

Biotechnologie: Neue Möglichkeiten für die tierzüchterische Forschung und Praxis

HEINER NIEMANN

Institut für Tierzucht und Tierverhalten

Nach dem 2. Weltkrieg haben Erkenntnisse der Populationsgenetik und Statistik die Anwendung spezifischer Zuchtverfahren erlaubt, von denen biotechnologische Verfahren wie die künstliche Besamung integrale Bestandteile wurden. Während der 70er und der frühen 80er Jahre wurden dann weitere Biotechniken wie die Brunstsynchrisation, die Geburtensteuerung und der Embryotransfer bis zur Praxisreife entwickelt. Der Embryotransfer wird als effektives Verfahren zur Steigerung der weiblichen Reproduktionskapazität zur Zeit vielfach in der Praxis der Rinderproduktion eingesetzt. In den alten Bundesländern wurden im letzten Jahr etwa 3500 Spülungen und 17000 Transfers vorgenommen, was einen Anteil von 0,3 %, bezogen auf die etwa 5 Mio. weiblichen Rinder, ausmacht. Heute sind Eizellen und Embryonen leicht zugänglich und deshalb wurden weitere Biotechniken im Zusammenhang mit der unbefruchteten oder befruchteten Eizelle entwickelt, die in den Augen vieler Menschen mit dem Begriff 'Biotechnologie' gleichgesetzt werden. Diese sogenannten Embryotransfer assoziierten Biotechniken sind: Tiefgefrierkonservierung von Eizellen und Embryonen, Embryonenteilung, Geschlechtsbestimmung, In-vitro-Produktion von Embryonen, Klonen, Chimären und Gentransfer.

Im Forschungsbereich Biotechnologie des Instituts wurden in den letzten Jahren wissenschaftliche Probleme bei einigen dieser Verfahren intensiv bearbeitet. Dies hat beispielsweise zur Entwicklung in der Praxis anwendbarer Kryokonservierungsverfahren für Rinder- und Schafembryonen geführt, zu methodischen Verbesserungen bei der Superovulationsantwort beim Rind und in der praktischen Anwendung des Embryotransfers beim Schwein oder wie kürzlich in der In-vitro-Produktion von Rinderembryonen. Auf der anderen Seite wurden in letzter Zeit Arbeiten in Angriff genommen, die in der Zukunft von großer Bedeutung sein können, wie die Multiplikation einzelner Blastomeren und der Gentransfer zur Erstellung transgener Tiere, die pharmazeutische Proteine in der Milch sezernieren. Im folgenden werde ich anhand von drei Themenbereichen,

- der Tiefgefrierkonservierung von Rinderembryonen,
- der Multiplikation von einzelnen Blastomeren und
- dem Gentransfer

den Entwicklungsstand und gegenwärtige sowie zukünftige Möglichkeiten dieser Verfahren für die tierzüchterische Forschung und Praxis diskutieren.

Tiefgefrierkonservierung von Rinderembryonen

Im Jahre 1973 wurde erstmals über die Geburt eines Kalbes nach Transfer eines tiefgefrorenen und aufgetauten Rinderembryos berichtet. Seitdem wurden bedeutende Fortschritte beim Tiefgefrieren von Rinderembryonen erzielt und heute

können deshalb Morula- und Blastozystenstadien, also die Embryonalstadien, die unblutig gewonnen und übertragen werden können, mit hohen Erfolgsquoten tiefgefroren und aufgetaut werden. Basierend auf kryobiologischen Prinzipien, die ursprünglich in Lymphozyten oder Fibroblasten studiert wurden, wurde eine Vielzahl von Verfahren entwickelt, die ähnliche Trächtigkeitsraten erlauben wie nach unblutigem Transfer frischgewonnener Embryonen. Die Tiefgefrierkonservierung von Säugerembryonen kann heute durch sogenannte kontrollierte Gefrier- und Auftauverfahren, das 'One-step'-Verfahren, durch Vitrifikation oder ultraschnelles Gefrieren erreicht werden. Gegenwärtig sind nur die ersten beiden genannten Methoden bis zur Praxisreife entwickelt worden. In umfangreichen eigenen Versuchen wurde ein kontrolliertes Tiefgefrier- und Auftauverfahren für Rinderembryonen im Morula- und Blastozystenstadium entwickelt, das heute von vielen Arbeitsgruppen in der Praxis eingesetzt wird und zuverlässig mit hohen Erfolgsquoten arbeitet. Dieses Verfahren beinhaltet die folgenden Schritte:

1. Zugabe eines Kryoprotektivums,
2. Einfüllen der Embryonen in geeignete Gefriergefäße,
3. Überführung in eine Gefriermaschine,
4. Auslösung der Kristallisation,
5. eine langsame Kühlungsphase,
6. Überführen und Lagerung in flüssigem Stickstoff (-196 °C),
7. Auftauen der Gefäße,
8. Entfernung des Kryoprotektivums.

Die Gegenwart eines Gefrierschutzmittels ist erforderlich, um Schädigungen der Embryonen während des Gefrierens und Auftauens zu vermeiden. Überwiegend werden penetrierende Kryoprotektiva, wie Glycerin und Dimethylsulfoxid (DMSO) bei Rinderembryonen verwandt. Da durch die Anwesenheit des Gefrierschutzmittels die Osmolarität im Medium dramatisch ansteigt, was die Embryonen schädigen kann, wurden diese Substanzen meist schrittweise zugegeben, um den Embryonen genügend Zeit zur Anpassung an die sich ändernden osmotischen Bedingungen zu geben. Experimente in unserem Labor haben deutlich gezeigt, daß die einstufige Zugabe einer Endkonzentration von 1,4 M Glycerin in gleich hohen Überlebensraten resultiert wie die schrittweise Zugabe. Die beobachtete Schrumpfung und nachfolgende Reexpansion kann sogar als Anzeichen der embryonalen Vitalität angesehen werden. Die einstufige Zugabe beschleunigt und vereinfacht den gesamten Prozeß erheblich was für die Anwendung unter Feldbedingungen wichtig ist. Nach der Gefrierschutzmittelzugabe ist das Einfüllen der Embryonen in passende Behälter der nächste Schritt. In eigenen Untersuchungen konnte bereits vor einigen Jahren gezeigt werden, daß die Anwendung von Straws (feine Pailletten) als Embryonenbehälter ein sehr wichtiger Schritt war, um die Ergebnisse im Vergleich zu Glasampullen oder Plastikröhrchen zu verbes-

sern. Straws haben einen erheblich geringeren Durchmesser, eine dünnere Wand und enthalten einen wesentlich geringeren Anteil an Flüssigkeit, was insgesamt zu einem verbesserten Seedingprozeß (= Induktion der Eiskristallbildung) und somit zu einer Verbesserung der Überlebensrate der Embryonen führt. Wegen der hohen Empfindlichkeit individueller Chargen gegenüber dem Gefrierprozeß ist es jedoch notwendig, jede Charge von Straws vor kommerziellem oder experimentellem Gebrauch zu testen.

Eine geeignete Gefriermaschine ist der aufwendigste Bestandteil bei der Kryokonservierung von Embryonen, wobei eine Vielzahl von speziellen, sehr teuren Maschinen, die verschiedene Gefrier- und Auftauprogramme ermöglichen, verfügbar ist. Die meisten dieser Gefriermaschinen nutzen computerkontrollierte Kühlraten und flüssigen Stickstoff als Kühlmedium. Aber auch wesentlich kostengünstigere Alkoholbäder, in denen die Straws direkt in Äthanol eingestellt und dann durch einen Kompressor heruntergekühlt werden, sind verfügbar. Wir haben vor einigen Jahren eine aufwendige, tragbare Gefriermaschine und ein Alkoholbad miteinander verglichen und gleich hohe Trächtigkeitsraten (59% bzw. 60%) mit beiden Typen erzielt. Von besonderer Bedeutung ist es, reinen Alkohol in einem genügenden Spiegel im Gerät vorhanden zu haben. Bei Temperaturen von etwa -6 bis -7 °C ist es notwendig, die Eiskristallbildung in den Proben zu induzieren, um ein exzessives Unterkühlen der Embryonen zu verhindern. Dies wird bei Alkoholbädern meist durch kurzzeitiges Berühren mit einer unterkühlten Pinzette erreicht. Das Alkoholbad ist von speziellem Interesse für kommerzielle Embryotransfer-Gruppen, da der Preis nur etwa halb so hoch ist wie der von den anderen Gefriermaschinen.

Nach dem Seeding beginnt der eigentliche Gefrierprozeß, wobei heute fast ausschließlich sogenannte 'schnelle' Gefrierverfahren benutzt werden. Das bedeutet, daß langsam bis auf -30 bis -35 °C heruntergekühlt und dann direkt in flüssigen Stickstoff eingetaucht wird. Dadurch wird es aufgrund kryobiologischer Gesetzmäßigkeiten möglich, die Embryonen schnell später wieder aufzutauen. Während des langsamen Kühlens bis auf -35 °C geht der Großteil des intrazellulären Wassers aufgrund eines osmotischen Gradienten aus den Blastomeren heraus. Um eine vollständige Dehydrierung der Embryonen zu erreichen, müßte bis etwa -50 bis -60 °C langsam gekühlt werden. Die Embryonen enthalten somit beim Eintauchen in den flüssigen Stickstoff noch einen gewissen Anteil Wasser, der dann zu kleinen aber unschädlichen Eiskristallen gefriert. Die von uns entwickelte Methode mit der Überführung der Proben bei -35 °C in flüssigen Stickstoff führt offenbar zu einem guten Gleichgewicht zwischen Dehydrierung und intrazellulärer Eisbildung, was in hohen Überlebensraten resultiert. Im Stickstoffcontainer sind die Embryonen im Prinzip unbegrenzt haltbar. Beim schnellen Auftauen werden die Embryonen direkt aus flüssigem Stickstoff an der Luft aufgetaut und anschließend das Gefrierschutzmittel Glycerin aus dem Medium mit den Embryonen entfernt. Die Kryoprotectiva müssen von aufgetauten Zellen aufgrund ihrer Toxizität bei höheren Temperaturen entfernt werden. Dabei hatte die Verwendung von Sucrose einen sehr günstigen Effekt auf die Entwicklung der Embryonen. Sucrose ist eine Zuckersubstanz, die den osmotischen Schock während der Ausverdünnung des Gefrierschutzmittels weitgehend verhindert. Durch den Einsatz der Sucrose beim Ausverdünnen des Gefrierschutzmittels wurde einmal eine erhebliche Verbesserung der Überlebensraten und zum zweiten eine deutliche Verkürzung des gesamten Prozesses erreicht (10 Min. gegenüber etwa 60 Min.). Das von uns entwickelte und heute in der Praxis vielfach angewandte Verfahren sieht im einzelnen wie folgt aus:

1. Direkte Zugabe einer Endkonzentration von 1,4 M Glycerin mit 20-minütiger Äquilibration bei Raumtemperatur,
2. Aufziehen der Embryonen in 0,25 ml Straws
3. Transfer der Straws in ein Alkoholbad, was bereits auf -7°C heruntergekühlt ist
4. Auslösung der Eiskristallbildung mit einer unterkühlten Pinzette
5. langsames Kühlen von -7 bis -28°C mit 0,3 °C/Min.
6. langsames Kühlen von -28 bis -35 °C mit 0,1 °C/Min.
7. Überführung in flüssigen Stickstoff
8. Auftauen an der Luft bei Raumtemperatur
9. Entfernung des Kryoprotektivums mit Hilfe von Sucrose in zwei Schritten.

Dieses Verfahren resultiert zuverlässig in Überlebensraten, basierend auf morphologischer Beurteilung, von 95 bis 100%, und Trächtigkeitsraten von 50 bis 60% können nach unblutigem Transfer erzielt werden. Während der Entwicklung des beschriebenen Gefrierverfahrens haben wir in einer Reihe von Experimenten verschiedene Einflußfaktoren, wie die Embryonenqualität, das embryonale Entwicklungsstadium und das Empfängertier (Plasmaprogesteronspiegel zum Zeitpunkt des Transfers) charakterisiert.

Die Tiefgefrierkonservierung von Embryonen bietet für die Tierzucht einige wichtige Vorteile. So wird die Langzeitkonservierung wertvollen genetischen Materials möglich und es können Embryonenbanken zur Erhaltung selten gewordener Nutztierassen angelegt werden. Auch dazu wurden in der jüngsten Vergangenheit von unserer Arbeitsgruppe einige erfolgreiche Untersuchungen durchgeführt. Das Halten großer Empfängerherden wird überflüssig, da der Transfer unabhängig vom Gewinnungstermin gestaltet werden kann, was eine erhebliche Reduzierung der Kosten bedeutet. Weiterhin wird der Im- und Export von genetischem Material entscheidend vereinfacht. Es würde auch die erfolgreiche Erstellung von zeitgleich geborenen monozygoten Zwillingspaaren durch Tiefgefrierkonservierung von Embryonenhälften neue erfolgversprechende tierzüchterische Strategien ermöglichen.

Es bleiben aber noch eine Reihe von ungelösten Problemen für die Forschung. Beispielsweise konnten Schweineembryonen noch nicht eingefroren werden. Weiterhin sind unbefruchtete Eizellen (Oozyten) von landwirtschaftlichen Nutztieren noch nicht erfolgreich, d.h. mit nachfolgender In-vitro-Fertilisation und Erstellung von Jungtieren eingefroren worden. Auch die Tiefgefrierkonservierung von frühen Embryonalstadien (Zygoten, 2- und 4-Zellstadien), die von besonderem Interesse im Zusammenhang mit dem Gentransfer sind, befindet sich noch in einem sehr frühen Experimentalstadium. Ebenso sind die Ergebnisse in der Tiefgefrierkonservierung von Embryonen nach verschiedenen mikrochirurgischen Eingriffen (Teilung, Chimären, Klonen) unzureichend. Auf diese Bereiche konzentrieren sich gegenwärtig unsere Bemühungen.

Entwicklungskapazität isolierter Blastomeren vom Schwein

Isolierte Blastomeren von Säugerembryonen haben in der jüngsten Vergangenheit besondere Aufmerksamkeit und Bedeutung für Zwecke der Multiplikation wertvoller Genotypen (Klonen) und zur Verwendung von DNA-Sonden zur Geschlechtsbestimmung oder zur Feststellung genetischer Defekte erlangt. Jedoch ist die Entwicklung isolierter Blastomeren in normalen Kulturmedien äußerst begrenzt, was einen weiteren Einblick in ihr Entwicklungspotential in vitro bisher verhindert hat. Wir haben in einer ausführlichen Studie extrazelluläre Matrizen und Wachstumsfaktoren in ihrer Fähigkeit

untersucht, das Wachstum von isolierten Schweineblastomeren zu unterstützen. Extrazelluläre Matrizen wie Collagen IV, Laminin, Fibronectin sind Glycoproteine und haben vielfältige physiologische Funktionen, beispielsweise in der zellulären Adhäsion, in der Aufrechterhaltung der zellulären Morphologie und der Zytoskelettorganisation, der Homöostase, Phagozytose und auch in der embryonalen Differenzierung. Für diese Untersuchungen wurden Blastomeren von 4-, 8- und 16-Embryonen vereinzelt und ihr Entwicklungspotential in drei verschiedenen Medien mit zwei verschiedenen extrazellulären Matrizen (Fibronectin und Swine-Skin-Gelatine) untersucht. Außerdem wurde die Entwicklungskapazität von isolierten 8-Zellblastomeren in Gegenwart von Insulin, Transferrin oder cAMP geprüft. Die Blastozystenbildungsrate war am höchsten, wenn die Kombination von Krebs-Ringer-Bicarbonat (KRB) Medium und Fibronectin benutzt wurde und erreichte 44,3% für die 1/4-Blastomeren, 41,8% für die 1/8-Blastomeren und 36,5% für die 1/16-Blastomeren. Diese Blastozysten enthielten durchschnittlich 30, 58 bzw. 19 Kerne und hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von 250, 235 bzw. 173 µm. Blastomeren aus 8-Zellembryonen wiesen damit ähnliche Werte auf wie 'normale' Blastozysten. 1/8-Blastomeren zeigten auch eine deutlich bessere Wachstumsrate als 1/4- und 1/16-Blastomeren. Weder cAMP noch Transferrin hatten einen stimulierenden Effekt auf die Blastozystenentwicklung, jedoch führte die Anwesenheit von Insulin und Lammserum zu einer deutlichen Steigerung der Blastozystenrate (40% bzw. 59%) bei einer Konzentration von 10 bzw. 100 µg/ml Insulin. Der Transfer von über 450 Blastozysten, die für 24 Std. in einer Kombination von Fibronectin und KRB kultiviert worden waren, auf 16 Empfängertiere führte zu 3 Trächtigkeiten mit der Geburt von 2 Würfen aus 8-Zellblastomeren. Aus diesen Untersuchungen kann abgeleitet werden, daß

- 1) 1/8-Blastomeren ein größeres Entwicklungspotential haben als 1/4- und 1/16-Blastomeren,
- 2) daß Fibronectinbeschichtung der Kulturschalen die Blastozystenentwicklung von 1/8- und 1/16-Blastomeren deutlich verbessert,
- 3) daß Insulin in serumangereichertem Kulturmedium die Blastozystenentwicklung von 1/8-Blastomeren stark verbessert und
- 4) einige der 1/8-Blastomeren eine volle Entwicklungskapazität bis zum geborenen Jungtier haben. Diese Ferkel sind die ersten, die nach Transfer von einzelnen Blastomeren aus 8-Zellembryonen bisher geboren wurden.

Neben der erheblichen Erweiterung des embryologischen Grundlagenwissens haben diese Ergebnisse große Bedeutung für die Erzeugung identischer Mehrlinge, da dieses relativ einfach zu handhabende Verfahren erhebliche Vorteile gegenüber den aufwendigen, gegenwärtigen Klonierungsmethoden bietet. Wir sind derzeit dabei, den Einfluß verschiedener rekombinanter Wachstumsfaktoren auf das Entwicklungspotential von isolierten Blastomeren zu untersuchen und besonders zu prüfen, inwieweit dieses Verfahren zur Erstellung identischer Mehrlinge geeignet ist.

Gentransfer beim Schaf zur Erzeugung transgener Tiere, die pharmazeutische Proteine in der Milch sezernieren

Der Gentransfer beim Nutztier ist nur ein Schritt im Ablauf einer möglichen genetischen Veränderung von landwirtschaftlichen Nutztieren. Dazu gehören:

1. Identifizierung von Genen,
2. Klonierung der Gene (in Bakterien),
3. Erstellung eines geeigneten Genkonstrukts,
4. Transfer des Gens,
5. Feststellung der Inkorporation des Fremdgens,
6. Beurteilung der Genexpression,
7. Untersuchung der Übertragung auf Nachkommen,
8. Selektive Züchtung.

Identifizierung und Klonieren von Genen sowie die Erstellung eines geeigneten Genkonstrukts, d.h. Zusammenbringen des Strukturgens mit Regulationselementen (Promotor) werden in molekularbiologischen Laboratorien vorgenommen. Zum eigentlichen Gentransfer werden reproduktionstechnologische Erkenntnisse benötigt. Dieser beinhaltet folgende Einzelschritte:

1. Erstellung geeigneter Mikroinstrumente,
2. Herstellung einer injizierbaren DNA-Lösung mit dem gewünschten Genkonstrukt,
3. Gewinnung geeigneter befruchteter Eizellen (Zygoten),
4. Sichtbarmachung der Kernstrukturen,
5. Mikroinjektion in Vorkerne/Kerne,
6. In-vitro-Kultur,
7. Transfer der injizierten Zygoten auf synchronisierte Empfängertiere.

Der Gentransfer wird heute beim landwirtschaftlichen Nutztier im wesentlichen über die Mikroinjektion durchgeführt. Dabei ist ein wesentliches Problem die Sichtbarmachung der entsprechenden Kernstrukturen. Beim Schwein kann dies durch eine kurzzeitige Zentrifugation erreicht werden, während bei Rind und Schaf dafür eine geeignete mikroskopische Ausrüstung (Interferenzphasenkontrast) notwendig ist. Damit können in etwa 80% bis 85% der Fälle die Kerne der Mikroinjektion zugänglich gemacht werden. Bei der Mikroinjektion werden etwa 2 pl DNA-Lösung mit Hilfe einer sehr feinen Mikropipette in den Vorkern oder Kern injiziert, wobei das Anschwellen als Erfolgskontrolle dient. Transgene Nachkommen sind mit Hilfe der Mikroinjektionstechnik bei allen landwirtschaftlichen Nutztieren bisher erzielt worden. Jedoch ist die Effizienz mit weniger als 1% der injizierten Zygoten, die sich zu transgenen Nachkommen entwickelten, äußerst gering. Die eigenen Arbeiten haben zum Ziel, das Schaf als Tiermodell zu entwickeln, in dem die Produktion pharmazeutisch interessanter Proteine in der Milchdrüse studiert werden kann. Dies wird in einer langfristigen Kooperation mit einer molekularbiologischen Arbeitseinheit vom Fraunhofer Institut für Toxikologie und Molekularbiologie in Hannover versucht zu erreichen. Wir haben dazu im letzten Jahr das gesamte System der Zygotenproduktion und Mikroinjektion beim Schaf aufgebaut und über 130 Transfers mit mikroinjizierten Zygoten durchgeführt. Im Gegensatz zu allen bisherigen Erfahrungen konnten wir eine sehr hohe Trächtigkeitsrate von 60% erreichen. Unter den geborenen und bisher getesteten 109 Nachkommen wurden drei transgene Lämmer festgestellt. In den nächsten Jahren werden wir diese Tiere molekularbiologisch und physiologisch charakterisieren und die mögliche Expression in der Laktation untersuchen. Diese Untersuchungen können erhebliche Bedeutung für die Produktion pharmazeutischer Proteine haben, deren Produktion nicht oder nur mit ganz großen Schwierigkeiten über das Bakteriensystem möglich ist. Insbesondere hoffen wir, das bereits glycosilierte Endprodukt zu erhalten, was von den Bakterien nicht erreicht werden kann. Weitere wesentliche Anwendungsbereiche des Gentransfers werden gesehen in der Modifikation der Laktation in bezug auf Milchmenge, des Wachstums (Zunahme, Futtermittelverwertung, Wachstumsrate), der Steigerung der Krankheitsresistenz, Veränderung der Mikroflora im Vormagen von Wiederkäuern; beim Schaf auch in der Verbesserung der

Wollproduktion sowie in der Grundlagenforschung, speziell der Krebsforschung. Der Gentransfer befindet sich noch in einem frühen experimentellen Stadium, wobei vorrangig die Verbesserung der Effizienz der Transfermethode erscheint.

Die drei hier kurz skizzierten Beispiele biotechnologischer Forschungsarbeiten im Institut machen deutlich, welches großes zukunftssträchtiges Entwicklungspotential diese Verfahren beinhalten. Wir werden auch weiterhin unsere Arbeiten fortführen und dazu beitragen, die Diskussion auf diesem Sektor, die vielfach unsachlich und emotional geführt wird, mit rationalen Argumenten zu bestreiten. Dies ist von besonderer Bedeutung, damit auch in der Zukunft in Deutschland eine international konkurrenzfähige Forschung auf diesem zukunftssträchtigen Gebiet durchgeführt werden kann.

Literatur

- Niemann, H.; H.-H. Döpke; B. Sacher; E. Schilling: Tiefgefrieren von Rinderembryonen in Plastikstraws mit Ausverdünnung des Gefrierschutzmittels durch Sucrose. - *Zuchthygiene* 16, S. 201-205 (1981).
- Niemann, H.; B. Sacher; E. Schilling; D. Smidt: Qualität und Überlebensrate von Rinderembryonen nach schnellem Tiefgefrieren und Auftauen. - *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 95, S. 415-419 (1982).
- Niemann, H.; W.W. Lampeter; B. Sacher; B. Kruff: Comparison of survival rates of day 7 and day 8 bovine blastocysts after fast freezing and thawing. - *Theriogenology* 18, S. 445-452 (1982).
- Niemann, H.; M.J. Illera; P.J. Dziuk: Developmental capacity, size and number of nuclei in pig embryos cultured in vitro. - *Anim. Reprod. Sci.* 5, S. 311-321 (1983).
- Niemann, H.: Theorie und Praxis der Tiefgefrierkonservierung von Rinderembryonen (Übersichtsreferat) - *Dt. Tierärztl. Wschr.* 90, S. 109-114 (1983).
- Niemann, H.: Freezing of bovine embryos: Effects of a one-step addition of 1.4 M glycerol. - *Theriogenology* 23, S. 369-379 (1985).
- Niemann, H.; B. Sacher; F. Elsaesser: Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen/thawed embryos. - *Theriogenology* 23, S. 631-639 (1985).
- Niemann, H. and D. Smidt: An update on cryopreservation of bovine embryos. - *Proc. Intern. Symposium on Biotechnology, Budapest (Ungarn), 23.8.1985*, pp. 126-141 (1985).
- Niemann, H. und D. Smidt: Tiefgefrieren von Rinderembryonen: Methoden und Einflussfaktoren. - *Landbauforschung Völkenrode* 35, S. 205-211 (1985).
- Niemann, H.; G. Brem; B. Sacher; D. Smidt; H. Kräußlich: An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine embryos. - *Theriogenology* 25, S. 519-524 (1986).
- Niemann, H.: Recent results of freezing experiments with embryos from farm animals. - *Proc. Workshop on Embryos and Oocytes Freezing. Collection Fondation Marcel Merieux, Hrsg. Y. Menezo and Ch. Merieux*, S. 195-204 (1986).
- Niemann, H.; J.H. Pryor; K.R. Bondioli: Effects of slitting the zona pellucida and its subsequent sealing on freeze-thaw survival of day 7 bovine embryos. - *Theriogenology* 28, S. 675-681 (1987).
- Niemann, H. und D. Smidt: Aktuelle Methoden der Kryokonservierung von Embryonen landwirtschaftlicher Nutztiere. - *17. Kongr.-Bericht der Dt. Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Bad Nauheim*, S. 478-481 (1987).
- Niemann, H.: Tiefgefrieren von Embryonen landwirtschaftlicher Nutztiere: Entwicklungsstand, Methoden und Anwendungsbereiche. - *Der Praktische Tierarzt* 69, S. 29-34 (1988).
- Sacher, B. und H. Niemann: Erhaltung tierischer Genreserven mit Hilfe biotechnologischer Verfahren. - In: *Berichte über die Landwirtschaft*, 201. Sonderheft "Biotechnologie in der Agrar- und Ernährungswissenschaft", S. 422-430, Verlag Paul Parey, Berlin (1989).
- Niemann, H.; A. Wüst; J.C. Gardon: Successful intercontinental transport of porcine embryos from Europe to South America. - *Theriogenology* 31, S. 525-530 (1989).
- Niemann, H.: Cryopreservation of bovine embryos in the field. - *Embryo Transfer Newsletter* 8, S. 5-7 (1990).
- Niemann, H.: Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. - *Theriogenology* 35, S. 109-124 (1991).
- Herrler, A.; D. Rath; H. Niemann: Effects of cryoprotectants on fertilization and cleavage of bovine oocytes in vitro. - *Theriogenology* 35, S. 212 (Abstr.) (1991).
- Lucas-Hahn, A. and H. Niemann: Cryopreservation of isolated bovine blastomeres. - *Theriogenology* 35, S. 235 (Abstr.) (1991).
- Saito, S. and H. Niemann: Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. - *Biol. Reprod.* 44, S. 927-936 (1991).
- Nienhaus, P.: Untersuchungen zur Anlage von Genomreserven mit biotechnologischen Methoden beim Deutschen Schwarzbunten (DSB) Rind alten Typs. - *Diss. Tierärztliche Hochschule, Hannover*, 1990.
- Verfasser: Niemann, Heiner, Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil., Priv. Doz., Institut für Tierzucht und Tierverhalten Mariensee der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Professor Dr. med. vet. Dr. sc. agr. Dr. med. vet. h. c. Diedrich Smidt.