig svin og får. For svinets vedkommende vil der dog være særlige problemer at løse, idet både æg og sædceller fra denne dyreart synes at tåle frysning dårligere end lignende celler fra de andre husdyr.

1.3. Metoder til opsamling af oocytter

Hos kvæg kan oocysterne findes enten i æggestokken eller i æggelederen lige efter ægløsningen og kan i princippet opsamles fra dyrene enten før eller efter deres slagtning.

Opsamling fra slagtede dyr: Æggestokkene opsamles inden for 20-30 minutter efter dyrets slagtning og transporteres til laboratoriet, hvortil de skal ankomme højst 3-4 timer efter slagtningen.

I æggestokken findes oocysterne i follikler, hvorfra de kan udsuges fra overfladen af æggestokken med kanyle og sprøjte. Ved denne metode kan der pr. æggestok opsamles omkring 8-9 oocyster af god kvalitet. En anden metode består i at snitte overfladen af æggestokken med et skarpt skalpel- eller barberblad for at opsamle oocyster fra både overfladiske og dybtliggende follikler. Herved kan der fås omkring 10-12 oocyster pr. æggestok. Oocyster opsamlet fra follikler, der er 2-8 mm i diameter, skal modnes, inden befrugtning kan finde sted (afsnit 1.2).

Hvis det er ønskeligt at opsamle allerede modnede oocyster fra køer, kan køerne behandles med hormoner, der fremkalder først superovulation og siden brunst (afsnit 1.1). Fra 24-48 timer efter starten af brunsten gennemskylles æggelederne med næringsmedium, hvorfra modne oocyster kan isoleres. Denne proces kan ske efter slagtning af dyret eller ved et operativt indgreb på det levende dyr, og fra ét dyr kan opsamles omkring 10 modne oocyster, forudsat at der har været et tilfredsstillende superovulationssvar (afsnit 1.1).

Opsamling fra levende dyr: Oocyster kan udsuges fra æggestokkene i det levende, ubehandlede dyr med hjælp fra et ultralydsapparat, der føres ind i koens skede. Herved synliggøres folliklerne i æggestokkene, og en nål kan føres gennem skedevæggen og ind i folliklen, hvorfra oocysten udsuges. Dette kan ske gentagne gange i samme brunstcyklus, og indledende forsøg har vist, at der kan opsamles 15 oocyster pr. dyr pr. cyklus. Opsamlingen kan endvidere gentages på samme dyr over flere cykli, sandsynligvis uden negative virkninger på dyrets forplantningsevne. De opsamlede oocyster er umodne og skal derefter indgå i in vitro systemet med henblik på modning og befrugtning (afsnit 1.2).

Status. Opsamling af oocyster fra slagtede dyr er en nem, billig og hurtig metode, og det er den hyppigst anvendte metode. Da den kræver, at dyret slages, vil den ikke være anvendelig i alle tilfælde. Opsamlingsmetoden af oocyster fra det levende dyr med brug af ultralyd har derfor fået stor opmærksomhed. Metoden er stadig under udvikling, men fungerer nogle få steder i Holland, Tyskland og USA/Canada. Metoden fungerer ikke under staldforhold, bla. fordi oocysterne skal videreudvikles in vitro snarest muligt efter udsugning.

Ressourcer. Opsamling efter **slagtning** kræver en transportbeholder, hvori temperaturen kan bevares relativt konstant, indtil æggestokkene når laboratoriet. Til at foretage selve ind-

samlingen af æggestokkene på slagteriet kræves en person, der med omhu kan sørge for, at det sker hurtigt, og at temperaturbetingelserne overholdes præcist.

Ved udsugning af oocytter fra **levende dyr** kræves et ultralydsapparat med en særlig aspirationsenhed og specielle nåle, ligesom der skal være en særlig boks til at placere og fikserer dyrene under udsugningen. Til at betjene udstyret kræves et hold på to-tre personer, der skal have stor rutine i gynækologisk diagnostik og i betjening af ultralydsudstyr.

Forventninger. Opsamling af oocytter vil i de kommende år få stadig større omfang som grundlag for in vitro produktion. Adgang til tilstrækkelige mængder af æggestokke på slagteri vil derfor kunne blive et problem i takt med et faldende antal slagtninger og pga. geografiske forhold. Ultralydsovervåget udsugning vil om få år nok være en metode, der kan fungere så pålideligt, at den vil kunne få stor udbredelse. Den kræver som nævnt at blive udført i umiddelbar nærhed af et in vitro laboratorium til behandling af de udsugede oocytter, men kan til gengæld bruges til det enkelte, udvalgte dyr.

Andre husdyr. Opsamling efter slagtning er mulig for alle andre husdyr. Teknikken til udsugning fra det levende dyr er også anvendt på hopper, men særlige biologiske forhold forhindrer, at der opnås tilfredsstillende genfindelsesresultater.

2. Kønsbestemmelse af sædceller og embryoner

Kønnet af et individ bestemmes af sædcellen, der enten bærer det hanlige (Y) eller det hunlige (X) kønskromosom. Kønsbestemmelsen af embryoner kan derfor foretages **før** befrugtning (ved at bruge kønsbestemt sæd) eller **efter** befrugtning (ved at bestemme embryonets køn).

2.1. Kønsbestemmelse af sædceller

Sædceller (X- eller Y-bærende) adskiller sig vægtnæssigt med hensyn til DNA-indholdet med lidt under 4%, hvilket kan udnyttes til en adskillelse ved en fluorescensfarvning af sædcellerne og en efterfølgende passage gennem et elektrisk ladet felt i et flowcytometer. Heri passerer hver enkelt sædcelle forbi en laserdetektor, der "vejer" cellen og afhængigt af resultatet lader cellen passere til én af to mulige sider. Herved kan der opnås en adskillelse på omkring 85% i både X- og Y-fraktionen. Metodens kapacitet er stadig begrænset, idet der pr. time kun kan adskilles omkring 200.000 sædceller. Ydermere er levedygtigheden og bevægeligheden af de separerede sædceller noget forringet. Denne sorteringsmetode kan derfor ikke anvendes til sortering af sædceller med henblik på brug til almindelig inseminering, men henvender sig til systemer in vitro, hvor befrugtningen kan ske ved brug af meget færre sædceller.

Status. Teknikken er af de nævnte grunde på et plan, hvor den rent forskningsmæssigt fungerer rimeligt både på kvæg og svin, men på grund af den begrænsede kapacitet er metoden endnu ikke umiddelbart anvendelig. En kalv og en del grise er dog født efter denne metode.

Ressourcer. Det væsentligste udstyr er et kostbart flowcytometer, ligesom der kræves gode laboratoriefaciliteter. Endvidere kræves der ret avancerede EDB-faciliteter i forbindelse med flowcytometret, og til at udføre teknikken kræves mindst to-tre personer.

Forventninger. Der er meget store forventninger til, at teknikken kan forbedres til et niveau, hvor der kan produceres sædceller af rimelig levedygtighed. Der regnes således med en 5-10 gange større kapacitet end den nævnte. Sikkerheden ved sorteringen (4 ud af 5 fødte kalve af forventet køn) ventes dog ikke at blive øget.

Andre husdyr. Intet ud over det nævnte for svin.

2.2. Kønsbestemmelse af embryoner

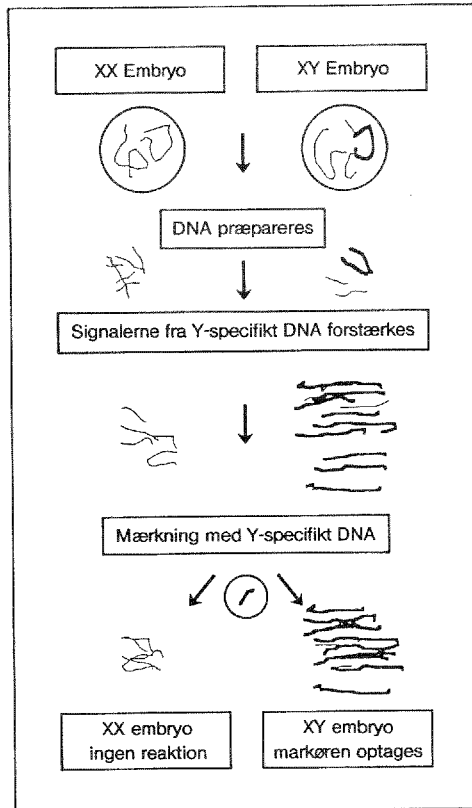
Hver celle i kroppen af et dyr indeholder et bestemt antal kromosomer, der hver består af et bestemt antal gener. To af kromosomerne benævnes kønskromosomer (X og Y). I samme dyr er sammensætningen af kromosomer og gener præcis den samme i alle dets celler lige fra dyret er skabt - dvs. fra embryonstadiet.

Et gen indeholder en bestemt kode (i form af DNA), og hvert gen har en bestemt placering på kromosomet i dyrets celler. Alt kvæg har de samme gener, der dog findes i forskellige former. Genotypning er en metode til at konstatere, om de forskellige former for et gen er til stede eller ej, og ved at udtage få celler fra et embryo og genotype dem er det således muligt at få oplysning om dets gensammensætning (genkortlægning). Da kønnet af et individ afgøres af, om bestemte gener på Y-kønskromosomet er til stede, kan man altså afgøre dyrets køn ved genotypning af celler fra embryonet. Den første betingelse er kendskab til placeringen af generne på Y-kønskromosomet. Dernæst skal de dele af kromosomet, der omgiver generne af interesse, bestemmes med hensyn til deres præcise opbygning, således at der kan laves præcise kopier heraf (Y-specifikke primere).

Selve metoden udføres således (jfr. Figur 4): Først skæres et lille hul i æggeskallen med en særlig mikrokniv. Derefter føres et lille "sugerør" - en mikropipette - gennem hullet, og ganske få celler (ca. 5-10) udsuges fra embryonet. Fra disse celler isoleres DNA, som blandes med de relevante kopistykker (Y-specifikke primere). Hvis genet af interesse er til stede i DNA prøven, vil primerne hæfte sig til det. Derefter gennemføres en såkaldt polymerase chain reaction (PCR), hvorved den del, hvor primerne kan have sat sig, kopieres

et stort antal gange, hvorved de kan gøres synlige ved enkel gel-elektroforese. Fremkommer der herved et signal, har genet for hankøn altså været i cellerne - embryoet er en han; er der ikke noget signal, har genet ikke været der - embryoet er en hun.

Hele denne proces kan gennemføres på 4-5 timer.



Figur 4: Skematisk fremstilling af kønsbestemmelse af æg (fra Greve, 1990).

Status. Embryonerne, hvorfra celleprøven er udtaget, overlever normalt denne behandling, men en lille reduktion i overlevelseschancerne er set, såfremt embryonerne fryses efter udtagningen af celleprøven (i størrelsesordenen 10 procentenheder). Svaret efter PCR fås i tæt ved 100% af prøverne, og det vil være korrekt i omkring 99% af tilfældene, men det må understreges, at disse resultater kun opnås, hvis de involverede teknikker fungerer perfekt.

Teknikken er forsøgt udført i besætninger, men det har dog vist sig, at metoden - især PCR-reaktionen - er så følsom, at fejlprocenten i disse tilfælde øges betragteligt.

Ressourcer. Til at udtage celleprøven fra embryoet - den proces, som embryoet risikerer at dø af - kræves en mikromanipulator med tilhørende udstyr (mikroskop, pipettetrækker og -brænder), samt en særdeles veltrænet person, som kan betjene det. Selve PCR-reaktionen kræver af apparatur en programmerbar varmeknob, udstyr til gel-elektroforese og diverse reagenser. Til at betjene det kræves en person med rutine i laboratoriearbejde. Det er naturligvis en forudsætning for gennemførelse af PCR-reaktionen, at man har adgang til de Y-specifikke primere. Der er således patent på flere af disse til kommerciel anvendelse.

Forventninger. En stor indsats udføres i disse år for at kortlægge gener på kromosomerne fra kvæg (og andre husdyr). Efterhånden som kvægets genkort bliver mere komplet, vil flere genmarkører af økonomisk interesse blive tilgængelige, og genotypning kan derfor ventes at blive mere og mere anvendt. Det betyder også, at kønsbestemmelse af embryoner sammen med anden genotypning nok vil blive en nødvendighed ved markedsføring af embryoner inden for de nærmeste år. Det skal endelig bemærkes, at genotypningsproceduren med PCR teknologi nok vil blive en integreret del ved in vitro udvikling og ved kloning af embryoner.

Andre husdyr. Der er i princippet ingen forskelle mellem husdyrene med hensyn til udførelsen af denne teknik. Der kræves dog som beskrevet beherskelse af en del "følgeteknikker" - genkortlægning, mikromanipulation, embryohåndtering osv., som i nogle tilfælde er forskellig mellem dyrearterne.

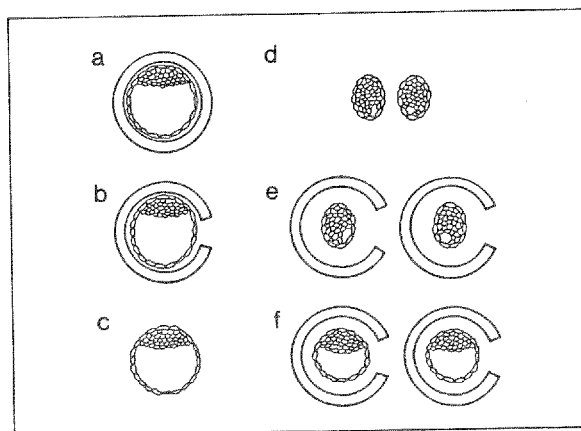
3. Mangfoldiggørelse af embryoner

Kloning betegner produktion af kopier af embryoner, der dermed har samme gener. Det er væsentligt at understrege, at kloning ikke ændrer den genetiske sammensætning af de embryoner, der bliver resultatet af kloningsproceduren.

To metoder til at klonе embryoner skal omtales: deling ("splitting", bisektion) og kerne-transplantation (traditionelt kaldet "kloning").

3.1. Deling af embryoner

Deling af embryoner i to dele udføres sædvanligvis på embryoner, der er på det kompakte morula eller tidlige blastocyststadium, jfr. Figur 5.



Figur 5: Skematisk illustration af deling af en blastocyst (a). Zona pellucida åbnes (b), og selve embryoet (c) deles i to halvdele, som ved denne procedure falder sammen (d). De halve embryoer placeres i hver deres zona pellucida (e), og efter kort tids dyrkning antager de igen blastocystens udviklingsstadium (f) (fra Greve, 1990).

Embryonet placeres i en dråbe næringsmedium under mikroskop, og med en mikromanipulator fikseres embryoet på en holdepipette, der er koblet til en mikrosprøjte, hvorigennem der kan etableres et vakuum. Derefter bliver et tyndt skærende blad brugt til at lave en lodret snit gennem æggets skal (zona pellucida), og cellemassen deles ligeligt i to dele. Hver halvdel af embryoets cellemasse anbringes i en tom æggeskal og er derefter klar til transplantation til en recipient (afsnit 1.1). En anden mulighed er enten ikke at anbringe de halverede embryoer i en tom skal eller at placere de to halvdele i samme skal.

Status. Teknikken kan fungere rutinemæssigt, men er ikke særlig udbredt. Den væsentligste årsag er nok, at teknikken ikke er særlig praktisk anvendelig, da indgrebet kræver dels stor rutine og dels tid. Ydermere tåler de delte embryoer ikke eller kun dårligt at blive frosset, hvilket betyder, at deling rent praktisk kun gennemføres i forbindelse med friske transplantationer. I gennemsnit kan dette give 1,3-1,4 drægtigheder pr. embryo.

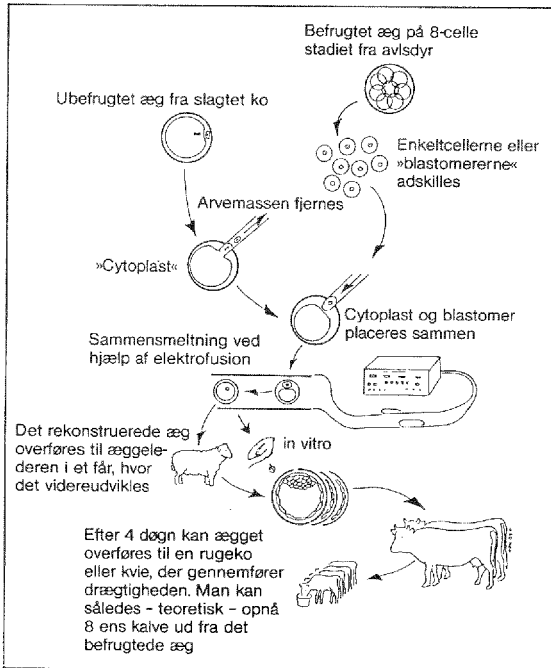
Ressourcer. Af væsentligt udstyr kræves en mikromanipulator med tilhørende mikroskop; endvidere udstyr til fremstilling af mikropipetter og -knive: pipettetrækker og mikrobrænder. Til at betjene udstyret skal en person oplæres grundigt, og vedkommende må besidde stor rutine i mikromanipulation.

Forventninger. Der er trods megen forskning endnu ikke fundet en egnet metode til frysning af de delte embryoner med andet end en ringe overlevelseschance, og der synes ikke at være metoder på vej til at forbedre disse resultater. Teknikken anvendes derfor kun, når der er mulighed for transplantation af de delte embryoner inden for få timer.

Andre husdyr. Der er født afkom efter bisektion af embryoner fra alle husdyr. Med hensyn til anvendelsen af teknikken gælder de samme problemer som for kvæg. Dog vil frysning af svineembryoner i endnu højere grad nedsætte chancerne for overlevelse end tilfældet er for kvæg.

3.2. Kernetransplantation

Med denne kloningsmetode kan der produceres mange kopier af et enkelt embryo, men teknikken og de tilgrundliggende biologiske forhold er til gengæld meget mere kompliceret end kloning ved hjælp af deling (Figur 6).



Figur 6: Kloning af embryoner ved kernetransplantation (fra Greve, 1990).

"Hjælpeocyter" opsamles og modnes in vitro (afsnit 1.2). Deres omkringliggende celler fjernes, og hjælpeoocyten anbringes under stereomikroskop. Ved hjælp af en mikromanipulator laves der et snit i æggets skal, og hjælpeocytenes kerne med kromosomer fjernes.

En enkelt af cellerne fra det embryo, der ønskes klonet, placeres derefter under æggeskallen af den kerneløse hjælpeocyt. For at få embryonetts cellekerne sammensmeltet med oocyten, påvirkes de med en elektrisk impuls, som får de to cellers membraner til at smelte sammen (fusionere), ligesom det aktiverer ægget, hvilket er nødvendigt for en fortsat udvikling. Når embryonetts kerne dermed er bygget ind i ægget, opfører ægget i de fleste tilfælde sig som et nyligt befrugtet æg på 1-celle stadiet. Det nye embryo kan derefter fortsætte sin udvikling under kontrollerede betingelser in vitro (afsnit 1.2) eller kan overføres til æggelederen på en recipient eller en mellemvært ved et kirurgisk indgreb.

Status. Teknikken har været genstand for stor udforskning i de seneste år og kan anses for at fungere i laboratoriet på det forsøgsmæssige stadium.

I princippet kan der fremstilles ligeså mange kopi-embryoner, som der er celler i embryonet, der skal klones. Effektiviteten af hvert trin i hele kloningsproceduren begrænser dog indtil videre dette. Generelt lykkes fjernelse af kernen fra hjælpeocyten i omkring 90% af forsøgene. Den elektriske påvirkning forårsager fusion af omkring 85% af æggene og stimulerer aktivering i omkring 75%. Dyrkning af kernetransplanterede embryoner til blastocyst-stadiet sker for omkring 25% vedkommende. Den overordnede produktionsrate af embryoner er således maksimalt mellem 10 og 15%. Det ser endvidere ud til, at der er store forskelle i embryonernes evne til at lade sig klonere - nogle evner det ikke. Det er måske embryonernes kvalitet, der har afgørende betydning herfor, uden man dog på forhånd kan afsløre dette.

Indtil dato har det være muligt at få født op til 16 kalve, der stammer fra samme embryo. Drægtighedsraterne opnået med kernetransplanterede embryoner angives at være fra 20 til 40%, således at den samlede rate af fødte kalve er omkring 3-4%. Efter frysning af kernetransplanterede embryoner er levedygtigheden imidlertid endnu lavere, hvilket er et væsentligt problem.

Ressourcer. Teknikken er ressourcekrævende med hensyn til både udstyr og bemanding, da den kræver et samspil mellem især teknikkerne til in vitro udvikling og til mikromanipulation, der hver for sig skal være særdeles velfungerende. Her udover skal teknikkerne til opsamling af oocyter og til elektrofusion være optimale.

Af udstyr skal til mikromanipulation anvendes det, der er nævnt i forbindelse med deling (afsnit 3.1) samt et elektrofusionskammer, samt et velfungerende in vitro laboratorium (afsnit 1.2).

Kloningsproceduren er tidskrævende i og med, at hvert æg skal håndteres særskilt flere gange med mikromanipulator. Der skal derfor kun regnes med i størrelsesordenen 60-80 fusionerede æg pr. person pr. dag. Det forudsætter samtidig, at andre personer varetager de øvrige, tilhørende teknikker.

Forventninger. Der stilles store forventninger til denne teknik i fremtiden, men en mere effektiv udnyttelse er betinget af, at resultaterne forbedres. Dette kræver en betydelig forskningsindsats på området. Det skal især omfatte studier af den såkaldte cellecycklus hos hjælpeocytter og embryonets celler, metoder til fremstilling af embryonale stamceller (afsnit 3.3) samt forbedrede dyrkningssystemer, således at de fusionerede embryoner kan opnå en bedre overlevelse både efter transplantation og ikke mindst efter frysning.

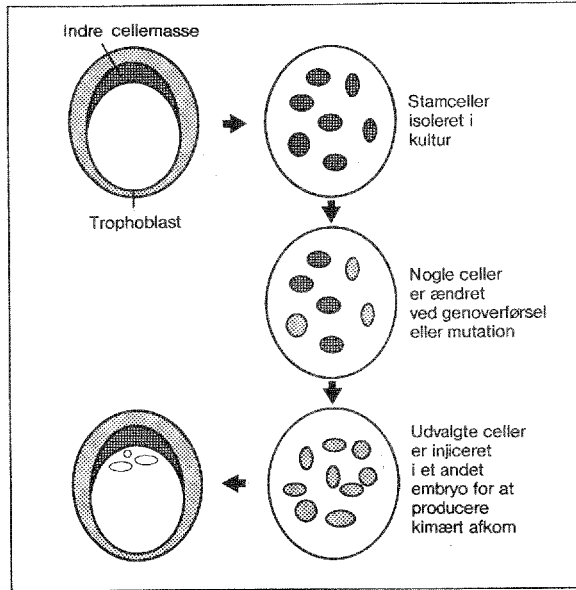
Gentagen kloning (dvs. kloning af allerede klonede embryoner) er allerede en realitet og er den måde, hvorpå der i princippet kan opnås mange identiske kopier af et enkelt embryon. Problemerne med denne form er dog endnu større end for den beskrevne én gangs kloning. Gentagen kloning må forventes at udvikles sig i takt med én gangs kloning. Fremgangen på disse områder vil sandsynligvis være forholdsvis langsom i de nærmeste år.

Andre husdyr. Teknikken er mest udviklet for kvægets vedkommende, men en del af det grundlæggende arbejde er udført på materiale fra får og svin.

3.3. Embryonale stamceller

I embryonets tidligste stadier er hver celle ikke specialiseret i sin udvikling - det sker først senere til f.eks. hud, hjerte, tarm. Disse tidlige, uspecialiserede celler kaldes embryonale stamceller, da de besidder evnen til at blive til "alt" - en evne, som mistes, når specialiseringen er sket.

Embryonale stamceller er blevet isoleret fra embryoner (embryo-blast) og er forsøgt dyrket in vitro. Formålet har været at få dem til at formere sig ved almindelig celledyrkning, uden at de mister deres uspecialiserede karakter. Lykkes dette, vil man have en kultur af stamceller, hvor hver enkelt celle kan føres tilbage i et tidligt embryon eller fusioneres med en oocyt og derfra indgå i den videre, specialiserede udvikling (Figur 7). På denne måde vil stamcellen kunne påvirke embryonets udvikling i en ønsket retning, afhængigt af de betingelser, den har været dyrket under in vitro. Et individ, der fødes efter at have fået overført stamceller, kaldes en kimær - et blandingsdyr.



Figur 7: Skematisk illustration af fremstilling af embryonale stamceller (fra Greve, 1990).

Med stamceller kan procedurerne til både kernetransplantation (afsnit 3.2) og genoverførsel (afsnit 5) forenkles meget. I kernetransplantationsproceduren vil de kunne erstatte de embryoner, der ønskes klonet. Herved undgås det relativt store arbejde med fremskaffelse af embryoner. Ved genoverførsel til stamceller vil det være muligt at konstatere, hvorvidt den er lykkedes, før der eventuelt foretages en overførsel af cellen til et embryo.

Status. Stamceller er i dag fremstillet med celler fra mus, ligesom der har været rapporter om stamcellelignende kulturer fra får og svin. Det store problem med fremstilling af cellekulturer af embryonale stamceller er, at cellerne mister deres uspecialiserede karakter og bliver til "almindelige" celler. Der kræves derfor ganske specielle udviklingsstadier og dyrkningsbetingelser, for at dette ikke sker - betingelser, som ikke er afklarede. Teknikken er afgjort stadig på det eksperimentelle stadium.

Ressourcer. Teknikken kræver i sig selv et særligt specialiseret celledyrkningslaboratorium, der skal være i nært samarbejde med laboratorier, der behersker in vitro udviklingsteknikken. Derfor kræves ganske betydelige forskningsmæssige ressourcer til dette område.

Forventninger. For teknikkerne til kloning og genoverførsel vil embryonale stamceller formentlig være centrale elementer i den fremtidige udvikling. Tidshorisonten er dog lang, da problemerne med de rigtige dyrkningsbetingelser ikke er løst. Der vil måske gå 5-10 år, inden det kan forventes at lykkes.

Andre husdyr. Det er kun på celler fra mus, at der med sikkerhed er fremstillet embryonale stamceller. De nævnte rapporter omkring får og svin anses i videnskabelige kredse for at være kontroversielle, og der kræves således yderligere dokumentation, før der er sikkerhed for, at et første gennembrud på celler fra husdyr er sket.

4. Frysning af sædceller, oocyter og embryoner

Celler kan langtidsopbevares efter nedfrysning, men kravet er naturligvis, at en stor del af cellerne efter optøning er lige så levedygtige og velfungerende som før frysning. Et af problemerne ved frysning er cellens vandindhold, der ved frysning omdannes til iskrystaller. Disse kan ødelægge cellen på grund af deres udvidelse under frysningen (hvorved cellen sprænges) og deres skarpe kanter (der kan skære cellen i stykker). Derfor tilsættes forskellige væsker (glycerol, DMSO) til at erstatte vandet i cellerne og herved beskytte mod disse skader. Kombineret med en kontrolleret nedfrysning kan cellerne derved overføres til flydende kvælstof (-196°C), hvor deres levetid anses for at være meget lang, forudsat at der tages hensyn til den radioaktive påvirkning fra den naturlige baggrundsstråling.

Forskellige forhold gør sig gældende ved frysning af de tre typer kønsceller (sædceller, oocyter og embryoner):

4.1. Sædceller

Frysning af sædceller er en rutineteknik, der i stort omfang er gennemført siden midten af 1950'erne. Tyresæd tåler normalt frysning godt, hvilket betyder, at i gennemsnit 80-90% af de nedfrosne sædceller overlever. Da der normalt nedfryses sædportioner med op til 20 mio. levende sædceller, er den nævnte overlevelsesprocent ganske acceptabel, da befrugtningsschancerne med sædportionen efter optøning ikke vil være mindsket.

4.2. Oocyter

Oocyter er som celler betragtet temmelig følsomme overfor frysning og optøning, idet deres cellebestanddele tilsyneladende er mere sårbare end f.eks. sædcellers. Dette afspejles ved, at der til trods for en stor forskningsindsats endnu ikke er født én kalv efter frysning af oocyter, selv om der er opnået blastocyststadier med sådanne oocyter.

I modsætning til frysning af en portion sædceller drejer frysning af oocyter sig om, at den enkelte oocyt overlever behandlingen. Dette stiller meget større krav til frysemetoden end

ved frysning af f.eks. en sædportion.

4.3. Embryoner

Frysning af embryoner er foretaget i snart 20 år og fungerer i dag som rutineteknik, hvor gennemsnitligt 90% af embryoner af god kvalitet overlever.

Ligesom med oocyter gælder, at det enkelte embryon skal overleve frysningen. Der synes i den forbindelse at være forskelle mellem køer med hensyn til deres embryoners evne til at overleve frysningen. Samtidig vil embryonernes kvalitet påvirke drægtighedsresultaterne, idet embryoner af dårlig kvalitet tåler frysning dårligt.

Status. Sæd og embryoner fryses rutinemæssigt med tilfredsstillende resultater. Frysning af oocyter er derimod stadig på det eksperimentelle stadium.

Ressourcer. Til embryoner og oocyter kræves af større udstyr en cellefryser, der kan gennemføre en kontrolleret frysning. Udførelsen af selve frysningen er enkel, når en god rutine er opnået. En enkelt person kan da foretage frysning af adskillige embryoner på samme tid. Med de almindeligste cellefryseres kapacitet vil det svare til, at der kan fryses 20-30 embryoner på 1½ time.

Forventninger. Med de seneste års udvikling kan det forventes, at frysning af oocyter er mulig inden for få år. Dette vil være af betydning for in vitro udviklingsteknikken (afsnit 1.2), som herved vil blive uafhængig af tid og sted for oocytopsamlng.

Med hensyn til frysning af embryoner vil der nok ske en forenkling af metoderne, idet en noget hurtigere nedfrysningsmetode (vitrifikation) er under udvikling. Tiden til selve nedfrysningen vil da kunne reduceres fra ca. 1 time til 5-10 minutter. Metoden vil sandsynligvis ikke være så anvendelig under praksisforhold som den nuværende frysemetode.

Andre husdyr. **Svin:** som nævnt flere gange tåler æg på forskellige stadier eller sæd fra svin kun meget dårligt at blive frosset. Nye rapporter om frysning af blastocyster antyder dog, at det måske vil blive muligt inden for få år, og særlig på dette område kræves en intensiveret forskningsindsats.

Får og ged: frysning af sæd og embryoner fungerer rutinemæssigt som på kvæg. Med hensyn til oocyter haves samme status som for kvæg.

Hest: frysning af hingstesæd fungerer rutinemæssigt, men der ses en meget udpræget individuel variation. Med hensyn til embryoner kan de fryses, såfremt dette sker inden syv dage efter befrugtning.

5. Genoverførsel til embryoner

Ved overførsel af fremmede gener til et embryo er formålet at ændre embryonet egne gener mere eller mindre. Dette kan betyde en tilsvarende større eller mindre ændring af det dyr, som udvikles fra det genmanipulerede embryo. Ændringen kan bestå i alt fra produktion af et enkelt nyt protein ("gene farming", f.eks. blødningsfaktor IX i mælk fra får) til øget væksthastighed (f.eks. hos svin med overført gen for væksthormonudskillelse).

For at kunne kontrollere denne ændring af genet kræves et betydeligt kendskab til genernes placering og funktion (genkortlægning), samt til metoder til selve overførslen af gener. Generelt gennemføres disse metoder kun med ringe held. Den mest succesfulde består i en indsprøjtning ("mikroinjektion") af det fremmede gen i det nyligt befrugtede embryo (forkernestadiet), hvor sammenkoblingen mellem generne fra han og hun i forvejen skal ske (Figur 8).

Effektiviteten med at få kobling mellem embryonet egne gener og det fremmede gen er i størrelsesordenen 1-5%, og effektiviteten med at det fremmede gen placeres rigtigt og udfører den ønskede funktion er endnu lavere (0,1-0,2%).

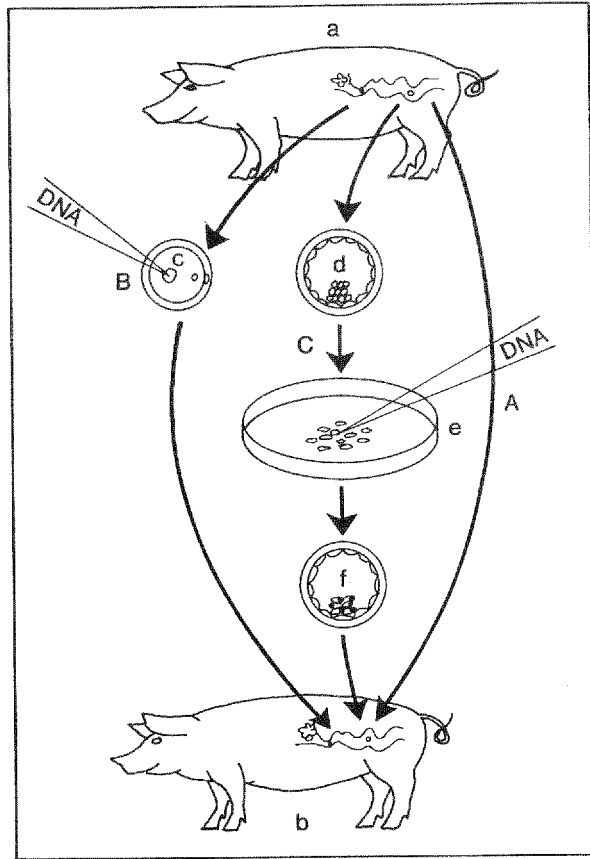
Status. Forskningsindsatsen har indtil videre været mest koncentreret om svin og får blandt husdyrene. På kvægområdet er der derfor kun rapporteret om fødsel af tre transgene kalve.

Ressourcer. Genoverførsel er særdeles tids- og ressourcekrævende teknikker. Det gælder både den genteknologiske del til fremstilling af det fremmede gen, og den embryoteknologiske del til overførsel af det fremmede gen til embryoet. Dette - sammenholdt med de nævnte lave succesrater - gør hele proceduren økonomisk meget belastende, ikke mindst hvad angår de større husdyr.

Forventninger. Der er betydelige forventninger til, at denne teknik vil blive mere effektiv i de kommende år. Udviklingen på det genteknologiske område er hurtig, og indsatsen er betragtelig verden over. På kvægområdet er indsatsen nok stadig mere begrænset, så længe basalforskningen ikke er afsluttet.

Andre husdyr. Svin er det af vore husdyr, hvor teknikken er anvendt med størst succes. Der er fremstillet svin med øget vækstevne m.m. - en evne, der nedarves.

På får er lykkedes at fremstille enkelte dyr, som er transgene med hensyn til mælkens kvalitative sammensætning, tilvækst og udkvalitet.



Figur 8: Ægtransplantation på svin (A), hvor æggene (blastocyster) transplanteres fra donor (a) til recipient (b), samt fremstilling af transgene svin ved direkte mikroinjektion af genet (B) eller via transgene cellelinier (C). Ved metode B foretages geninjektion direkte i det nyligt befrugtede embryons forkerne (c), hvorefter dette transplanteres til recipientens (b) æggeleder. Ved metode C udtages celler fra en blastocyst (d), og efter dyrkning gøres de transgene (e) og indsprøjtes i en anden blastocyst (f), der herefter transplanteres til recipientens (b) livmoder (efter Greve, 1990).

Konklusion

Den embryoteknologisk udvikling har været hastig i de seneste ti år. Blandt de beskrevne teknikker bliver flere således rutinemæssigt anvendt i praksis (superovulation, embryotransplantation, frysning af embryoner). Andre af teknikkerne har nået et niveau, der gør dem anvendelige i laboratoriet (in vitro udvikling, opsamling af oocytter fra levende dyr, kønsbestemmelse af embryoner, deling af embryoner). Det er dog deciderede laboratorietechnikker, hvis videre udvikling sandsynligvis ikke vil gøre det muligt at gennemføre dem uden for speciallaboratorier. Endelig er en tredje gruppe af teknikker stadig er på det eksperimentelle plan (kønsbestemmelse af sædceller, kernetransplantation, embryonale stamceller, genoverførsel til embryoner). Disse teknikker har dog vist sig at være mulige, rent teknisk og biologisk, men de kommende år skal vise, om og hvornår de kan bringes til at fungere på et plan, der gør dem mere praktisk anvendelige.

Der er således ingen tvivl om, at udviklingen på det embryoteknologiske område også bliver spændende at følge frem til årtusindeskiftet.

Litteraturliste

- Boland, M., Goulding, D. og Roche, J.F., 1991. Alternative gonadotropin for superovulation in cattle. *Theriogenology* 35:5-18.
- Coulter, G.H., 1992. Bovine spermatozoa in vitro: A review of storage, fertility estimation and manipulation. *Theriogenology* 38:198-209.
- Gray, K.R., Bondioli, K.R. og Betts, C.L., 1991. The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology* 35:37-44.
- Greve, T., Callesen, H. og Hyttel, P., 1988. Superovulation af kvæg. 1. Status og perspektiver. *Dansk Veterinærtidsskrift* 71:963-967.
- Greve, T., 1990. Embryoteknologi. Ægtransplantation, kloning og gensplejsning. I: *Landbruget og fremtidens teknologi*. Akademiet for de Tekniske Videnskaber, p. 87-112.
- Greve, T. og Madison, V., 1991. In vitro fertilization in cattle: A review. *Reprod. Nutr. Dev.* 31:147-157.
- Herr, C.M. og Reed, K.C., 1991. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology* 35:45-54.
- Johnson, L., 1992. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. *J. Animal Science* 70:Suppl. 2:8-18.

- Kippax, I., Christie, W. og Rowan, T.G., 1991. Effects of method of splitting, stage development and presence or absence of zona pellucida on foetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos. *Theriogenology* 35:25-36.
- Lucas-Hahn, A., 1992. Status of cryopreserving micromanipulated bovine embryos. *Embryo Transfer Newsletter* 10:18-23.
- Pieterse, M.C., Vos, P.L.A.M., Kruip, T.A.M., Wurth, Y.A., van Beneden, T.H., Willemse, A.H. og Taverne, M.A.M., 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35:19-24.
- Rall, W.F., 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.* 28:237-245.
- Trounson, A., 1992. The production of ruminant embryos in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 28:125-137.
- Wall, R.J. og Seidel, G.E., 1992. Transgenic farm animals - a critical analysis. *Theriogenology* 38:338-359.
- Weitze, K.F. og Petzoldt, R., 1992. Preservation of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 28:229-235.
- Wolfe, B.A. og Kraemer, D.C., 1992. Methods in bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 37:5-16.
- Yang, X. og Anderson, G.B., 1992. Micromanipulation of mammalian embryos: Principles, progress and future possibilities. *Theriogenology* 38:316-337.

EMBRYOTEKNOLOGI - ANVENDELSESMULIGHEDER

Husdyravlens primære formål er at frembringe en forbedring af husdyrenes produktions-evne, produktionseffektivitet, sundhed og livskraft, samt husdyrprodukternes kvalitet. Det biologiske grundlag for denne forædling er tilstedeværelsen af arvelig variation, og forbedringerne opnås ved at tillægge afkom efter dyr, som har positiv avlsværdi for de egenskaber, der ønskes forbedret. Avlsværdiberegninger er traditionelt sket ved at sammenligne de fænotypiske præstationer for potentielle avlsdyr og/eller deres slægtninge. Den kvantitative genetik kombinerer elementer af statistik og genetik til effektive redskaber, som udnytter alle tilgængelige oplysninger optimalt.

Effekten af avlsarbejdet kan i princippet beskrives ved følgende udtryk:

$$\Delta G = i * r_{IA} * s_A / L,$$

hvor ΔG er den genetiske ændring pr. tidsenhed; i er selektionsintensiteten i genetiske spredningsenheder; r_{IA} er sikkerheden ved avlsværdiurderingen, målt som korrelationen mellem den sande og den beregnede avlsværdi; s_A er den additive genetiske spredning og L er generationsintervallets længde.

Embryoteknologi og genteknologi kan få stor betydning for husdyravlen, fordi man med disse teknikker kan påvirke de enkelte faktorer i denne ligning. Genteknologien kan udnyttes inden for alle husdyrarter, mens embryoteknologien især har anvendelsesmuligheder i kvægavlen. Embryoteknologi er imidlertid en forudsætning for at anvende genteknologi, og fremskridt inden for embryoteknologien vil dermed indirekte være af betydning for alle husdyrarter.

Avlsarbejdet med kvæg, svin og fjerkræ er kendetegnet ved at være stærkt organiseret. Det har gjort det muligt at udnytte forskningsresultater inden for biometri, fysiologi og reproduktion i avlsarbejdet. Det potentielle marked for overlegent avlsmateriale er stort, og nye forskningsresultater, som kan bidrage til at øge den avlsmæssige fremgang pr. tidsenhed, kan derfor forventes at blive anvendt meget hurtigt.

Superovulation og ægtransplantation har ændret de biologiske og økonomiske forudsætninger, som lå til grund for udformningen af de eksisterende avlsprogrammer for kvæg. Nye programmer, som inddrager ægtransplantation, kønssortering af embryoner og kloning, er bragt i forslag. I dette afsnit beskrives principperne i disse såkaldte MOET-avlsplaner (Multiple Ovulation Embryo Transfer). Dernæst diskuteres, hvorledes udvikling af embryoteknologi og genteknologien vil påvirke MOET-avlsprogrammernes effektivitet. Endelig omtales mulighederne for at effektivisere produktionen af henholdsvis kød og mælk gennem anvendelse af embryoner i produktionsbesætninger.

Avlsmæssig betydning

1. MOET avlsprogrammer

De avlsprogrammer for malkekvæg, som blev introduceret i 1960'erne, og som nu benyttes i alle lande med højtudviklet malkekvægehold, er baseret på data fra store populationer af ydelseskontrollerede og inseminerede køer (populationsavl). Det vigtigste element i disse avlsplaner er afkomsundersøgelse af tyre. Ved inseminering af en del af hundyrbestanden med sæd fra unge potentielle avlstyre produceres et begrænset antal døtre efter hver ungtyr. På grundlag af døtrenes præstationer kan de enkelte tyres avlsværdi fastlægges med meget stor sikkerhed. Resultaterne af afkomsundersøgelsen danner grundlag for udvælgelsen af fædre til næste generation af avlstyre og produktionsdyr. Tyremødrene udvælges fra populationen, og i princippet er alle ydelseskontrollerede køer potentielle tyremødre. Hundyrenes lave reproduktionsevne har hidtil begrænset mulighederne for at selektiere mødre til næste generation af hundyr.

Hansen og Neimann-Sørensen (1974) påpegede tidligt, at systematisk anvendelse af ægtransplantation på tyremødre kunne øge avlsfremgangen i en konventionel avlsplan for malkekvæg med 7.5%. Hvis tyremødre blev udvalgt fra en population, som systematisk anvendte ægtransplantation ved produktion af hunligt opdræt, kunne avlsfremgangen pr. år øges med 23.5%. Land og Hill (1976) beregnede, at den årlige avlsfremgang for vækstevne i en kødracepopulation kunne øges med mindst 60% ved at producere al opdræt ved ægtransplantation.

Nicholas og Smith (1983) introducerede begrebet 'Kerneavl' som betegnelse for en avlsstruktur, hvor avlstyrene fremavles i særlige elitebesætninger (avlskernen). Hvis disse avlsprogrammer inkluderer anvendelse af superovulation og ægtransplantation, taler man om MOET-kerneavl. I MOET-avlsprogrammer foretages en stærk selektion ved udvælgelsen af de hunlige avlsdyr. Desuden afkortes generationsintervallet betydeligt, og disse to forhold er tilsammen årsagen til MOET-avlsprogrammernes høje effektivitet.

Nicholas og Smith (1983) beregnede, at man i en avlskerne på nogle få hundrede dyr kunne opnå 30-50% større avlsfremgang end i et konventionelt avlsprogram for malkekvæg. Udvalgelse af donorerne blandt kvier på grundlag af afstammingsoplysninger ("juvenile plan") giver ca. 15% større fremgang, end hvis donorerne først udvælges efter afslutning af deres 1. laktation ("adult plan"), når de to systemer sammenlignes på grundlag af samme antal udførte transplantationer. I juvenile MOET-avlsprogrammer for malkekvæg udvælges tyrene alene på grundlag af mødrenes ydelse. I adult MOET-programmer kan udvælgelsen af avlstyre baseres på både mødres og hel- og halvsøstres ydelser. Udviklingen af nye metoder til beregning af avlsværdier gør det muligt at foretage en korrekt sammenligning af avlsværdier, selv om informationsmængden om de enkelte dyr er meget forskellig. Under

disse omstændigheder vil en kombination af "juvenile-" og "adult-plan" give størst fremgang.

Nicolas og Smith's beregninger gav meget optimistiske skøn for MOET-avlplaners avlsfremgang. Antallet af afkom pr. donor var således ansat urealistisk højt, og der blev ikke taget hensyn til, at den genetiske variation, specielt i små populationer, vil reduceres som følge af fortsat selektion. Ruane og Thomson (1989) viste således ved simulering af et "adult" MOET program, svarende til det som Nicholas og Smith havde regnet på, at den gennemsnitlige avlsmæssige fremgang over 6 generationer kun udgjorde 60-70 % af det, som Nicholas og Smith havde beregnet. MOET avlsprogrammer bør derfor være åbne, således at der jævnligt introduceres ny genetisk variation i avlskernen.

Der er fremsat adskillige forslag til, hvordan kerneavl og MOET-teknik kan kombineres med eksisterende avlsprogrammer til såkaldte "mixed MOET-planer" (bla. Colleau 1985, Christensen og Liboriussen 1986, og Colleau 1989). I disse planer forudsættes tyrene afkomsprøvet uden for avlskernen, hvorved sikkerheden på tyrenes avlsværdier kan blive meget høj. Afventning af døtrenes ydelsesresultater indebærer imidlertid, at tyrene bliver ca. 5 år, inden de kan udvælges, og generationsintervallerne fra far til datter og far til søn bliver dermed meget længere end i de ovenfor omtalte avlsprogrammer. Ifølge undersøgelser af Meuwissen (1991) vil den avlsmæssige fremgang pr. år generelt blive lidt lavere, hvis man kun benytter afkomsprøvede tyre i MOET-avlsprogrammer. Variationen i ET-afkommets avlsværdi bliver til gengæld betydelig mindre, og sikkerheden for at opnå positive resultater er derfor større.

Christensen (1991) fandt, at anvendelse af stærkt udvalgte afkomsundersøgte tyre i avlskernen gav større avlsfremgang end de originale MOET-planer, specielt når avlsmålet omfattede egenskaber med lav heritabilitet, som f. eks. sygdomsresistens eller reproduktions-egenskaber. Lukkede MOET avlsprogrammer, og specielt den juvenile type, indebærer en hurtig stigning af indavlsgraden, fordi afstammingsoplysninger tillægges forholdsvis stor betydning ved udvælgelsen af avlsdyr. Da afstammingsoplysninger er ens for alle individer efter samme parringskombination, vil de udvalgte avlsdyr ofte være hel- og halvsøskende. I de fleste simuleringssstudier har man forudsat, at der højst kan accepteres 1 avlstyr fra hver helsøskende-familie. Alligevel viser beregningerne, at indavlen stiger stærkt, specielt når avlskernen er lille.

I mange simuleringssstudier til sammenligning af MOET-avlsprogrammer er antallet af fødte ET-kalve pr. år holdt konstant. Det svarer til, at der i en given avlsbesætning kun kan fremavles det antal kalve, som besætningens egen reproduktionskapacitet giver mulighed for. Med udviklingen af frysnings- og transplantationsteknikken er overførslen af embryoner til recipienter nu så enkel, at den kan udføres i almindelige brugsbesætninger. Avlskernens størrelse er dermed ikke længere direkte begrænsende for, hvor mange ET-kalve der kan produceres, men kun for antallet af embryoner af høj avlsmæssig værdi.

2. Produktion af embryoner

Forbedring af de eksisterende metoder til produktion af embryoner, superovulation eller in vitro udvikling vil kunne øge antallet af afkom pr. donor. Det vil desuden kunne mindske variationen i familiestørrelse og give større sikkerhed for, at alle kvalificerede hunlige avlsdyr opnår afkom. I det følgende belyses, hvilken betydning disse forhold har på effektiviteten af MOET-avlsprogrammer for malkekvæg.

Større selektionseffekt. Den eksisterende teknik til superovulation af kvæg giver i gennemsnit mellem 6 og 7 transplantationsegnede embryoner pr. donor. Dette antal er betydeligt under det avlsteoretisk optimale. Dette optimum afhænger af avlskernens størrelse og findes ved afvejning af de positive og negative bidrag. De positive bidrag skyldes især mulighed for større selektionsintensitet, men også større sikkerhed på donorenes avlsverdi, når familiestørrelsen øges. Blandt de negative effekter er det især stigningen i indavl og reduktionen i genetisk variation, som bør tages i betragtning. I MOET-avlsprogrammer med forholdsvis lille og lukket avlskerne er den optimale familiestørrelse derfor forholdsvis lille (<10). I store åbne avlskerner er restriktioner i selektionsintensitet mindre påkrævet, men også i en sådan avlsstruktur vil det optimale antal afkom pr. donor næppe overstige 20.

Fewson (1989) beregnede den årlige avlsfremgang i forskellige mixed MOET-avlsprogrammer, når donorerne i gennemsnit gav enten 8, 12, 16 eller 20 embryoner. Ændring fra 8 til 20 embryoner øgede den avlsmæssige fremgang pr. år med en faktor 23 - 41. Størst effekt blev fundet, når kernestørrelsen var lille (64 potentielle donorer), og det positive bidrag aftog med stigende antal embryoner pr. donor.

Færre donorer som ikke får afkom. Med den nuværende teknik til superovulation er der omkring 20% af donorerne, som ikke opnår afkom. Bedre superovulationsteknik og/eller in vitro metode øger mulighederne for at få afkom efter alle kvalificerede hunlige avlsdyr. Specielt in vitro metoden indebærer muligheder for at begrænse variationen i familiestørrelse, idet opsamlingen af oocyter fra den enkelte donor kan gentages, indtil man har et vist minimum af embryoner.

Betydningen af dette er undersøgt af Keller og Teepker (1990). Ved simulering af et juvenilt MOET-avlsprogram for malkekvæg påviste de, at den avlsmæssige fremgang reduceredes med ca. 25%, såfremt 20% af de hundyr, som avlsmæssigt var kvalificerede som donorer, ikke gav embryoner. Hvis der i forudsætningerne blev regnet med 16 embryoner i gennemsnit pr. donor i stedet for 8, var faldet i avlsmæssig fremgang dog kun ca. 11%.

Optimering af parringsstrategier. I de første beregninger af MOET avlsplaners effektivitet blev det forudsat, at hver donor kun blev parret til 1 af de udvalgte tyre (nested design).

MOET-avlsplaner, som anvender en avlsstrategi, hvor alle avlstyre parres til alle donorer (faktorielt design), er imidlertid klart overlegne med hensyn til avlsfremgang (10-15%) og giver samtidig mindre stigning i indavl (Woolliams 1989, Ruane 1991, Kinghorn et al. 1991). Det skyldes, at det faktorielle parringsdesign giver flere, men mindre, helsøskendefamilier og dermed flere kandidater at udvælge avlstyrerne blandt. Kinghorn et al. (1991) anfører, at in vitro embryoner kan blive et væsentligt aktiv i MOET-avlsplaner, fordi in vitro befrugtning giver mulighed for en optimal parringsstruktur, idet der kan benyttes sæd fra flere tyre til oocyter fra samme donor.

3. Kønsspecifikke embryoner

I lukkede MOET-avlsprogrammer for malkekvæg er behovet for tyrekalve betydeligt mindre end behovet for kviekalve, idet man af hensyn til indavl højst kan selekttere en avlstyr fra hver helsøskendefamilie. At producere flere tyrekalve efter hver forældrekombination er således spild af ressourcer.

Kønssortering af embryoner vil under disse omstændigheder kunne benyttes til at producere flere kviekalve inden for de givne rammer, og dermed øge selektionsintensiteten ved udvælgelsen af donorer. Alternativt kan kønssortering benyttes til at opretholde en given selektionsintensitet med færre producerede ET-kalve, og dermed reducere omkostningerne ved avlsprogrammet, (Nicholas og Smith, 1983).

Colleau (1991) viste, at kønssortering af embryoner og anvendelse af den frigjorte recipientkapacitet til produktion af kviekalve gav betydeligt større effektivitet i et "adult" avlsprogram for malkekvæg. Ved frasortering af hanlige embryoner efter donorer, som kun var kvalificerede som komødre, kunne der således produceres flere kviekalve ved samme antal transplantationer, med deraf følgende større selektionsintensitet.

Kønssortering af sæd vil give mulighed for fremstilling af kønsspecifikke embryoner. I avlsbesætninger vil dette kunne udnyttes på samme måde som sortering af embryoner efter køn, nemlig til at producere flere kviekalve med en given recipientkapacitet.

Inseminering med kønssorteret sæd vil næppe kunne gennemføres med acceptable drægtighedsresultater, men ved in vitro befrugtning kan kønssorteret sæd blive aktuel. Teknikken kan i så fald få stor betydning ved masseproduktion af kønsspecifikke embryoner til fremstilling af brugsdyr.

4. Genetisk identiske embryoner

Embryoteknologien indebærer muligheder for at fremstille genetisk identiske individer, dels ved deling af embryoner, og dels ved kernetransplantation. De avlsmæssige perspektiver af de to teknikker belyses i det følgende.

4.1. Deling af embryoner

Deling af embryoner kan øge den avlsmæssige fremgang i et MOET-avlsprogram betydeligt. Størst effekt opnås, såfremt der er få embryoner pr. donor. Deling af disse vil da bidrage til, at antallet af afkom efter de udvalgte hunlige avlsdyr kommer nærmere det optimale antal. Denne "opformerings-effekt" forstærkes yderligere i næste generation, fordi de hunlige genotyper, som skal bruges som donorer, vil være repræsenteret ved to genetisk identiske individer, som begge vil kunne producere embryoner af samme (høje) avlsværdi. Antallet af afkom fra en enkelt donor-genotype vil derved kunne øges fra 3-4, som er hvad der opnås ved en enkelt skylning med den nuværende teknik, til 10-15. Dette antal vil være tæt på det optimale, og den avlsmæssige fremgang vil, alene af den grund, kunne øges med mindst 20%.

Deling af embryoner vil desuden bidrage til større avlsfremgang i et MOET-avlsprogram for malkekvæg i kraft af, at donorkøernes avlsværdi kan bestemmes med større sikkerhed. Sikkerheden på avlsværdi for ydelse vil således øges fra mindst 0.25 til 0.40, såfremt donorerne udvælges på grundlag af gennemsnittet af to genetisk identiske individers 1. laktationsydelser i stedet for donorerens individuelle 1. laktationsydelser.

I praksis vil deling af embryoner især være en fordel i de tilfælde, hvor en udvalgt donor kun har givet få embryoner. Anvendt på denne måde vil deling af embryoner også bidrage til større avlsmæssig fremgang ved at øge sandsynligheden for, at alle avlsmæssigt kvalificerede donorer opnår at få afkom, og ved at mindske variationen i familiestørrelse.

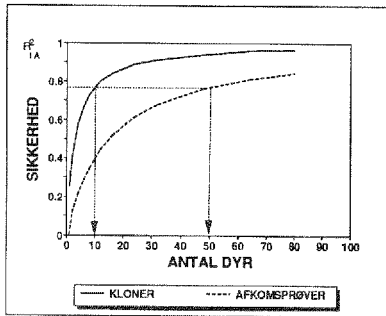
4.2. Kernetransplantation ("kloning")

Ved kernetransplantation er det hidtil lykkedes at fremstille et begrænset antal genetisk identiske individer, men metoden giver i princippet mulighed for at fremstille et meget stort antal kopier af samme genotype. Fremstilling af et begrænset antal genetiske kopier af hver original genotype kan udnyttes i eliteavl på samme måde som deling af embryoner, men med endnu større effekt på den avlsmæssige fremgang. Hvis der kan fremstilles et stort antal embryoner pr. klon, kan teknikken også benyttes til produktion af højtspecialiserede brugsdyr. Afprøvningen af kloner vil da også sigte på at finde genotyper, som er velegnede som brugsdyr. I det følgende belyses de avlsmæssige konsekvenser for begge disse situationer.

2-20 genetisk identiske individer. Afprøvning af individer fra klonen giver mulighed for at fastlægge dennes avlsværdi med meget stor sikkerhed. Sikkerheden kan imidlertid pr. definition ikke overstige 1, og for egenskaber med høj heritabilitet vil man allerede ved afprøvning af nogle få individer fra klonen opnå så høj sikkerhed, at afprøvning af flere individer fra samme klon kun vil have ringe marginal effekt.

I avlsprogrammer, som tilsigter forbedring af egenskaber, som ikke kan måles direkte på levende dyr som f.eks. slagte- og kødkvalitet, vil man kunne slagte et eller flere individer fra en klon og derved opnå samme sikkerhed som ved en afkomsprøve og - vel at mærke - uden den forlængelse af generationsintervallet, som er ulempen ved en afkomsprøve.

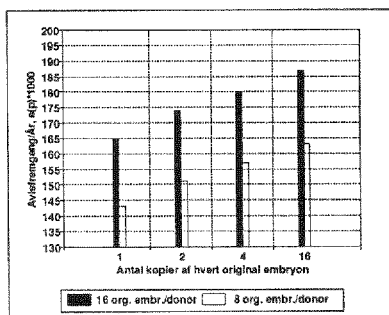
I MOET-avlsprogrammer for malkekvæg vil udvælgelse af donorer fra kloner, som er afprøvet ved nogle få individer i 1. laktation, kunne give samme sikkerhed ved udpegning af hunlige avlsdyr som den, der opnås ved afkomsprøvning af tyre med ca. 5 gange så mange registreringer (Figur 1).



Figur 1: Sikkerhed ved fastlæggelse af avlsværdi for mælkeydelse ved henholdsvis klonafprøvning og afkomsprøver.

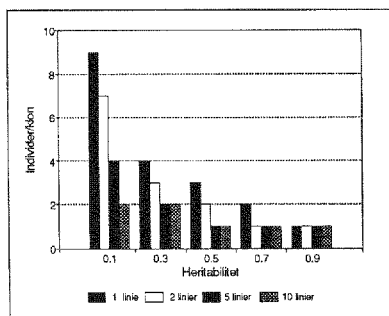
Nicholas og Smith (1983) fandt, at den avlsmæssige fremgang for mælkeydelse kunne øges med op til 28%, hvis der af hvert original embryo kunne fremstilles op til 16 genetisk identiske kopier. Afprøvningen af klonerne var forudsat at ske uden for avlskernen, således at selektionsintensiteten var uafhængig af antallet af individer pr. klon. Figur 2 er fremstillet på grundlag af deres beregninger. Det fremgår, at effekten udviser aftagende merudbytte med stigende antal kopier pr. original. Den viste effekt er alene et resultat af større sikkerhed på donorernes avlsværdi.

Colleau (1992) simulerede effekten af at kombinere kønsbestemmelse og kloning i et "Mixed" MOET-avlsprogram for malkekvæg. Han fandt, at kloning kunne øge den avlsmæssige fremgang med 6-18% i forhold til kønssortering alene. Antallet af transplantationer og antallet af originale embryoner pr. donor var forudsat konstant, mens antallet af medlemmer pr. klon blev varieret fra 3 til 10. Under disse forhold bidrog kloning især til genetisk fremgang ved at muliggøre større selektionsintensitet i kraft af, at de udvalgte genotyper var repræsenteret ved flere genetisk identiske køer, som alle kunne superovuleres og skylles.



Figur 2: Effekt af kloning på avlsmæssig fremsgang / år (efter Nicholas og Smith, 1983).

Såfremt afprøvningskapaciteten er begrænset, vil afprøvningen af kloner indebære, at der kan afprøves færre originale genotyper. I så fald kan det beregnes, hvor mange individer der skal afprøves af hver klon for at opnå størst mulig avlsfremsgang - og dermed hvor mange kloner der kan afprøves - hvis man ved, hvor mange kloner der skal bruges til fremavl, og kender heritabiliteten for den egenskab, som skal forbedres, (Smith 1989). Figur 3 viser, hvor mange individer der skal afprøves af hver klon ved forskellige heritabiliteter, når der i alt kan afprøves 100 individer, og der skal bruges 1, 2, 5, eller 10 kloner til avl.



Figur 3: Optimal klonstørrelse ved begrænset testkapacitet (N=100), når der skal bruges fra 1 til 10 selekterede klonlinier (efter Smith 1989).

Det fremgår, at det optimale antal individer pr. klon er lavt, specielt hvis man ønsker at opretholde et vist minimum af avlslinier (Teepker og Smith 1989).

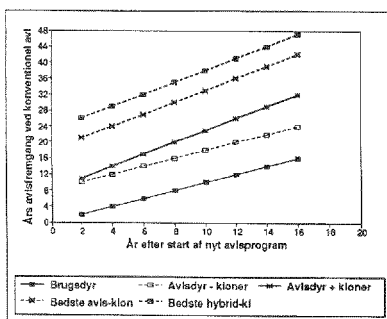
I små og lukkede avlskerner kan stigningen i sikkerhed ved afprøvning af kloner ofte ikke opveje tabet i selektionsintensitet, med mindre heritabiliteten er lav (Woolliams 1989, de Boer og Averdunk 1991). Afprøvningen af kloner bør derfor gennemføres uden for avlskernen. Hvis antallet af originale embryoner pr. donor er lavt, kan det dog være en fordel at beholde nogle få hunlige individer af hver klon i avlskernen, således at det optimale antal embryoner kan produceres af hver af de udvalgte kloner.

Da den optimale klonstørrelse er lille, når det drejer sig om at skabe størst mulig avlsmæssig fremgang, vil avlscentrene kun skulle producere nogle få individer af hver klon for at finde de kloner, som har størst avlsmæssig interesse. Avlsbesætningerne vil være nødt til at opretholde mange forskellige genotyper (kloner), fordi genetisk variation er en forudsætning for fortsat avlsmæssig fremgang.

Ubegrænset klonstørrelse. Hvis klonede embryoner kan fremstilles i store oplag, vil overførslen af de avlsmæssige fremskridt til produktionsbesætninger kunne ske ved, at brugsbesætningerne benytter ægtransplantation med klonede embryoner. Disse kommercielle kloner vil blive fremstillet ud fra nogle af de bedste avlskloner.

Kommercielle kloner vil ikke nødvendigvis være identiske med de bedste avlskloner. Ved vurdering af en klons brugsmæssige værdi er det således underordnet, om dens fænotypiske overlegenhed skyldes additiv arv, dominans eller epistasi. Ved krydsning af avlskloner vil man derfor kunne fremstille hybrid kloner, som har større produktionsevne eller større produktionseffektivitet end de bedste avlskloner.

Dette er illustreret i Figur 4.



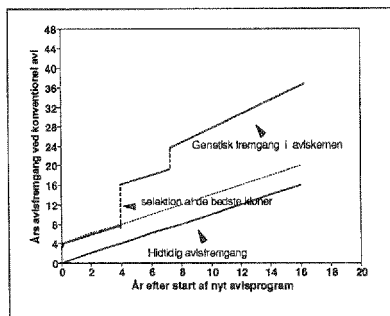
Figur 4: Effekt af kloning på det avlsmæssige niveau i avls- og brugsbesætninger.

Med mulighed for massefremstilling vil selv små forskelle i kloners brugsmæssige værdi have stor produktionsøkonomisk betydning. En grundig afprøvning og efterfølgende stærk selektion vil derfor skulle gennemføres, inden klonerne sættes i masseproduktion. I figur 4 er der regnet med, at der årligt afprøves 100 kloner, og at kun de bedste 5 bliver godkendt. Det eksisterende system til afprøvning af unge avlstyre ved prøveinseminering med henblik på at finde gode brugstyre vil umiddelbart kunne kopieres. Der skal dog ikke afprøves tilnærmelsesvis så mange dyr pr. klon for at opnå samme sikkerhed som ved en afkomsundersøgelse.

Afprøvningen af kloner i praksis vil betyde, at der går nogle år fra en klonlinie er fremstillet, til den er klar til massefremstilling af brugsdyr. I de mellemliggende år vil der i avlscentrene være fremavlet nye kloner, som sandsynligvis er bedre. Afprøvning af nye kommercielle kloner vil derfor blive en fortløbende aktivitet.

I de første år efter at brugsbesætninger er begyndt at anvende ægtransplantation med kommercielle kloner, vil deres genetiske niveau stige meget stærkt, fordi den genetiske afstand mellem avlsbesætninger og brugsbesætninger indsnævres.

Af Figur 5 fremgår, at mælkeproducenter, som benytter ægtransplantation med embryoner fra kommercielle kloner, allerede få år efter starten af en "kloningsavlsplan" vil være mange års avlsfremgang forud for producenter, som inseminerer med avlstyre fra et konventionelt avlsprogram for malkekvæg. Der mangler imidlertid grundige analyser af, hvordan kloningsavlsplaner skal udformes for at være økonomisk optimale.



Figur 5: Avlsmæssige konsekvenser af anvendelse af kloner i mælkeproduktionen (efter Nicholas og Smith 1983).

5. Effekt af gen-teknologi

Kendskabet til DNA-sekvensers placering og betydning for husdyrenes produktionsevne, sygdomsresistens samt husdyrprodukternes kvalitet vil øges stærkt i de kommende år.

5.1. Genotypning af embryoner

Ved hjælp af den såkaldte PCR-teknik er det muligt at gennemføre DNA-analyser på nogle få celler fra et embryo. Derved kan man afgøre, om det pågældende embryo besidder ønskede eller uønskede anlæg i enkelt- eller dobbelt dosis. På grundlag af denne viden, kombineret med en kvantitativ genetisk evaluering, vil man kunne afgøre, hvilke embryoner der skal overføres til recipienter med henblik på fremstilling af nye avlsdyr. Embryoteknologi og genteknologi vil dermed kunne supplere hinanden. Det vil revolutionere avlsarbejdet, ikke blot inden for kvæg, men også inden for de andre husdyrarter.

5.2. Gen-overførsel

Gen-overførsel åbner desuden mulighed for at overføre arveanlæg mellem arter. I hvilket omfang dette kan udnyttes i husdyravlen er umuligt at afgøre på nuværende tidspunkt. Ønskede gener kan ved gen-overførsel introduceres i racer, som ikke har de pågældende anlæg, og når et gen først er til stede i en husdyrbestand, vil det hurtigt kunne opformeres med traditionelle avlsmetoder.

Produktion af brugsdyr

Produktionsbesætningerne benytter i vid udstrækning avlsmateriale, som er fremavlet i avlsbesætninger eller avlscentre. I det omfang de ovenfor omtalte teknikker kan øge den avlsmæssige fremgang, vil de derfor indirekte få stor betydning for husdyrproduktionen. Virkningen er varig, så længe avls målet fastholdes, og investeringer i avlsmæssige forbedringer har derfor generelt stor afkastningsevne.

Høje fremstillingsomkostninger for embryoner har hidtil begrænset ægtransplantation til at omfatte fremavl af dyr af høj kommerciel værdi. Nogle af de omtalte teknikker kan imidlertid også få betydning for produktion af brugsdyr, idet de muliggør massefremstilling af embryoner med deraf følgende muligheder for at reducere fremstillingsomkostningerne. Den afgørende forudsætning er, at embryoner kan fremstilles til så lave priser, at omkostninger ved fremstilling af det enkelte dyr er mindre end merværdien af det pågældende individ målt i forhold til værdien af produktionsdyr, som fremstilles ved mere traditionelle metoder (inseminering eller naturlig parring). Da værdien af det enkelte produktionsdyr er lav inden for svin og får, vil fremstilling af produktionsdyr ved ægtransplantation især kunne

blive aktuel i kvægbesætninger.

Masseproduktion af embryoner kan ske enten ved in vitro udvikling af æg fra slagtede kvier og køer eller ved kernetransplantation "kloning". Som tidligere nævnt rummer begge metoder mulighed for at fremstille kønsspecifikke embryoner, hvilket i høj grad øger de produktionsmæssige fordele ved at anvende ægransplantation i kvægbesætninger. Klonede embryoner vil repræsentere en betydelig større merværdi end in vitro embryoner, fordi kloner kan "skræddersys" til bestemte formål. Kloningsteknikken har derfor de største potentielle anvendelsesmuligheder i praksis.

1. Malkekvægbesætninger

Af de kviekalve, som fødes, skal kun 60-80% bruges til at forny malkekobestanden. I en malkekvægpopulation er der derfor et overskud af reproduktionskapacitet på 20-40% afhængig af, hvor stort udskiftningsbehovet er. Nogle mælkeproducenter udnytter en del af den overskydende reproduktionskapacitet ved at krydse med kødracetyre og fremstiller derved spædkalve, som er specielt velegnede til kødproduktion. Manglende muligheder for at forudbestemme kalvenes køn har imidlertid begrænset mulighederne, idet krydsningskvierne er uanvendelige til mælkeproduktion. Desuden indebærer den betydelige kønsdimorfisme, som findes i vækstevne, fodereffektivitet og slagtekvælitet, at krydsningskvierne ikke er specielt velegnede til intensiv kødproduktion. Begge disse problemer vil kunne løses ved ægransplantation med kønsspecifikke embryoner. Ved anvendelse af kønsbestemte embryoner vil man tilmed kunne fordoble den overskydende reproduktionskapacitet. Den samlede økonomiske gevinst af den forbedrede effektivitet af produktionen af mælk og kød fra malkekvæggholdet vil derfor være meget stor.

2. Kødkvægbesætninger

Kvægets lave naturlige reproduktionsevne indebærer, at reproduktionsomkostningerne udgør over 50% af de samlede produktionsomkostninger i den selvrekruiterende kødproduktion.

Kødkvægbesætningers produktivitet kan også forbedres betydeligt ved anvendelse af ægransplantation med kønsspecifikke embryoner. Det vil således være muligt at undgå antagonismen mellem materielle egenskaber og produktions- og slagtekvælitetsegenskaber. Det kan ske ved at fremstille opdrættet på grundlag af hunlige embryoner, som har gode materielle egenskaber, dvs. høj frugtbarhed og hårdførhed, mens slagtedyrene kan produceres på grundlag af hanlige embryoner, som besidder stor vækstevne og høj slagtekvælitet.

Desuden vil ægransplantation give mulighed for maksimal udnyttelse af materiel - og individuel heterosis, idet både ko og kalv kan være F_1 -krydsninger. Specielt i den selvrekruiterende kødproduktion kan dette give en betydelig effektivitetsforbedring.

Ægtransplantation kan også benyttes til at øge frekvensen af tvillingefødsler og dermed reducere reproduktionsomkostningerne i kødkvægbesætninger. Det kan ske, enten ved at overføre to embryoner til samme recipient, eller ved at overføre et embryo til recipienter, som er løbet i den foregående brunst. Guerra-Martinez et al. (1990) viste i et produktionsforsøg med 81 enkeltfødende og 145 tvillingefødende ammekøer, at de samlede produktionsomkostninger pr. slagtedyr kan reduceres med 24%, såfremt ammekøer føder tvillinger. I beregningerne blev der ikke taget hensyn til omkostningerne ved at fremstille og overføre embryonerne.

Konklusion

I kvægbruget vil øget produktion af embryoner pr. donor øge den avlsmæssige fremgang i MOET-avlsprogrammer betydeligt. Forbedringen af hundyrenes reproduktionsevne kan ske ved forbedring af den eksisterende superovulationsteknik eller ved opsamling af umodne æg fra levende dyr, efterfulgt af in vitro modning, befrugtning og dyrkning frem til et stadium, hvor de kan videreudvikles i børen på recipienter. Opsamling af umodne æg fra levende dyr er meget arbejdskrævende, og i avlsarbejdet vil superovulation derfor stå stærkt. Superovulation vil imidlertid næppe få særlig stor betydning for produktion af brugsdyr, fordi metoden vanskeligt kan rationaliseres. Derimod kan in vitro embryoner, fremstillet på grundlag af umodne æg fra æggestokke fra slagtede kvier og køer, få stor betydning for produktionen af brugsdyr, specielt hvis det lykkes at fremstille kønsspecifikke embryoner.

Genetisk identiske individer (kloner) kan fremstilles enten ved deling af embryoner eller ved kernetransplantation. Begge metoder kan øge den avlsmæssige fremgang, men da kernetransplantation åbner mulighed for afprøvning af kloner og efterfølgende masseproduktion, har denne teknik størst potentiel betydning for avlsarbejdet. Hvis det lykkes at fremstille klonede embryoner i store oplag, vil det få meget stor betydning for kvægbruget, som vil kunne høste store rationaliseringsgevinster ved at styre kalveproduktionens fordeling på køn og genotype.

Inden for gen-teknologien vil identifikation af gener med virkning på husdyrenes livskraft, produktionsevne og husdyrprodukternes kvalitet få stor avlsmæssig betydning. Med PCR-teknikken er det muligt at gennemføre genotypning af embryoner. Denne kombination af gen-teknologi og embryoteknologi vil være et meget effektivt hjælpemiddel i fremavl af bedre husdyr.

TEKNOLOGI	Potentiel betydning for produktion af:	
	Avlsdyr	Brugsdyr
Superovulation	stor	ingen
In vitro embryoner	nogen	stor
Kønsspecifikke embryoner	ringe	stor
Deling af embryoner	nogen	ingen
Kernetransplantation ("kloning")	stor	meget stor
Gen-identifikation *)	meget stor	ingen
Gen-transplantation	?	ingen

*) ud over kønsbestemmelse

Litteraturliste

- Christensen, L.G. og Liboriussen, T., 1986. Embryo transfer in the genetic improvement of Dairy Cattle. Proc. EEC-seminar "Exploiting new Technologies in Animal Breeding". Edd. C. Smith, J.W.B. King og J.C. McKay. Oxford Science Public.: 37-46.
- Christensen, L.G., 1991. Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology* 35: 141-149.
- Colleau, J.J., 1985. Genetic improvement by ET within selection nuclei in Dairy Cattle. *Genet. Sel. Evol.* 17: 499-538.
- Colleau, J.J., 1989. The genetics of dairy MOETs. Proc. EAAP-Seminar "New selection schemes in Cattle: Nucleus programmes". Edd. E. Kalm og T. Liboriussen. Pudoc, Wageningen: 55-63.
- Colleau, J.J., 1991. Using Embryo sexing within closed mixed multiple ovulation and Embryo Transfer Schemes for Selection on Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 74: 3973-3984.
- Colleau, J.J., 1992. Combining use of sexing and cloning within closed mixed MOETs for Selection on Dairy Cattle. *Geneti. Sel. Evol.* (in press)
- De Boer, I.J.M. og Arendonk, J.A.M., 1991. Genetic and clonal responses in closed dairy nucleus schemes. *Anim. Prod.* 53: 1-9.

- Fewson, D., 1989. Economic aspects of MOET Breeding Schemes. Proc. EAAP-Seminar "New selection schemes in Cattle: Nucleus programmes". Edd. E. Kalm og T. Liboriussen. Pudoc, Wageningen: 143-160.
- Guerra-Martinez, P., Dickerson, G.E., Anderson, G.B. og Green, R.D., 1990. Embryo-Transfer Twinning and Performance Efficiency in Beef Production. J. Anim. Sci. 68: 4039-4050.
- Hansen, M. og Neimann-Sørensen, A., 1974. Possibilities of using Egg Transplantation in practical Cattle Breeding. SHS-Meddelande nr. 75: 102-111.
- Keller, D.S. og Teepker, G., 1990. Effect of Variability in Response to Superovulation on Donor Cow Selection Differentials in Nucleus Breeding Schemes. J. Dairy Sci. 73: 549-554.
- Kinghorn, B.P., Smith, C. og Dekkers, J.C.M., 1991. Potential Genetic Gains in Dairy Cattle with Gamete Harvesting and In Vitro Fertilization. J. Dairy Sci. 74: 611-622.
- Land, R.B. og Hill, W.G., 1975. The possible use of Superovulation and Embryo Transfer in Cattle to increase response to selection. Anim. Prod. 21: 1-12.
- Meuwissen, T.H.E., 1991. Expectation and variance of genetic gain in open and closed nucleus and progeny testing schemes. Anim. Prod. 53: 133-142.
- Nicholas, F. og Smith, C., 1983. Increased rates of genetic change in dairy cattle by Embryo Transfer and Splitting. Anim. Prod. 36: 341-353.
- Ruane, J. og Thomson, R., 1989. Simulation of an adult multiple ovulation and embryo transfer (MOET) nucleus breeding scheme in dairy cattle. Proc. EAAP-Seminar "New selection schemes in Cattle: Nucleus programmes". Edd. E. Kalm og T. Liboriussen. Pudoc, Wageningen: 143-160.
- Ruane, J., 1991. The effect of alternative mating designs and selection strategies on adult multiple ovulation and embryo transfer (MOET) nucleus breeding schemes in dairy cattle. Genet. Sel. Evol. 23: 47-65.
- Smith, C., 1989. Cloning and genetic improvement of beef cattle. Anim. Prod. 49: 49-62.
- Teepker, G. og Smith, C., 1989. Combining clonal response and genetic response in dairy cattle improvement. Anim. Prod. 49: 163-169.
- Woolliams, J.A., 1989. The Value of Cloning in MOET Nucleus Breeding Schemes for Dairy Cattle. Anim. Prod. 48: 31-35.