

3 Material und Methoden

3.1 Kurzcharakteristik der Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden vergleichsweise an den Embryonen zweier wirtschaftlich bedeutenden Vogelarten durchgeführt, die sich hinsichtlich ihres Praecocialstatus unterscheiden. Modelltiere für die Untersuchungen waren die Moschusente (*Cairina moschata forma domestica*) und das Haushuhn (*Gallus gallus forma domestica*). Beide Rassen wurden unter anderem deshalb gewählt, weil bisher durchgeführte Untersuchungen zur frühen Ontogenese physiologischer Systeme innerhalb der Arbeitsgruppe und von anderen Autoren an Embryonen dieser Spezies erfolgten und umfangreiche Kenntnisse sowohl zur pränatalen als auch zur postnatalen Entwicklung vorlagen. Die Moschusente wurde des weiteren verwendet, da sie weit verbreitet und wirtschaftlich bedeutend ist sowie eine gute Schlupfleistung aufweist. Sie zeichnet sich durch eine relativ lange Brutdauer (34-36 Tage) aus und gehört zur Ordnung der *Anseriformes*, die sich durch besondere Frühreife auszeichnen und generell einen hohen Praecocialstatus aufweisen (STARCK *et al* 1998). Die Haushuhnrasse "Weißes Leghorn" wurde gewählt, weil sie die in der modernen Geflügelzucht weltweit verbreitetste Rasse ist. Dies liegt vor allem darin begründet, dass diese Rasse die wirtschaftlich wichtigen Merkmale in hervorragender Weise vereinigt: So zeichnet sie sich unter anderem durch hohe Legeleistung bei relativ konstantem Eigewicht, günstige Futtermittelverwertung, schwache Brütigkeit und hohe Fruchtbarkeit, auch bei Kunstbrut, aus. *Galliformes*, gehören ebenfalls zu den Arten mit hohem Praecocialstatus. Dennoch ist der Praecocialstatus der *Anseriformes* höher (STARCK *et al.*, 1998). Die Brutdauer vom "Weißen Leghorn" ist kürzer als die der Enten und beträgt 21 Tage.

Die Enteneier wurden von der Firma Grimaud & Brinkmann GmbH (Balve-Beckum), die Hühnereier von der Firma Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven) bezogen.

3.2 Brutparameter

Die Bebrütung der befruchteten Eier erfolgte in einem Brutschrank mit automatischer Wendung der Eier und Ventilationssystem.

Der Tag der Einlage der Eier in den Brutschrank wurde als 1. Bruttag definiert. Hierzu gibt es jedoch unterschiedliche Auffassungen. GOTTLIEB und KUO (1965) zum Beispiel bezeichnen den Tag der Ei-Einlage in den Brutschrank als BT 0. Diese Bezeichnung herrscht auch in der Geflügelindustrie vor. Andere Autoren wie VINCE und TOLHURST (1975) sowie GOLDHAMMER (2003) definieren diesen Tag in ihrer Berechnung der Bruttage als BT 1.

Kalt erbrütete Embryonen wurden während der ersten zwei Drittel ihrer Brutdauer bei 37,5°C bebrütet (Ente 28 Tage, Huhn 17 Tage). Während dieser Zeit befanden sich die Eier in horizontaler Lage in einem Brutschrank mit automatischer, kontinuierlicher Wendung bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 – 70 %. Danach wurden sie in den Schlupfschrank verbracht. Die Bebrütungstemperatur betrug hier 34,5°C (Adaptationstemperatur), die relative Feuchtigkeit ca. 90%. Bei den **normal erbrüteten** Embryonen betrug die T_{Brut} auch im Schlupfschrank 37,5°C (Kontrolle). Die übrigen Brutbedingungen entsprachen denen der Kalterbrüteten. Die Eier wurden hier nicht mehr gewendet.

Während der Brut wurden die Eier mindestens zwei Mal geschickt (durchleuchtet), um ihren Entwicklungsstand zu kontrollieren.

3.3 Umfang der Untersuchungen

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden sowohl *Kurz-* als auch *Langzeitversuche* durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung folgt in den Abschnitten 3.6 und 3.7.

Die *Kurzzeitversuche* dauerten 7 h und gliederten sich in eine dreistündige Adaptationsphase, bei der die Embryonen der T_{Brut} ausgesetzt waren, gefolgt von einer dreistündigen Phase mit thermischer Stimulierung durch T_{U} -Absenkung um 3°C (Tabelle 1) und einer dritten Phase, in der für eine Stunde zur Ausgangstemperatur zurückgekehrt wurde. Zusätzlich wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, in der, stichprobenhaft an einigen Bruttagen, kalt erbrütete Hühner- und Entenembryonen bei einer

Ausgangstemperatur von 37,5°C in den Versuch eingesetzt wurden und für drei Stunden bei ihrer T_{Brut} (34,5°C) untersucht wurden.

Die *Langzeitversuche* erstreckten sich dagegen über eine geplante Zeitdauer von zwei Tagen (Tabelle 2) und wurden ausschließlich an Moschusentenembryonen durchgeführt. Dabei verblieben die Embryonen die letzten 1 - 2 Tage bis zum Schlupf in der Versuchsanordnung. Während dieser Versuche wurden bis zu drei Temperaturabsenkungen, die denen der Kurzzeitversuche entsprachen, durchgeführt.

Tabelle 1: Schema der in der vorliegenden Arbeit berücksichtigten Kurzzeitversuche. Je Altersstufe und Versuchsbedingung wurden mindestens 5 Embryonen untersucht. Die kursiv dargestellten Versuche dienen dem Vergleich und entstammen den Untersuchungen von Janke (2002).

Tierart	Bruttemperatur	Temperaturänderung im Versuchsverlauf		
		34,5°C → 31,5°C → 34,5°C	37,5°C → 34,5°C	37,5°C → 31,5°C
Moschusente	34,5°C	30., 32., 34. bis 37. BT	30., 32., 34. und 36. BT	
	<i>37,5°C</i>		<i>30.-35. BT</i>	<i>30.-35. BT</i>
Haushuhn	34,5°C	18.-24. BT	18., 29., 22. und 24. BT	
	<i>37,5°C</i>		<i>18.- 22. BT</i>	<i>18.- 22. BT</i>

Tabelle 2: Umfang der Langzeitversuche an Moschusentenembryonen

Bruttemperatur	Anzahl der Langzeitversuche		
	ohne Temperaturabsenkung	mit einer 3-stündigen Temperaturabsenkung um 3°C	mit zwei 3-stündigen Temperaturabsenkungen um 3°C
normal erbrütet (37,5°C)	13	7	6
kalt erbrütet (34,5°C)	6	6	11

3.4 Versuchsaufbau

3.4.1 Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs

Zur Untersuchung der Sauerstoffaufnahme von einzelnen Embryonen stand ein magnetopneumatischer Sauerstoffanalysator vom Typ Magnos 4G (Hartmann & Braun AG, Frankfurt/M.) zur Verfügung. Der Messbereich des Gerätes betrug 2 Vol.% O₂. Er war mit drei Stoffwechselkammern verbunden, welche jeweils ein Ei aufnehmen konnten. Durch computergesteuerte Magnetventile wurden die Kammern im Intervall von 300 s nacheinander gemessen. Im Sauerstoffanalysator, welcher die paramagnetischen Eigenschaften des Sauerstoffs nutzt, wurde der unterschiedliche Sauerstoffgehalt der Abluft aus den Stoffwechselkammern und des Vergleichsgases (Raumluft) in eine Druckdifferenz umgewandelt, welche dem Sauerstoffverbrauch in Vol.% entsprach. Der Gasdurchfluss durch die Kammern wurde mit Hilfe von Membranpumpen realisiert und durch Feinregulierventile auf etwa 3,3 l·h⁻¹ eingestellt. Der exakte Durchfluss der aktuell gemessenen Kammer wurde mit Hilfe eines Massendurchflussmessgerätes (Teledyne Hastings-Raydist, Hampton, USA) bestimmt. Vor dem Erreichen des Analysators passierte der Gasstrom den Membranfilter sowie eine mit Silicagel gefüllte Trocknungspatrone.

Die wasserdichten Stoffwechselkammern, die über PVC-Schläuche an den Sauerstoffanalysator angeschlossen wurden, bestanden aus transparentem Acrylglas mit je zwei Öffnungen in der Wandung für den Luftein- und -austritt und je drei Öffnungen im Kammerdeckel für den Anschluss von Thermoelementen. Ihr Volumen betrug ca. 290 cm³. Zur Beschwerung gegen Aufschwimmen besaßen sie einen Metallfuß. Eine Schicht Natronkalk mit Farbindikator am Boden der Kammer diente zur Absorption von Kohlendioxid. Darüber befand sich ein Kunststoffsieb mit der Aufnahmevorrichtung für das Ei, um letzteres vor direktem Kontakt mit dem Natronkalk zu schützen.

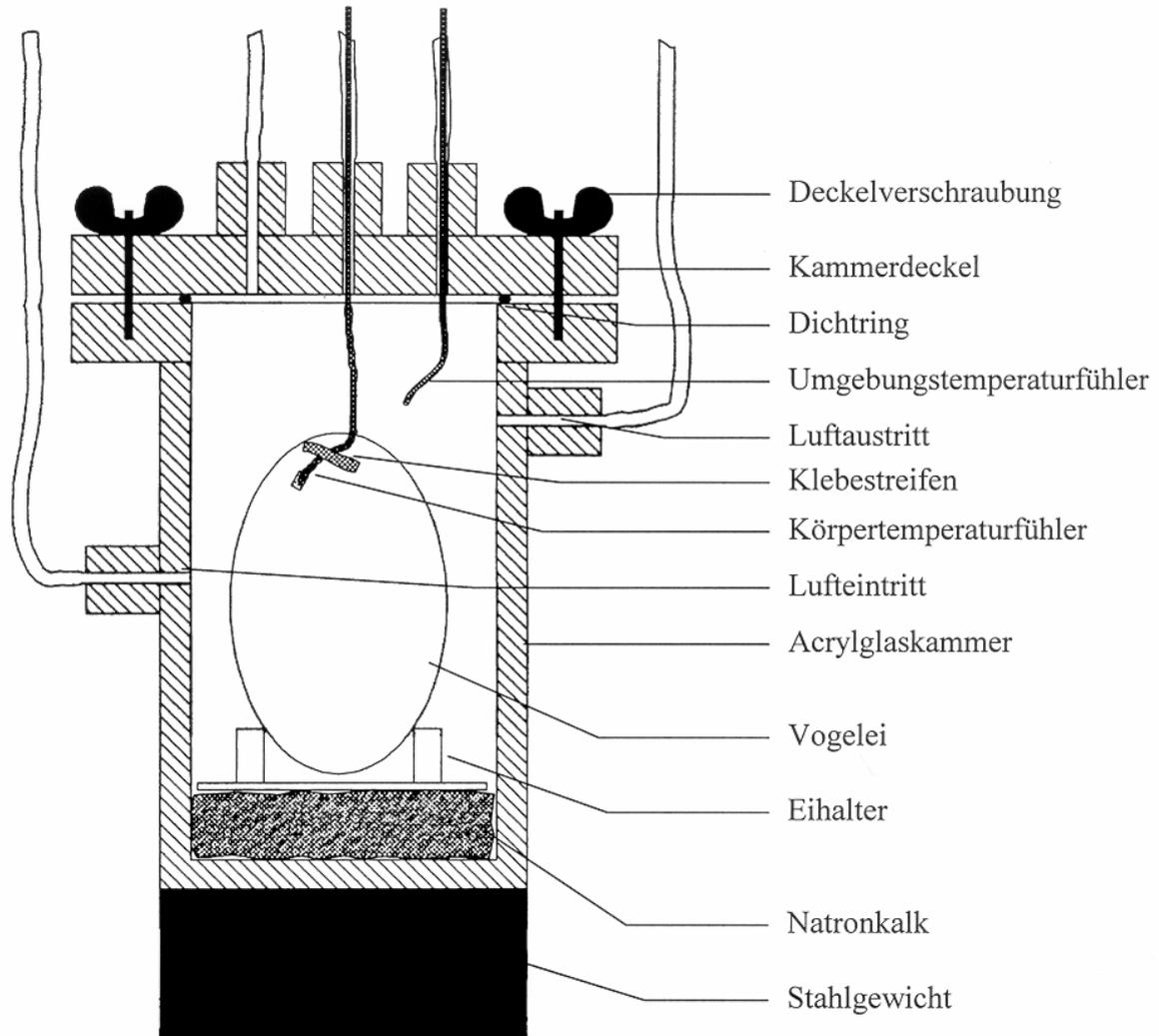


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Messkammer (Janke, 2002)

Die Temperierung der einzelnen Stoffwechselkammern erfolgte über ein Wasserbad, dessen Temperatur durch einen Einhängethermostaten (Temperaturkonstanz von $\pm 0,1$ K; ME, Prüfgeräte-Werk Medingen GmbH, Freital) eingestellt wurde. Ein zweites Wasserbad, in welches die Kammern gleichzeitig innerhalb von wenigen Sekunden umgesetzt werden konnten, diente zu Versuchen mit T_U Absenkung.

3.4.2 Messung der Umgebungs- und der Eiinnentemperatur

Die T_U der Eier wurde mit Hilfe von Thermofühlern des Typs PT-100 (Lieferant: Sensycon GmbH, Hanau) in ca. 1 cm Abstand von diesen im oberen Teil der Messkammern bestimmt (Abbildung 5). Die Thermofühler waren mit einem Temperatur-Umformer vom Typ MCR-RTD/U-E (Phoenix Contact GmbH & Co., Blomberg) verbunden.

Zur Messung der T_K wurden NiCr-Ni-Miniatur-Thermoelement-Fühler (Testo GmbH & Co., Lenzkirch) verwendet. Im Meßbereich zwischen 20 und 40°C besaßen sie eine Messgenauigkeit von 0,1°C bei einer Latenzzeit von 5 s. An ihrer Spitze waren die Messfühler auf 5 cm Länge mit transparentem Kunststoffschlauch (Außendurchmesser 1,5 mm) überzogen, um sie vor Feuchtigkeit im Eiinneren zu schützen. Das offene Ende der Schläuche war mit Dentalwachs abgedichtet. Jeder einzelne Thermofühler war an einen Temperatur-Umformer (MCR-TC/U-E, Phoenix Contact GmbH & Co., Blomberg) angeschlossen und über diesen eichbar. Zur Messung der T_K wurde der Messfühler ca. 25 mm in das Ei nahe dem Embryo eingeführt. Aufgrund des Entwicklungsstadiums der verwendeten Embryonen und des vorherigen Schierens der Eier kann von der Lage des T_K -Sensors in unmittelbarer Nähe zum Embryo ausgegangen werden. Die Bestimmung der Temperatur der Allantoisflüssigkeit ist ein geeignetes Verfahren zur Messung der T_K bei Embryonen praecocialer Vögel (Holland *et al.*, 1998).

3.5 Messwerterfassung und Berechnung der Wärmeproduktion der Embryonen

Die Signale des Sauerstoffanalysators, des Massendurchflussmessers, und der Temperatursensoren (über Temperatur-Umformer) wurden über Analog-Digitalwandler in einen PC eingelesen und online von diesem mit Hilfe der Software "Labtech Notebook" (Version 6.3.0., Laboratory Technologies Corporation, Wilmington, USA) aufgezeichnet. Der PC diente auch zur Steuerung der Magnetventile am Sauerstoffanalysator. Die Datensätze beinhalteten die Zeit der Messung, die Eimasse, die vor Messbeginn eingegeben wurde, die T_U , die T_K , den Luftdurchfluss sowie die errechneten Größen Sauerstoffverbrauch (Differenz im Sauerstoffgehalt der Luft zwischen Messkammereintritt

und -austritt * Luftdurchfluss) und WP (Sauerstoffverbrauch * Eimasse⁻¹ * kalorisches Wärmeäquivalent). Da vom Embryo zur Energiegewinnung ausschließlich Fette verstoffwechselt werden, geht man von einem respiratorischer Quotient von 0,72 (DECUYPERE, 1984) aus, der einem kalorischen Wärmeäquivalent von 19,7 J*ml⁻¹ O₂ entspricht. Alle Ergebnisse wurden im ASCII-Format ausgegeben.

3.6 Durchführung der Kurzzeitversuche

Zu Beginn der Versuchsvorbereitungen wurden die Eier geschiert, um die Vitalität und Lage der Embryonen zu überprüfen. Darüber hinaus wurde eine Stelle nahe des spitzen Poles der Eier auf der Schale markiert, die möglichst fern von großen Blutgefäßen in der darunterliegenden Chorioallantoismembran lag. Danach wurden die Eier gewogen (owa labor, VEB Wägetechnik Rapido, Oschatz, Genauigkeit: 1g) und an der zuvor markierten Stelle mit Hilfe eines Feinbohrschleifers (Minimot 40/E, Proxxon, Niersbach/Eifel) mit Fräswerkzeug eine Öffnung von etwa 3 * 3 mm Größe in die Eischale gefräst, ohne die darunterliegende Eimembran zu perforieren. Anschließend wurden die Schalenmembran und die Chorioallantoismembran mit einer sterilen Lanzettadel im Bereich der eingefrästen Öffnung der Eischale perforiert. Kam es hierbei zu Blutungen, wurde der Embryo vom Versuch ausgeschlossen. In die so hergestellte Öffnung wurde der Fühler für die T_K zwischen Chorioallantoismembran und Embryo, möglichst embryonah, etwa 2,5 cm (Huhn) bzw. 3,5 cm (Ente) in Richtung des stumpfen Poles in das Ei eingeschoben. Zuvor wurde der Messfühler mit 70%iger Ethanollösung gereinigt. Mittels eines schmalen Streifens Klebeband wurde der Fühler am Ei fixiert und die Öffnung der Eischale mit Dentalwachs luftdicht verschlossen (BURMEISTER *et al.*, 1997; HOLLAND *et al.*, 1998). Anschließend wurde das so vorbereitete Ei mit dem spitzen Pol nach oben in der Messkammer platziert (Abbildung 5), die Kammer wasserdicht geschlossen und in ein temperiertes Wasserbad eingesetzt. Danach wurden der zweite und anschließend der dritte Embryo in gleicher Weise für die Messung vorbereitet. Nach dem alle drei Kammern im Wasserbad standen, wurden das Messprogramm gestartet und mit der Datenaufzeichnung begonnen.

Drei Stunden später wurden die Kammern gleichzeitig innerhalb weniger Sekunden in das zweite Wasserbad verbracht, in dem zuvor die von der normalen Bruttemperatur

abweichende Versuchstemperatur eingestellt worden war. Nach weiteren drei Stunden wurden die Kammern für eine Stunde in das erste Wasserbad (Ausgangstemperatur) zurückgesetzt.

Die Zeitdauer der Versuchsphasen wurde durch Vorversuche ermittelt, in denen sich gezeigt hatte, dass die Embryonen bis zu 120 min benötigen, um T_K und Sauerstoffverbrauch nach der Präparation zu stabilisieren. Dieser Prozess nimmt nach dem Umsetzen in das Wasserbad mit der Versuchstemperatur maximal die gleiche Zeit in Anspruch.

3.7 Durchführung der Langzeitversuche

Die Langzeitversuche wurden in zwei Serien ausschließlich an Moschusenten durchgeführt. In der ersten Versuchsserie wurden die Embryonen bis zum Schlupf bei 37,5°C bebrütet (normal). Die Eier der 2. Serie wurden bis zum 28. Tag ebenfalls bei 37,5°C erbrütet. Danach wurde die Bruttemperatur auf 34,5°C gesenkt, d.h. ebenfalls kalt erbrütet wie für die Kurzzeitversuche.

Die Messungen begannen 2 Tage vor dem zu erwartenden Schlupf mit den Temperaturen, bei denen die Embryonen bebrütet wurden, d.h. bei 37,5 bzw. 34,5°C. Bei einem Teil der Langzeitversuche wurde die Versuchstemperatur wie bei den Kurzzeitversuchen, jedoch nach einem Zufallsmuster, ein bis zwei mal über 180 Minuten um 3°C gesenkt (34,5°C/31,5°C) und anschließend wieder auf das Ausgangsniveau (37,5°C/34,5°C) zurückgeführt. Um einen Trainingseffekt der Embryonen zu vermeiden erfolgte die Temperatursenkung bei denselben Embryonen an aufeinander folgenden Tagen zu unterschiedlichen Tageszeiten. Der Gesamtumfang der Langzeitversuche ist in Tabelle 2 dargestellt. Zusätzlich wurden einige Versuche durchgeführt, bei denen normal erbrütete Embryonen einem kürzer währenden Kältereiz (- 3°C für 60 Minuten) ausgesetzt waren. Hierbei wurde von der T_{Brut} ausgehend ein Kältereiz von 3°C für eine Stunde vorgenommen.

Im Normalfall enden die Langzeitversuche mit dem Schlupf des Kükens.

3.8 Statistische Analyse

Zur quantitativen Untersuchung von Einflussgrößen, ihrer Beschreibung und Darstellung, wurden im Rahmen der Auswertung der Daten dieser Arbeit statistische Tests durchgeführt. Die daraus gewonnenen Aussagen lassen aufgrund des Stichprobenumfangs jedoch nur einen Schluss auf die Gesamtheit der im Rahmen der Arbeit untersuchten Tiere zu. Da Mittelwerte betrachtet wurden, kann von einer annähernd symmetrischen Verteilung der Werte ausgegangen werden (LORENZ, 1992). Zum Vergleich von Mittelwerten wurde die univariate Varianzanalyse (VA) angewandt. Die Prüfung der Nullhypothese erfolgte auf dem 5% - Niveau. Zur Beurteilung linearer Kontraste wurde anschließend der Test nach Scheffé genutzt.

Obwohl parametrisch statistische Verfahren Verwendung fanden, wurden zur zusammenfassenden Darstellung der Ergebnisse wegen der größeren Aussagekraft bevorzugt Boxplots verwendet. Diese veranschaulichen die Lage, Streuung und Konzentration von Beobachtungswerten (SAUERWEIN und HÖHNEKOPP, 1992). Boxplots sind eine grafische Umsetzung von numerischen Informationen wie Minimum, Maximum, Median und Quartile. Sie geben eine schnelle Übersicht über die Verteilung der Werte innerhalb einer Gruppe sowie zwischen den Gruppen (Abbildung 6).

Zur Verarbeitung der Daten und ihrer grafischen Darstellung wurde das Programm "Excel 97" (Microsoft Corporation) verwendet. Statistische Untersuchungen einschließlich der Darstellung der Ergebnisse in Boxplots wurden mit Hilfe der Software "SPSS 11.0 für Windows" (SPSS Inc.) durchgeführt.

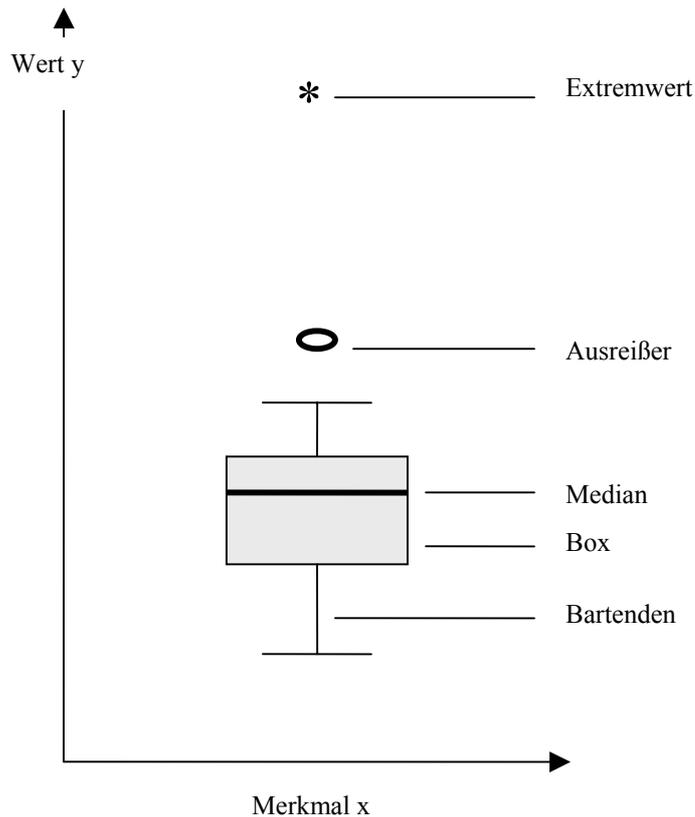


Abbildung 6: Boxplot zur grafischen Darstellung der Lage, Streuung und Konzentration von Werten einer Stichprobe. Entlang der x -Achse werden Merkmale und die Stichprobengröße (n) dargestellt, auf der y -Achse die dazugehörigen Werte aufgetragen. Die Box beinhaltet 50% der Beobachtungswerte und umfasst den Wertebereich, der zwischen dem ersten und dritten Quartil liegt. Der Median wird durch die schwarze Linie dargestellt, welche waagrecht in der Box liegt. Die Bartenden am oberen und unteren Ende der Box werden durch das 1,5-fache des Interquartilabstandes bestimmt; fehlen Werte in diesem Bereich, so gibt es auch keine Bartenden. Werte außerhalb dieser Grenzen werden als Ausreißer (ovales Zeichen) gekennzeichnet, sofern sie zwischen dem 1,5- und 3-fachen Interquartilabstand von den Kastengrenzen entfernt liegen. Extremwerte mit mehr als 3-fachem Interquartilabstand werden durch ein Sternchen (*) dargestellt.