

## **3.2 Material und Methoden**

### **3.2.1 Tiermaterial**

In die Untersuchung zum Embryotransfer wurden in drei aufeinander folgenden Jahren insgesamt 20 adulte, weibliche Rehe einbezogen. Es handelte sich hierbei ausnahmslos um Tiere aus der Gehegehaltung in der Feldforschungsstation des IZW in Niederfinow, Deutschland (52°44' Nord / 13°52'Ost). Die Spendertiere wurden in kleinen Gruppen in einem Geschlechterverhältnis von 1:2 – 1:4 (männlich : weiblich) gehalten. Neu synchronisierte Empfängertiere waren von Beginn der Zyklusinduktion bis nach dem Embryotransfer vom Bock getrennt.

### **3.2.2 Immobilisation**

Zur intramuskulären Injektion verschiedener Hormonpräparate und zur Verabreichung von Injektionsnarkotika wurden die Rehe in einer Fangvorrichtung bzw. Schleuse festgesetzt. Diese Fangvorrichtung war den Tieren bekannt, da sie als Teil der Gehege sonst frei passierbar war. Die Injektion selbst erfolgte mittels eines Blasrohrprojektils (Dan-Injekt<sup>®</sup>) aus einer Entfernung von etwa 2 m. Zyklussynchronisation mittels vaginaler Schwämmchen, transrektale ultrasonographische Untersuchung, Embryonenspülung und Embryotransfer wurden unter Vollnarkose durchgeführt. Dazu wurde den Tieren eine Kombination aus Ketamin (3,5 mg/kg Körpergewicht; Ketamin 10%<sup>®</sup>, CP-Pharma) und Xylazin (2 mg/kg Körpergewicht; Rompun<sup>®</sup>, Bayer) verabreicht. Zur Embryonengewinnung und -übertragung wurden die Rehe zusätzlich intubiert und in eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (1,5 – 2 Vol %; Forene<sup>®</sup>, Abott; 1,5 l O<sub>2</sub>/min) überführt. Nach Beendigung der Untersuchungen erhielten die Tiere eine intravenöse Injektion von Yohimbin (0,125 mg/kg Körpergewicht), um die Wirkung des Xylazins aufzuheben.

### 3.2.3 Embryotransfer – Programm

Die folgenden drei Abbildungen geben einen anfänglichen Überblick über die einzelnen Embryotransfer – Programme der Jahre 1997, 1998 und 1999. Sie zeigen die Anzahl und Gruppeneinteilung der Spender- und Empfängertiere sowie die durchgeführten Behandlungen und Arbeitsschritte in ihrem zeitlichen Ablauf.

Abb. 4: Zeitlicher Ablauf des Embryotransfer–Programms 1997: Spendertiere, Empfängertiere, Behandlungen, Untersuchungen

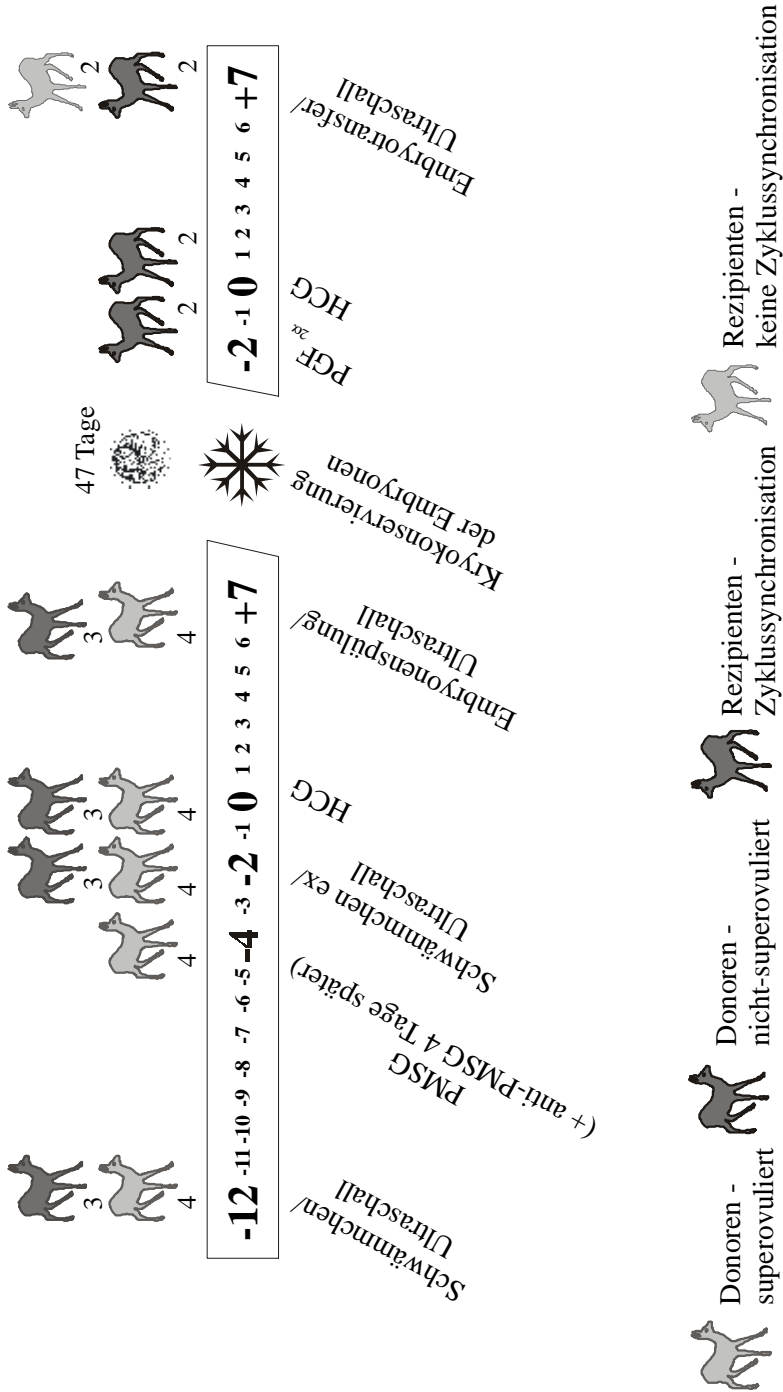


Abb. 5: Zeitlicher Ablauf des Embryotransfer-Programms 1998: Spendertiere, Empfängertiere, Behandlungen, Untersuchungen

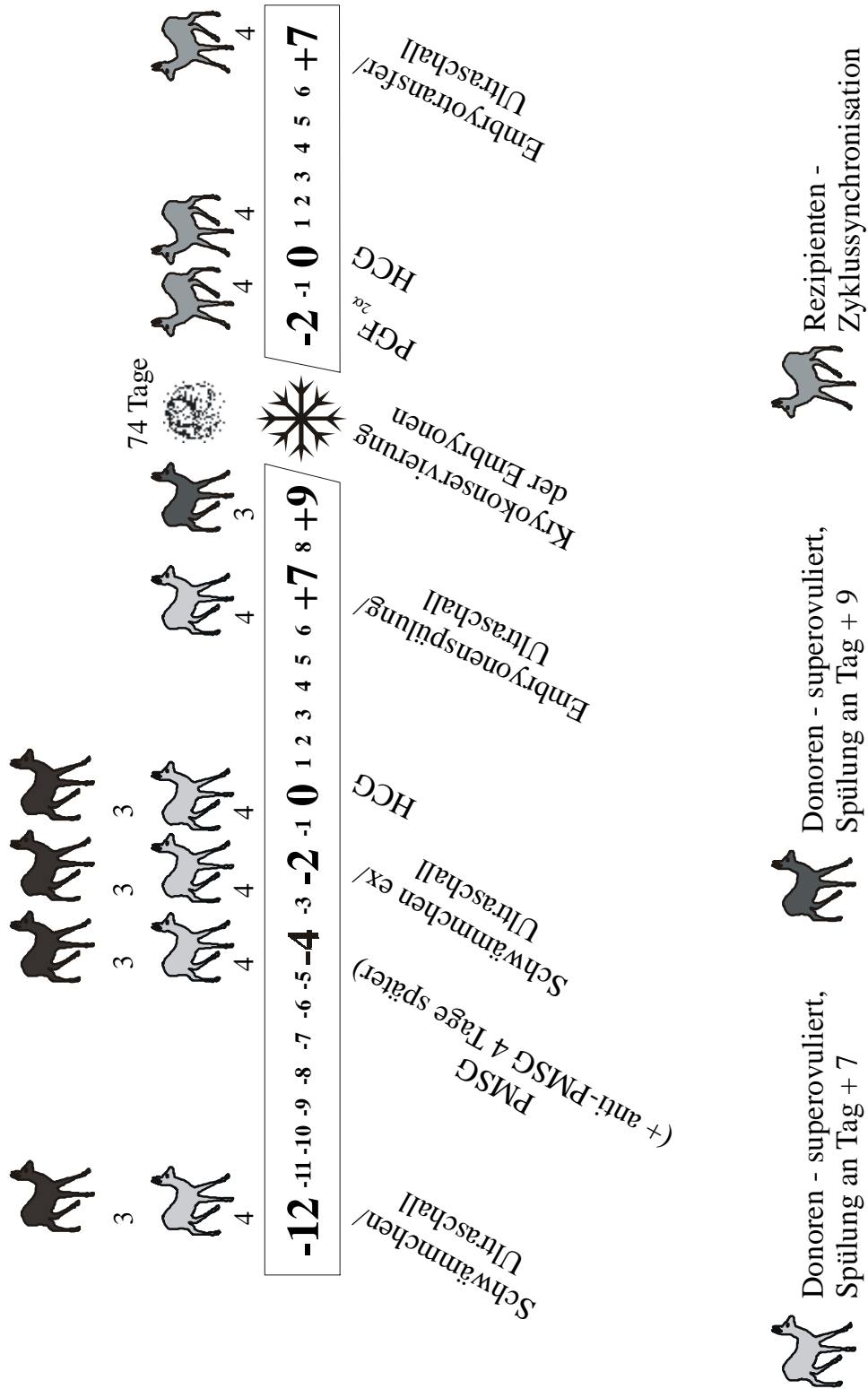
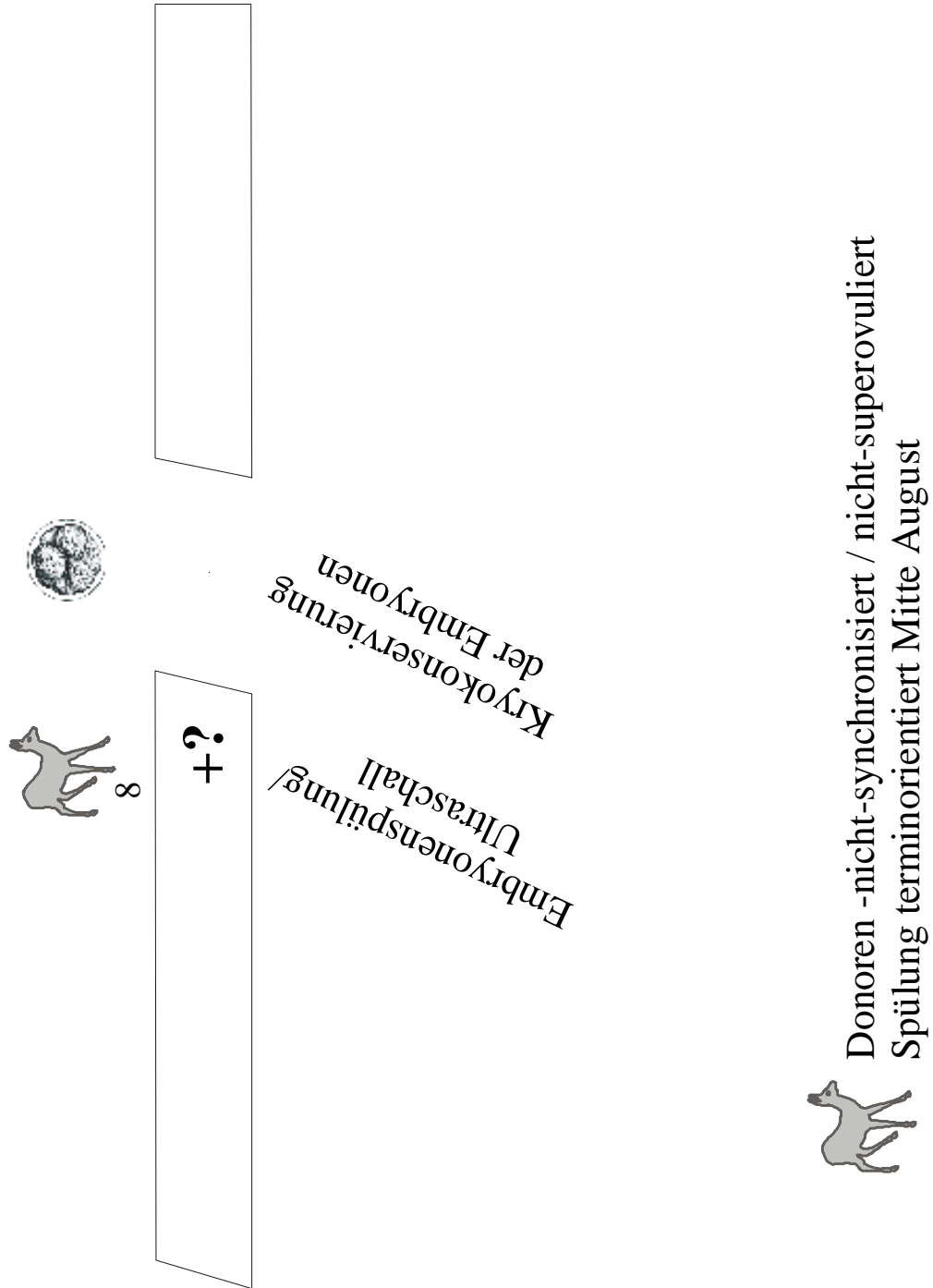


Abb. 6: Zeitlicher Ablauf des Embryotransfer-Programms 1999: Spendertiere, Behandlungen, Untersuchungen



### **3.2.3.1 Spendertiere (Donoren)**

Gruppe I: Kontrolltiere: ohne Behandlung (n = 8)

Gruppe II: Tiere mit Zyklussynchronisation (n = 3)

Gruppe III: Tiere mit Zyklussynchronisation und Superovulation (n = 9, darunter 2 Tiere, die in zwei aufeinander folgenden Jahren eingesetzt wurden)

### **3.2.3.2 Empfängertiere (Rezipienten)**

Gruppe IV: Tiere, die nach der natürlichen Brunst nicht durch erneute Zyklusinduktion mit dem Zyklus des kryokonservierten, transferierten Embryos synchronisiert wurden;

Embryotransfer im September (n = 2);

Tiere wurden während der Brunst vom Bock gedeckt und waren Teil der Embryonendonoren der Gruppen II oder III

Gruppe V : Rezipienten, die nach der natürlichen Brunst durch erneute Zyklusinduktion mit dem Zyklus des kryokonservierten, transferierten Embryos synchronisiert wurden;

Embryotransfer im September (n = 2);

Tiere wurden während der 1. Brunst vom Bock gedeckt und waren Teil der Embryonendonoren der Gruppen II oder III

Gruppe VI: Rezipienten, die nach der natürlichen Brunst durch erneute Zyklusinduktion mit dem Zyklus des kryokonservierten, transferierten Embryos synchronisiert wurden;

Embryotransfer im Oktober (n = 4);

Tiere wurden während der 1. Brunst vom Bock gedeckt

### **3.2.3.3 Vorbereitung der Spendertiere**

#### **3.2.3.3.1 Synchronisation**

Die hormonelle Zyklussynchronisation der Spendertiere (Gruppen II und III) erfolgte kurz vor Einsetzen der natürlichen Brunst Mitte Juli (14. Juli 1997, bzw. 16. Juli 1998) durch die intravaginale Applikation von Progesteron-Schwämmchen (Chronogest<sup>®</sup>, Intervet, 40 mg Flugestonacetat) (Abb. 4 und 5) über einen Zeitraum von 10 Tagen. Vor dem Einsetzen der Schwämmchen wurde durch transrektale sonographische Kontrolle der Ovarien sichergestellt, daß bis zu diesem Zeitpunkt bei keinem der Tiere eine Ovulation

stattgefunden hatte. 2 Tage nach Entfernen der Schwämmchen (Tag -2) erhielten die Tiere 1500 I.E. Humanes Choriogonadotropin (hCG) (Choragon<sup>®</sup>, Ferring) zur Ovulationsunterstützung (Tag 0).

Abb. 7: Progesteron-Schwämmchen zur Zyklussynchronisation



Abb. 8: Applikation eines Progesteron-Schwämmchens beim Reh



### 3.2.3.3.2 Superovulation

Zur Superovulation erhielten die Spendertiere (Gruppe III) eine Injektion von 1000 I. E. PMSG (Intergonan<sup>®</sup>, Intervet) intramuskulär (i.m.), d. h. am Tag -4, zwei Tage vor dem Entfernen der Schwämmchen. Vier Tage später, also am Tag 0, erfolgte die Injektion von 100 µg Anti-PMSG (Neutra-PMSG<sup>®</sup>, Intervet).

### 3.2.3.3.3 Brunstbeobachtung

Über einen Zeitraum von jeweils 4 Tagen nach Entfernen der Progesteron-Schwämmchen wurden die Spendertiere (Gruppe II und III) entsprechend ihrer Aktivitätsphasen morgens und abends über mehrere Stunden beobachtet. Zeichen für die einsetzende Brunft (häufiger Harnabsatz, Treiben durch den Bock) sowie stattfindende Deckakte wurden protokolliert.

### 3.2.3.4 Embryonengewinnung

Die Spülung der Embryonen erfolgte jeweils Anfang August, im ersten Jahr am errechneten Tag 7 post ovulationem (n = 7) (1. August 1997) und im zweiten Jahr an den Tagen 7 (n = 4) und 9 (n = 3) (3. und 5. August 1998). Im dritten Jahr (1999) der Untersuchungen wurde die Embryonengewinnung ohne vorherige Synchronisation oder Superovulation der Tiere (Gruppe I) terminorientiert am 11. (n = 6) und 12. (n = 3) August durchgeführt (Zyklustag post ovulationem unbekannt).

#### **3.2.3.4.1 Spülmedium/Kulturmedium**

Zur Gewinnung der Oocyten / Embryonen wurde nach Lösungsvorschrift (SERVA Feinbiochemica) folgendes Spülmedium hergestellt:

DULBECCO'S PBS mit Ca + Mg (NaCl 8000mg/l, KCl 200 mg/l, MgCl<sub>2</sub> 100 mg/l, CaCl<sub>2</sub> 100 mg/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1000mg/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 150 mg/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg/l) mit Zusätzen von Glukose (1000 mg/l), Pyruvat (36 mg/l), Penicillin (20 mg/l), Streptomycin (40 mg/l) und 2% fetalem Kälberserum (FKS).

Zur kurzzeitigen Kultivierung der Oocyten/Embryonen, wurde das gleiche Medium verwendet wie oben beschrieben, jedoch mit 20% FKS.

#### **3.2.3.4.2 Nicht-chirurgische Embryonengewinnung**

Bei drei Donoren wurde entweder ausschließlich (n = 1) oder der chirurgischen Spülung vorausgehend (n = 2) eine nicht-chirurgische Uterusspülung durchgeführt. Zur Erweichung der Cervix erfolgte zunächst die Applikation eines selbst hergestellten PGE-Xylocain-Gels im Bereich der Portio vaginalis. Nach einer Einwirkzeit von etwa 15 Minuten wurde das Gel mit ca. 100 ml des Spülmediums gründlich entfernt. Die Passage der Cervix erfolgte bei allen drei Tieren mit einem Ballonkatheter mit Mandrin von 7,5 French (Mammalian embryo retrieval set; Fa. COOK). Es wurden jeweils zwischen 180 und 290 ml Spülflüssigkeit ins Uteruslumen verbracht.

#### **3.2.3.4.3 Chirurgische Embryonengewinnung**

Der Zugang zum Genitaltrakt erfolgte nach Rückenlagerung der Tiere ventral in der Linea alba unmittelbar cranial des Euters (Abb. 9). Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurden Uterushörner, Eileiter und Ovarien vorgelagert und fotografisch dokumentiert. Die Spülung der Uterushörner erfolgte nacheinander. Nach stumpfer Perforation der Hornspitzen wurden mittels Braunüle oder Kopfkannüle jeweils zwischen 40 und 100 ml Spülflüssigkeit eingebracht. Die Rückgewinnung erfolgte durch einen nach Perforation des Corpus uteri eingebrachten Foley-Ballonkatheter (8 Charrière, Firma COOK) (Abb. 10).

Bei drei Tieren erfolgte zusätzlich die retrograde Spülung eines oder beider Eileiter mittels Knopfkannüle, einmal gleichzeitig mit der Spülung der Uterushörner und einmal unabhängig davon.

Nach Rücklagerung des Uterus in die Bauchhöhle erfolgte der Wundverschluß in 3 Schichten:

1. Bauchfell- und Fasziennaht (4 Einzelhefte; Catgut)

2. Subcutis (fortlaufend; Catgut)
3. Haut (Intracutannaht; Dexon)

Vor dem endgültigen Verschuß der Wunde wurden jeweils 2 ml Totocillin<sup>®</sup> in die Bauchhöhle eingebracht.

Abb. 9 und 10: Chirurgische Uterusspülung zur Embryonengewinnung beim Reh



### 3.2.3.5 Embryonenbeurteilung

Nach Überführung in das Kulturmedium erfolgte die Einteilung der Ovarprodukte in Oocyten und Embryonen. Die anschließende Beurteilung der Embryonen erfolgte anhand mikroskopisch sichtbarer Merkmale bei 10- bis 100-facher Vergrößerung. Anhand von Entwicklungsstadium, extraembryonalem Zellmaterial und morphologischem Zustand wurden alle Oocyten / Embryonen in die Tauglichkeitsklassen 0 bis 4 eingeteilt (Klasse 1 = sehr gut, transfer- und kryokonservierungstauglich; Klasse 2 = gut, transfertauglich, bedingt tauglich zur Kryokonservierung; Klasse 3 = bedingt transfertauglich, Klasse 4 =



untauglich); alle Oocyten wurden automatisch der Tauglichkeitsklasse 0 zugerechnet. Alle gefundenen Ovarprodukte wurden fotografisch dokumentiert.

### 3.2.3.6 Kryokonservierung

Alle aufgefundenen Ovarprodukte wurden nach ihrer Klassifizierung unter Verwendung des transportablen Einfriergerätes CryoCell 2000 (Firma MINITÜB) in Pailletten (Abb. 11) in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  konserviert. Als Kryokonservierungsmedium wurde Äthylenglykolmedium (1,5 mol Äthylenglykol; Firma MINITÜB) verwendet.

Die Konservierung erfolgte nach dem im folgenden aufgeführten Kryoregime:

1. Äquilibrierung (10 min) bei Raumtemperatur
2. Einsetzen der beladenen Pailletten in das Einfriergerät bei  $-6^{\circ}\text{C}$
3. Auslösen des Seedings (Kristallisation)
4. Herabkühlen auf  $-32^{\circ}\text{C}$  bei einer Rate von  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$
5. Überführen in flüssigen Stickstoff

Die Dauer der Kryokonservierung der Rehembryonen betrug 47 Tage (6,7 Wochen) im ersten, und 74 Tage (10,6 Wochen) im zweiten Jahr.

Abb. 11: CryoCell 2000 (Firma MINITÜB)  
zur Kryokonservierung von  
Embryonen



### 3.2.3.7 Chirurgischer Embryotransfer

Der Embryotransfer fand am Tag 49 (Gruppe IV), bzw. am Tag 7 (Gruppe V und VI) post ovulationem statt. Das Einbringen der Ovarprodukte in den Uterus erfolgte bei allen Tieren auf chirurgischen Wege.

Insgesamt dienten 8 pseudogravide Tiere (Gruppe IV bis VI; 4 Tiere pro Jahr) mit aktiven Corpora lutea (C.l.) als Rezipienten für 12 Embryonen verschiedener Emtwicklungsstadien, 6 nicht-klassifizierbare Objekte und 3 Oocyten.

Wie bei der Embryonengewinnung wurde der Zugang zur Gebärmutter in der Linea alba und cranial des Euters gewählt. Nach ihrer Vorlagerung wurden Uterushörner und Ovarien fotografisch dokumentiert. Die jeweiligen Ovarprodukte wurden alle zusammen in Kulturmedium in die Spitze einer Unopette aufgezogen und nach stumpfer Perforation der Hornspitzen in ein willkürlich gewähltes Uterushorn eingebracht (Abb. 12 und 13).

Nach Rücklagerung des Uterus in die Bauchhöhle erfolgte der Wundverschluß wie bei der Embryonenspülung beschrieben.

Abb. 12: Unopette zum chirurgischen Transfer von Embryonen



Abb. 13: Chirurgischer Embryotransfer von Embryonen ins Uterushorn mittels Unopette



#### Gruppe IV:

Bei den Rezipienten der Gruppe IV (1997) erfolgte nach der natürlichen Brunft im Juli/August, bei der die Tiere nicht belegt wurden, keine erneute Zyklusinduktion und keine Synchronisation des Muttertieres mit dem Alter der zu transferierenden Embryonen. Der Zeitpunkt des Embryotransfers war Mitte September.

#### Gruppe V :

Die Rezipienten dieser Gruppe (1997) wurden nach der natürlichen Brunft durch erneute Zyklusinduktion 7 Tage vor dem geplanten Embryotransfer mit dem Alter der Embryonen synchronisiert; die Rehe wurden vom Beginn der Zyklusinduktion an bis hin zum Tag des Embryotransfers vom Rehbock, mit dem sie bis dahin zusammen gehalten worden waren, getrennt. Der Transfer erfolgte am selben Tag wie bei den Tieren der Gruppe IV.

#### Gruppe VI:

Die Rezipienten der Gruppe VI (1998) wurden nach der gleichen Vorgehensweise behandelt wie die der Gruppe V im Jahr vorher. Der Zeitpunkt des Embryotransfer lag jedoch Mitte Oktober.

#### **3.2.3.8 Zyklusinduktion und –synchronisation der Empfängertiere**

Zur Zyklusinduktion und zum Auslösen einer neuen Ovulation erhielten die Tiere der Gruppen V und VI jeweils eine Injektion von 400 µg PGF<sub>2α</sub> (Estrumate<sup>®</sup>; Wirkstoff: Cloprostenol) (Tag -2) gefolgt von 1500 I.E. hCG (Choragon<sup>®</sup>, Ferring) am Tag des Östrus (Tag 0). Vom Tag der Prostaglandin-Applikation an bis zum Tag nach dem Embryotransfer wurden die Rehböcke von den Empfängertieren abgetrennt.

#### **3.2.3.9 Auftauen und Transfer der kryokonservierten Ovarprodukte**

Alle zu transferierenden Ovarprodukte wurden 15 sec bei Raumtemperatur und 15 sec in 30°C warmem Wasser aufgetaut.

### 3.2.4 Ultrasonographische Verlaufsuntersuchungen

Während des gesamten Zeitraumes wurden die Rehe mittels Transrektaler Adaptersonographie (TAS) untersucht, um bei den Spendertieren die ovarielle und uterine Aktivität vor Beginn der Hormonbehandlung (Tag -12), in der Follikelphase zum Zeitpunkt des Östrus (Tag 0), und zum Zeitpunkt der Spülung, also zu Beginn der Gelbkörperphase (Tag 7 bzw. 9) darzustellen. Desweiteren wurden die Empfängertiere am Tag des Transfers (Tag 7) in der frühen Gelbkörperphase untersucht.

Die Untersuchung erfolgte wahlweise in Seiten- oder in Brust-Bauchlage. Zunächst wurde der im Enddarm vorhandene Kot manuell und mittels eines Klistiers mit körperwarmem Wasser entfernt. Eingesetzt wurde ein portables Ultraschallgerät (CS 9100, Picker International GmbH, Espelkamp) ausgerüstet mit einem intraoperativen 7,5 Mhz Konvex-Schallkopf (EUP-F334, 40R Fingertip). Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten beim Reh (manuelle rektale Schallkopfführung nicht möglich) wurde der Schallkopf mit Hilfe eines speziellen, am IZW entwickelten Adapters (Firma Schnorrenberg, Chirurgiemechnik; Berlin) im Rektum geführt. Dieser Adapter, bestehend aus Handgriff, Kabelkanal und Schallkopfhalterung, lässt sich in einer Länge von 30 cm einführen und gestattet die Darstellung aller inneren Genital- und Beckenorgane (Abb. 14). Alle Ultraschalluntersuchungen wurden auf S-VHS Videokassetten dokumentiert.

Abb. 14: Transrektale Ultraschalluntersuchung eines weiblichen Rehs mittels Adaptersonographie



### **3.2.5 Bestimmung von Hormonprofilen**

Zur weiteren Evaluierung und Interpretation der durchgeführten Hormonregime wurden am Tag der Embryonenspülungen von allen Tieren Kotproben genommen und diese auf ihren Progesterongehalt untersucht.

Bei den 4 Rezipienten der Gruppe VI, bei denen durch Applikation von PGF<sub>2α</sub> eine Zyklusinduktion erfolgte, wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen, beginnend mit dem Tag der Luteolyse, täglich Kotproben gesammelt und der Progesterongehalt bestimmt, um retrospektiv die Ovarreaktion der Tiere beurteilen zu können.

Zur Bestimmung des Progesterongehaltes wurden 0,5 g der Kotproben mit je 4,5 ml Methanol vermischt, 30 Minuten lang geschüttelt und anschließend für 15 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes wurden mit weiteren 0,5 ml H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Quantifizierung des Progesterongehaltes der Proben wurde dann mittels Enzymimmunoassay (EIA) nach PRAKASH et al. (1987) unter Verwendung von Antikörpern gegen Progesteron-7-carboxyethylthioether-BSA markiert mit Progesteron-3-carboxymethyloxim-meerettich Peroxidase durchgeführt.

### **3.2.6 Trächtigkeitsdiagnostik**

Die Trächtigkeitsdiagnostik bei den 8 Rezipienten beider Embryotransfer-Durchgänge erfolgte wiederum mittels TAS. Die Untersuchungen wurden jeweils in der ersten Januarhälfte, 116 bzw. 89 Tage nach dem Transfer der Embryonen, durchgeführt.

### **3.2.7 Genetischer Abstammungsnachweis**

Der Nachweis der elterlichen Abstammung wurde mit Hilfe des genetischen Verfahrens der Mikrosatelliten-Analyse geführt. Dabei werden mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bei den zu untersuchenden Individuen (Nachkommen, Eltern, Putativ-Eltern) DNA - Abschnitte amplifiziert (vermehrt), welche sogenannte Mikrosatelliten-Sequenzen enthalten. Dies sind Bereiche, die sich durch die mehrfache Wiederholung von sehr kurzen Sequenzmotiven auszeichnen, wobei deren Längenspanne von 2 (z.B. [CA]<sub>15</sub>) bis zu 6 Nukleotiden (z.B. [ATTGCT]<sub>9</sub>) reichen kann. Da diese Mikrosatelliten-Bereiche in der Regel nicht für ein Produkt (RNA oder Protein) codieren, unterliegen sie keinem Selektionsdruck. Dies führt letztendlich zur Manifestation aller in den Nachkommen auftretenden Mutationen, da Letal- (Abort oder Totgeburt) bzw. Infertilitätsmutanten nicht auftreten. Mikrosatelliten-Mutationen bestehen zum überwiegenden Teil in einer Veränderung der Anzahl der auftretenden Sequenzmotive. Jede vorkommende Länge (z.B.

[CA]<sub>50</sub> = 100, [CA]<sub>52</sub> = 104) wird als Allel des entsprechenden Mikrosatelliten-Locus bezeichnet. Pro Tier können maximal 2 verschiedene Allele auftreten, wobei Vater und Mutter jeweils ein Allel beisteuern. Wenn der Nachkomme über zwei gleiche Allele verfügt (väterlicher und mütterliches Allel sind identisch), wird er als *homozygot* bezeichnet. Treten unterschiedliche Allele auf, so wird der Nachkomme als *heterozygot* bezeichnet. Um Mikrosatelliten mittels PCR amplifizieren zu können, ist die Kenntnis der diese Bereiche flankierenden Sequenzen erforderlich (Mikrosatelliten-Primer). Die entsprechenden Primersequenzen für Reh-Mikrosatelliten-Loci wurden der Literatur entnommen (FICKEL und REINSCH, 2000) Zur Elternschaftsbestimmung wurden die Reh-Mikrosatelliten-Loci *Roe01*, *Roe03*, *Roe05* und *Roe06* eingesetzt.

Die genomische DNA wurde aus 200µl Rehblut gewonnen (DNeasy<sup>®</sup>, Qiagen, Hilden). Alle PCRs (25µl) wurden auf einem GeneAmp 2400 (Perkin Elmer) unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: 50ng DNA, 10mM Tris, pH 8.8, 0.5U Taq-DNA Polymerase (Perkin Elmer), 3mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 200µM dNTPs, 1µg BSA, 200nM von jedem Primer (alle eingesetzten Vorwärts-Primer waren am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM markiert). Nach einer Anfangsdenaturierung von 3 Min. bei 94°C starteten die PCRs für 35 Zyklen. Die Zyklusbedingungen waren wie folgt: 30s 94°C, 30s Primerbindung (*Roe01*: 53°C, *Roe03*, *Roe05*: 54°C; *Roe06*: 49°C), 30s 72°C. Die abschließende Primerverlängerung erfolgte für 30 Min. bei 72°C, um alle PCR-Produkte zu adenylieren (Vermeidung von Allel-Fehlbestimmungen).

Die PCR-Amplikons wurden zur Gel-Fragmentlängen-Analyse auf einem automatischen Analysegerät (ABI A310C) über eine mit POP6 (Perkin Elmer, Weiterstadt, BRD) gefüllte Kapillare aufgetrennt. Die auftretenden Mikrosatelliten-Allele wurden unter Zuhilfenahme der Software GeneScan<sup>®</sup> Analysis V.2.1 (Perkin Elmer) erfaßt. Ihre Länge wurde anhand einer Kalibrierungskurve mit dem Standard TAMRA 500 (Perkin Elmer) bestimmt.

### **3.2.8 Statistische Absicherung**

Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurde als nicht-parametrischer Test der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

### **3.2.9 Postmortale Untersuchungen**

Während der Jagdsaison des Winters 1997/1998, bzw. des Winters 1998/1999 im Land Brandenburg, Kreis Eberswalde wurden in den Monaten November und Dezember die Uterushörner von insgesamt 25 erlegten, adulten Rehen *ex situ* gespült und die

Spülflüssigkeit auf das Vorhandensein von Embryonen hin untersucht. Das Entwicklungsstadium aller aufgefundenen Embryonen wurde festgehalten und teilweise photographisch dokumentiert; der Durchmesser von 14 der Embryonen aus 8 Rehen wurde ermittelt. Alle Embryonen wurden in Pailletten in flüssigem Stickstoff eingefroren.