

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch ultraschallgeleitete Follikelpunktion bei präpuberalen Rindern entwicklungs kompetente Oozyten zu gewinnen. Durch Einsatz verschiedener Gonadotropine wurde ein hormonelles Behandlungsschema entwickelt, um Anzahl und Qualität der bei halbjährigen Rindern gewonnenen Kumulus-Oozyten-Komplexe zu verbessern. Dazu wurden 48 Kälber in Gruppen zu 6-8 Tieren jeweils sechs Wochen zweimal wöchentlich punktiert. Anschließend erfolgte nach In vitro-Maturation und In vitro-Fertilisation die In vitro-Kultivierung der nach morphologischen Kriterien als IVP-tauglich eingestuft Oozyten bis zum Stadium der Morula oder Blastozyste an Tag 7. Von repräsentativen Stichproben wurde der Durchmesser der Oozyten nach Gewinnung sowie die Reifungs- und Befruchtungsrate nach Fixation und Färbung festgestellt. Die Überprüfung der In vivo-Entwicklungs kompetenz der erzeugten transfertauglichen Embryonen erfolgte durch Übertragung auf Empfängertiere.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Nach Stimulation des Follikelwachstums mit PMSG im ersten Versuch konnten bei den stimulierten Tieren nach 12 Punktionen im Schnitt 3,8 Oozyten (71% IVP-tauglich) und bei den Kontrolltieren 2,7 Oozyten (71,6% IVP-tauglich) gewonnen werden. Bei den unstimulierten Kälbern erreichten 3,9% der Oozyten nach In vitro-Fertilisation (IVF) das Morula- bzw. Blastozystenstadium an Tag 7, bei den stimulierten Tieren betrug der Anteil 16,2% ( $p > 0,05$ ).
2. Nach Einsatz einer Kombination von PMSG und FSH konnten 7,1 Oozyten/Spender bei den stimulierten Tieren und 6,8 Oozyten/Spender bei den Kontrolltieren gewonnen werden. Von den Oozyten der stimulierten Tiere waren mit 69,7% signifikant mehr IVP-tauglich als bei den unstimulierten Tieren (55,5% IVP-

tauglich). Bis zum Stadium der Morula bzw. Blastozyste entwickelten sich 12,8% bei den Kontrolltieren und max. 17,7% der Oozyten nach IVF bei den hormonell behandelten Kälbern.

3. Nach Einsatz von FSH konnten pro stimuliertem Tier 6,8 Oozyten und pro Kontrolltier 6,7 Oozyten gewonnen werden. Von den Oozyten der stimulierten Tiere waren mit 61,3% signifikant mehr IVP-tauglich als bei den unstimulierten Tieren (51,2% IVP-tauglich). Bis zum Stadium der Morula bzw. Blastozyste entwickelten sich bei den hormonell behandelten Kälbern (12,2%) signifikant mehr Oozyten nach IVF als bei den Kontrolltieren (4,3%).

4. Die Wiederfindungsrate variierte zwischen den Versuchen (43-69%), nach Einsatz von FSH (vier Wiederholungen) konnten aus 63% der punktierten Follikel bei den stimulierten Tieren Oozyten gewonnen werden, bei den Kontrolltieren waren es 64%.

5. Die Reifungsraten (Erreichung der Metaphase II) waren mit 86,8% bei den Kontrolltieren und 85,5% bei den stimulierten Tieren nahezu identisch

6. In der Befruchtungsrate konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolltieren und hormonell stimulierten Tieren festgestellt werden. 59,3% waren bei den unstimulierten Kälbern normal befruchtet, 32,4% polysperm und 6,5% unbefruchtet. Bei 1,9% konnte nur ein Vorkern (vermutlich Parthenogenese) beobachtet werden. Bei den stimulierten Tieren waren 53,3% monosperm, 43,2% polysperm und 4,8% unbefruchtet. Hier waren 4,8% parthenogenetisch aktiviert.

7. Der durchschnittliche Durchmesser der Oozyten unstimulierter Kälber lag bei 118,3  $\mu\text{m}$ , bei den stimulierten waren es 119,7  $\mu\text{m}$ . Der Oozytendurchmesser adulter Rinder war mit durchschnittlich 123,3  $\mu\text{m}$  signifikant größer als die

Oozytendurchmesser der Kälber. Oozyten der Qualitätskategorie I hatten den größten Durchmesser, die der Qualitätskategorie III den kleinsten.

8 Nach Transfer von 36 Embryonen auf 24 Empfängertiere konnten 6 Trächtigkeiten erzielt werden. Eine von diesen Trächtigkeiten resultierte aus dem Transfer von Embryonen unstimulierter Kontrolltiere, das Kalb (weiblich, 71kg) verendete während des Auszuges. Zwei Empfängertiere abortierten im zweiten und letzten Drittel (Zwillinge, 35 und 37kg Geburtsgewicht). Drei Trächtigkeiten resultierten in drei lebenden Bullenkälbern (42 kg, 49 kg und 55 kg Geburtsgewicht).

Die Ergebnisse zeigen, daß durch den Einsatz von Gonadotropinen die Qualität der von präpuberalen Rindern gewonnenen Oozyten im Vergleich zu denen unstimulierter Kontrolltieren verbessert werden konnte, während die Anzahl an Follikeln nicht signifikant erhöht wurde. Es wurden mehrere Trächtigkeiten nach Transfer in vitro produzierter Embryonen aus Oozyten halbjähriger Rinder erzielt. Die damit erreichbare Reduzierung des Generationsintervalls kann ein Beitrag zur Beschleunigung des Zuchtfortschritts sein. Wenn es gelingt, die Ausbeute an übertragungsfähigen Embryonen weiter zu erhöhen, kann in naher Zukunft auch ein Einsatz in der Praxis in Erwägung gezogen werden.

## 7. SUMMARY

Andreas Kuwer

### Recovery of developmentally competent oocytes from hormonally stimulated prepubertal heifers through ultrasound guided transvaginal follicle puncture

The purpose of this work was to obtain developmentally competent oocytes through ultrasound guided follicle puncture in prepubertal heifers. A hormonal treatment protocol based on the use of various gonadotrophins was developed to improve the number and quality of cumulus oocyte complexes recovered from 6 month old heifers. For these experiments, 48 calves were divided into groups of 6-8 animals and punctured twice weekly. Oocytes judged to be suitable for IVP based on morphological criteria were matured, fertilized and cultured in vitro up to day 7 morula or blastocysts. Representative samples of these oocytes were measured to determine the diameter immediately after recovery. Following fixation and differential staining, the maturation and fertilization rates were also determined. The in vivo developmental competence of IVP embryos of quality judged to be transferable was tested by transfer to foster mothers.

The following results were obtained:

1. After stimulation of follicular growth with PMSG in the first experiment, the average yield over 12 puncture sessions was 3.8 oocytes per session from stimulated animals (71% suitable for IVP) and 2.7 oocytes for control animals (71.6% suitable for IVP). From unstimulated calves, 3.9% reached the morula or blastocyst stage by day 7, while from stimulated animals 16.2% reached the morula or blastocyst stage ( $p > 0.05$ ).

2. After the application of a combination of PMSG and FSH, 7.1 oocytes per donor were obtained from the stimulated animals and 6.8 oocytes per donor were obtained from control animals. A significantly greater proportion of the oocytes recovered were of quality suitable for IVP from the stimulated animals (69.7%) than from unstimulated animals (55.5%). A maximum of 12.8% of the embryos from control donors developed to the morula or blastocyst stage, while from stimulated animals 17.7% reached this stage.

3. After application of FSH, an average of 6.8 oocytes were obtained per session from the stimulated animals while an average of 6.7 oocytes were obtained per session from the control animals. A significantly greater proportion of the oocytes recovered from the stimulated animals were of a quality suitable for IVP (61.3%) than oocytes obtained from the control, unstimulated animals (51.2%). Following IVF, significantly more oocytes from hormonally treated animals developed to the morula and blastocyst stage (12.2%) than those from unstimulated animals (4.3%).

4. The recovery rate varied between experiments over the range of 43-69%. The average recovery rate following FSH application was 63% over four replicates and the number of oocytes recovered per punctured follicles for control animals was 64%.

5. The maturation rates (proportion reaching metaphase II) were identical: 86.8% for control animals and 85.5% for stimulated animals.

6. There was no significant difference in fertilization rate between the control animals and the hormonally stimulated animals. For control unstimulated animals, 59.3% of the oocytes were normally fertilized, 32.4% were polyspermic and 6.5% were unfertilized. Parthenogenetic activation was suspected in 1.9% of the embryos where only one pronucleus could be identified. Following IVF of oocytes from

stimulated animals, 53.3% were monospermic, 43.2% were polyspermic, 4.8% were unfertilized and 4.8% were parthenogenically activated.

7. The mean diameter of the oocytes from unstimulated calves was 118.8  $\mu\text{m}$ , while the mean diameter of oocytes from stimulated calves was 119.7  $\mu\text{m}$ . These were both significantly less than the mean oocyte diameter from adult cattle which was 123.3  $\mu\text{m}$ . ( $p < 0.05$ ). Category I oocytes had the greatest diameter while the smallest mean diameter was found with category III oocytes.

8. After the transfer of 36 embryos into 24 foster mothers, six pregnancies were established. Of these, one pregnancy resulted from the transfer of an embryo derived from an unstimulated animal. The calf, a female of 71 kg, died as a result of complications during delivery. Two of the pregnancies resulted in spontaneous abortion; one in the second trimester of pregnancy and the other (twins, weighing 35 and 37 kg) in the final trimester of pregnancy. Three pregnancies resulted in the live birth of three healthy bull calves weighing 42 kg, 49 kg and 55 kg at birth.

These results show that the quality of oocytes recovered from prepubertal heifers can be improved by the application of gonadotrophins in comparison to oocytes recovered from unstimulated animals although the number of follicles was not increased. It has been established that pregnancy can be established after transfer of IVP embryos from oocytes recovered from 6 month old calves. The resultant reduction in generation interval provides a further contribution toward acceleration of the rate of genetic gain. If, in the future, the yield of transferable embryos from prepubertal calves can be increased, then it will be economically practical to implement this in the field.