

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Für den Versuch I wurden 13.637 Oozyten aus Ovarien geschlachteter Kühe im IVP-Labor des Besamungsvereins Neustadt an der Aisch gewonnen, *in vitro* befruchtet und bis zum Blastozystenstadium kultiviert. Für die Untersuchungen wurde Samen unterschiedlicher Ejakulate von sechs verschiedenen Bullen herangezogen. Mit den kultivierten Blastozysten wurden Einfrierversuche in EG mit verschiedenen Äquilibrierungszeiten durchgeführt (Versuche II und III). Nach dem Auftauen wurden die Schlupf-, Degenerations- und Re-expansionsraten beurteilt. Ein Teil der eingefrorenen Embryonen wurde transferiert.

Im Versuch IV wurde der Einfluß einer Vorbehandlung durch Zyklussynchronisation und einer Mineralstoffzufütterung auf die Qualität der Oozyten aus Ovarien geschlachteter Zuchttiere und den daraus resultierenden IVF-Ergebnissen untersucht.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Nach der In-vitro-Fertilisation erreichten 8.375 Oozyten (61,4%) das 2-8-Zellstadium. Davon entwickelten sich nach Kultivierung 2.301 (27,5%) bis zur Blastozyste.
2. Nach Verwendung des Samens sechs unterschiedlicher Ejakulate pro Bulle konnten keine signifikanten Unterschiede bei den Teilungs- und Blastozystenraten nach IVF festgestellt werden. Bei Verwendung des Samens sechs verschiedener Bullen für die IVF traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Blastozystenraten (Ergebnisse bezogen auf die geteilten Oozyten) dieser Bullen auf. Dagegen schwankten die Teilungsraten (2-8-Zellstadien) zwischen 53,4 und 67,9% und die Blastozystenraten (Ergebnisse bezogen auf die eingesetzten Oozyten) bei den Bullen zwischen 12,7 und 21,0%, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,01$ . Damit konnte bestätigt werden, daß Bullen die In-vitro-Befruchtungsergebnisse beeinflussen können.
3. Aus den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen konnte abgeleitet werden, daß die IVP-Tauglichkeit eines Bullen durch die Untersuchung von 2 Ejakulaten mit je 4 Wiederholungen im IVF-Verfahren getestet werden kann.

4. Es wurden 962 expandierte Blastozysten in 10% EG und 0,1 M Sucrose nach Äquilibrierungszeiten zwischen 5 und 60 min eingefroren und aufgetaut. Die besten Schlupfraten von 30,9 und 27,8% wurden nach 25 und 30 min Äquilibrierungszeit festgestellt ( $p < 0,01$ ). Die niedrigste Degenerationsrate von 43,8% wurde nach 25 min Äquilibrierungszeit erzielt.
5. Von den 22 nach 5–15 min Äquilibrierungszeit eingefrorenen/aufgetauten Blastozysten wurden 2 Trächtigkeiten (9,1%) nach Transfer diagnostiziert. Von 26 transferierten Blastozysten, die 20–30 min Äquilibriert wurden, entstanden 6 Trächtigkeiten (23,1%).
6. Es wurden 331 expandierte Blastozysten in 20% EG nach Äquilibrierungszeiten zwischen 5 und 35 min eingefroren und aufgetaut. Die beste Schlupfrate von 13,4% wurde nach 10 min Äquilibrierungszeit festgestellt.
7. Bei 47 wertvollen Zuchtieren erfolgte vor der Schlachtung eine Behandlung mit Prostaglandin (Gruppe-PG) und durch Mineralstoffzufütterung (Gruppe-M). 24 Tiere dienten als Kontrolle (Gruppe-K). Aus ihren Ovarien wurden durchschnittlich 131,3 Oozyten pro Tier gewonnen, 35% wurden den Qualitätsklassen 1+2+3 zugeordnet. Die Verteilung der Oozyten auf die Gruppen war annähernd gleich.
8. Durch die Mineralstoffzufütterung wurde nach IVF eine signifikante Verbesserung ( $p < 0,05$ ) der Teilungsraten mit 21,1% gegenüber der Kontroll- (13,2%) und der Prostaglandin-Gruppe (15,4%) erzielt. Die Teilungsraten von Oozyten der Qualität 1+2 betragen nach IVF bei der Gruppe-M 48,4%. Sie unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,01$ ) von den entsprechenden Ergebnissen der Gruppe-K (30,6%) und der Gruppe-PG (32,3%).
9. Durch die erhöhten Teilungsraten in der Gruppe-M verbesserte sich die Embryonenausbeute auf 6 Blastozysten/Kuh gegenüber den beiden anderen Gruppen (3,7 und 3,6 Blastozysten pro Tier bei der Gruppe-K und -PG).
10. Von 62,5% der Tiere der Gruppe-M konnten Blastozysten gewonnen werden und von 45,8% dieser Tiere wurden mehr als 4 Blastozysten erzielt. In der K- und PG-Gruppe wurden von 41,7 bzw. 56,5% der Tiere Embryonen gewonnen und bei 20,8 bzw. 39,1% der Tiere mehr als 4 Blastozysten erzielt.

11. Mit 42 Blastozysten der Gruppe-M wurden nach Transfer 14 Trächtigkeiten (33,3%) diagnostiziert. In der PG-Gruppe konnten nach 45 Transfers 13 Trächtigkeiten (28,9%) und in der Gruppe-K nach 13 Transfers 2 Trächtigkeiten (15,4%) erzielt werden.
12. Der Einfluß einer Mineralstoffzufütterung 14 Tage vor der Schlachtung von Zuchttieren auf die IVF-Ergebnisse ist wahrscheinlich auf eine stimulierende Wirkung bei einer bestehenden Mangelsituation an Mineralstoffen, Vitaminen und Spurenelementen in der Mastperiode vor der Schlachtung zurückzuführen.

**Susana Astiz Blanco:**

Investigations of the *in vitro* fertilizing ability of bull semen and on the optimal equilibration period for cryopreservation of *in vitro* produced embryos using ethylenglycol and experiments to increase the yield of blastocysts after IVF by estrous synchronisation and additional mineral feeding prior to slaughter of valuable breeding cows.

**7 SUMMARY**

For experiment I 13637 oocytes from slaughterhouse ovaries were gained at the IVP-Laboratory of the A.I. Centre Neustadt a.d. Aisch. They were *in vitro* matured, fertilized, and cultured until the blastocyst stage. Semen of different ejaculates from six different bulls was used for this experiment. Cultured blastocysts served for investigations on cryopreservation with ethylenglycol after different equilibration periods (experiments II and III). After thawing embryos the rates of hatching, degeneration, and reexpansion were determined. Some of the cryoprotected/thawed embryos were transferred.

In experiment IV the influence of estrous synchronisation and additional mineral/vitamin feeding was tested on the quality of oocytes gained from ovaries of slaughtered valuable breeding cows and on their corresponding IVF results.

The following results were obtained:

1. After *in vitro* fertilization 8375 oocytes (61.4%) reached the of 2-8-cellstage, and 2301 embryos evolved after culture to blastocysts (27.5%).
2. Using the sperm of six different ejaculates of each bull, no significant differences in the fertilization rates or in the blastocysts rates after IVF could be observed between ejaculates. Using sperm of six different bulls significant differences in the cleavage rates and blastocyst rates (with regard to all used oocytes) were found between bulls ( $p < 0.01$ ). The results varied between 53.4 and 67.9% for the cleavage rates and between 12.7 and

21.0% for the blastocyst rates. No significant differences were observed between bulls considering the blastocyst rates with regard to cleaved oocytes.

3. The investigations revealed that two ejaculates with four replications per bull are sufficient to prove the *in vitro* fertilizing ability of bull semen.
4. 962 expanded blastocysts were frozen in 10% EG and 0.1 M sucrose after equilibration periods between 5 and 60 min, and thawed afterwards. The best hatching rates (30.9 and 27.8%) were obtained with 25 and 30 min equilibration ( $p < 0.01$ ). Also the lowest degeneration rate of 43.8% was observed after 25 min equilibration.
5. Transfers of 22 thawed embryos frozen after 5–15 min equilibration resulted in two gestations (9.1%). 26 transferred thawed blastocysts frozen after 20–30 min equilibration led to 6 gestations (23.1%).
6. 331 expanded blastocysts were frozen in 20% EG after equilibration periods between 5 and 35 min, and thawed afterwards. The best hatching rate of 13.4% was achieved after 10 min equilibration.
7. 47 valuable breeding cows were treated 14 days prior to slaughter with prostaglandins (group PG) or with a mineral/vitamin mixture (group M). The control group (K) consisted of 24 cows. An average of 131.1 oocytes per cow were gained from the ovaries, of which 35% could be assigned to quality classes 1+2+3. Oocytes of different quality were distributed almost equal in all three groups.
8. Using oocytes of all quality classes the application of a mineral/vitaminic mixture improved the cleavage rate after IVF of group M to 21.1% compared with the groups K (13.2%) and PG (15.4%) ( $p < 0.05$ ). The cleavage rates after IVF with an oocyte qualification 1+2 raised to 48.4% in group M and differed significantly ( $p < 0.01$ ) from the respective results in groups K (30.6%) and PG (32.3%).
9. With the raising cleavage rates the embryo yield could be increased up to 6 blastocysts per cow in group M, in comparison to 3.7 and 3.6 embryos per cow in groups PG and K.
10. Blastocysts could be obtained from 62.5% of the cows in group M, and more than four blastocysts were yielded from 45.8% of these animals. Blastocysts could be observed from 41.7 and 56.5% of cows in group K and PG. In these groups more than four blastocysts were obtained from 20.8 and 39.1% of the animals.

11. After transferring 42 embryos of group M, 14 pregnancies were achieved (33.3%), in group PG 13 pregnancies after 45 transfers (28.9%) were obtained, and in group K two pregnancies were observed after transfers of 13 blastocysts (15.4%).
12. A deficiency of minerals, vitamins and trace minerals during the fattening period before animals are slaughtered are probably the reason for the stimulating effect of feeding a mineral mixture on the function of the ovaries in connection with an improvement of oocyte quality and IVF-results.