

**Aus dem Institut für Reproduktionsmedizin  
der  
Tierärztlichen Hochschule  
Hannover**

---

**Erfolgsbeeinflussende Faktoren im Rahmen der Embryonengewinnung  
beim kommerziellen ET des Rindes unter besonderer Berücksichtigung  
verschiedener Superovulationsschemata und Besamungstypen  
- Eine retrospektive Studie - \***

**INAUGURAL – DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
**Doctor Medicinae Veterinariae**  
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von

**Susanne Hupka**  
aus Winsen/Aller

Hannover 2000

**Wissenschaftliche Betreuung:** PD. Dr. S. Meinecke- Tillmann

**1. Gutachter:** PD. Dr. S. Meinecke- Tillmann

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Hoedemaker

Tag der mündlichen Prüfung: 31. 05. 2000

\* In Kooperation mit der  
Besamungs- und ET- Station Georgsheil  
Des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter  
26624 Südbrookmerland

***Meinen Eltern gewidmet***



**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>SCHRIFTTUM</b> .....	<b>8</b>
2.1	MISCHSPERMABESAMUNG.....	8
2.1.1	<i>Vaterschaftsnachweise</i> .....	9
2.1.2	<i>Doppelpaarung mit zwei Bullen oder Doppelbesamung mit zwei Bullen</i> .....	10
2.1.3	<i>Heterosperme Insemination (HI)</i> .....	13
2.1.4	<i>Ungleiche Nachkommensverhältnisse und der Fertilitätsindex</i> .....	15
2.1.5	<i>Zusammenfassung möglicher Ursachen für Fertilitätsunterschiede bei Doppelbesamung und Heterospermer Insemination</i> .....	16
2.1.6	<i>Anwendungsmöglichkeiten und Vorteile der Heterospermen Insemination</i> .....	18
2.2	BULLEN HOHER FRUCHTBARKEIT (HIGH FERTILITY BULLS).....	19
2.2.1	<i>kompensierbare und nicht kompensierbare Seminalfaktoren</i> .....	21
2.2.2	<i>Kompensierbare Seminalfaktoren</i> .....	21
2.2.3	<i>nicht kompensierbare Seminalfaktoren</i> .....	22
2.3	DIE EMBRYONENQUALITÄTSBEURTEILUNG.....	25
2.3.1	<i>Morphologische Beurteilung</i> .....	25
2.3.2	<i>andere Möglichkeiten der Beurteilung</i> .....	27
2.4	EINFLÜSSE AUF EMBRYONENQUALITÄT UND EMBRYONENGEWINNUNGSRATE.....	28
2.4.1	<i>Maternale Einflüsse</i> .....	28
2.4.1.1	Genetik.....	28
2.4.1.2	Rasse.....	29
2.4.1.3	Alter.....	30
2.4.1.4	Gesundheitszustand.....	31
2.4.1.5	Letzte Gravidität und Laktationstadium.....	32
2.4.1.6	Zyklusstadium.....	33
2.4.1.7	Anzahl Superovulationen in der Laktation.....	34
2.4.1.8	Die Bedeutung des dominanten Follikels für die Superovulation.....	34
2.4.2	<i>Hormone zur Superovulationbehandlung</i> .....	38
2.4.2.1	Gonadotropin- Priming.....	39
2.4.2.2	Down- regulation der Hypophyse.....	39
2.4.3	<i>Umfeld des Spendertieres</i> .....	40
2.4.3.1	unmittelbarer Einfluß des Menschen.....	41
2.4.4	<i>Paternale Einflüsse</i> .....	42
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>46</b>
3.1	DATENERFASSUNG.....	46
3.1.1	<i>Spendertiere</i> .....	48
3.1.2	<i>Präparate &amp; Behandlungsschemata zur Superovulationsinduktion</i> .....	48
3.1.3	<i>Besamungsschemata</i> .....	51
3.1.4	<i>Gewinnung der Embryonen 7 Tage post inseminationem</i> .....	51
3.1.5	<i>Beurteilung der Embryonen</i> .....	52
3.1.6	<i>Nachbehandlung der Spendertiere</i> .....	53
3.1.7	<i>weitere Behandlung der Embryonen</i> .....	53
3.1.8	<i>Erfassung weiterer Daten</i> .....	54
3.2	STATISTISCHE AUSWERTUNG:.....	54
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>55</b>
4.1	EINFLÜSSE DURCH DIE SPENDERKUH.....	55
4.1.4	<i>Einfluß des Alters der Spenderkuh</i> .....	55
4.1.2	<i>Einfluß der Superovulationsanzahl innerhalb der Laktation</i> .....	59

---

4.1.3	<i>Einfluß der Rastzeit</i> .....	63
4.1.4	<i>Einfluß des verwendeten Hormonpräparates</i> .....	65
4.2	BULLENEINFLÜSSE.....	70
4.2.1	<i>Beeinflussung des Geschlechts der Nachkommen durch den Bullen</i> .....	70
4.2.2	<i>Einfluß des Besamungsbullen auf die Embryonengewinnung</i> .....	73
4.2.3	<i>Zusammenhang zwischen NRR und Embryonengewinnung</i> .....	78
4.3	EINFLUß DER BESAMUNGSFORM.....	82
4.3.1	<i>Gibt es bei Doppelbesamungen eine Regelmäßigkeit, mit der sich eine Besamung durchsetzt ?</i> .....	86
4.4	SAISONALE EINFLÜSSE .....	87
4.5	EMBRYONENGEWINNUNG ÜBER DIE JAHRE 1991-1999.....	89
4.7	EINFLUß DES BETRIEBES .....	90
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>92</b>
5.1	EINFLUß DER DONORKUH.....	93
5.2	EINFLUß DES GONADOTROPINS .....	96
5.3	EINFLUß DES BULLEN.....	100
5.4	EINFLUß DES BESAMUNGSTYPUS.....	103
5.5	EINFLUß VON SAISON UND JAHR .....	107
5.6	EINFLUß DES BETRIEBES.....	108
<b>6</b>	<b>SCHLUßFOLGERUNGEN</b> .....	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>116</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>118</b>
<b>11</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>120</b>
<b>12</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>121</b>

## 1 EINLEITUNG

Die hohe Variabilität der Superovulationsergebnisse stellt immer noch einen erfolgslimitierenden Faktor in Embryotransferprogrammen beim Rind dar. Zahlreiche Studien in den letzten Jahren, die sich mit dieser Problematik befaßten, hatten zum Ziel, die Ursachen der Variabilität der Ovarreaktion zu erforschen.

Im kommerziellen Embryotransfer stellen eine geringe Gesamtzahl gewonnener Embryonen und eine schlechte Embryonenqualität ein großes wirtschaftliches Problem dar.

Die Ursachen für unbefriedigende Superovulationsergebnisse sind vielfältig und in ihrem gesamten Umfang noch nicht endgültig erforscht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, potentielle Einflußfaktoren auf die Gesamtzahl gewonnener Embryonen und die Qualität derselben zu untersuchen.

Auf der Embryotransferstation des Vereins ostfriesischer Stammviehzüchter in Georgsheil wurden im Beobachtungszeitraum von April 1991 bis Mai 1999 Uterusspülungen nach einer Superovulationsbehandlung bei Deutschen Holstein-Friesian Spenderkühen vorgenommen. Das umfangreiche Datenmaterial aus 1934 ET-Protokollen liegt dieser Arbeit zugrunde.

Statistisch analysiert wurden mögliche Einflüsse seitens der Donorkuh und ihrer Umwelt, des eingesetzten Besamungsbullen, des zur Superovulationsinduktion verwendeten Gonadotropins und des Besamungsschemas auf die Gesamtgewinnungszahl von Eizellen/ Embryonen sowie die Anzahl transfer-tauglicher Embryonen.

Besondere Berücksichtigung fand dabei die vergleichende Untersuchung der Eignung des ovinen FSH (Ovagen®) zur Superovulationsinduktion des Rindes, bei dem es bislang sehr selten eingesetzt wurde.

Außerdem galt in der vorliegenden Arbeit besonderes Interesse dem Einsatz verschiedener Besamungstypen und vor allem einer Doppelbesamung mit zwei verschiedenen Bullen zur Verbesserung der Gesamtzahl und Qualität der gewonnenen Embryonen im Rahmen eines kommerziellen ET-Programmes.

Des Weiteren wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Non-Return-Rate eines Bullen und seiner Fruchtbarkeit im ET geprüft.

Schließlich sollte eine potentielle paternale Beeinflussung auf das Geschlechterverhältnis der Nachkommen untersucht werden.

## 2 SCHRIFTTUM

### 2.1 MISCHSPERMABESAMUNG

In der künstlichen Besamung (KB) im Nutztierbereich dominiert bis heute die sogenannte homosperme Insemination. Dies gilt auch für die Besamungen der Empfängertiere im Rahmen von Embryotransferprogrammen in der Rinderzucht.

Homosperme Insemination ist die Besamung eines weiblichen Tieres mit dem Sperma eines männlichen Tieres innerhalb einer unbeeinflußt ablaufenden, natürlichen Brunst oder, wie im Embryotransfer üblich, nach induzierter Superovulation. Dabei sind Doppelbesamungen, also zwei Besamungen innerhalb eines Östrus, vor allem im Embryotransfer durchaus üblich (BUNGARTZ und NIEMANN 1994, KOHRAM et al.1998, OIKAWA et al.1998, SUGANO und SHINOGI 1999). Auch Dreifachbesamungen sind möglich (GRASSO et al.1989).

Im Gegensatz zur homospermen Insemination steht die heterosperme Insemination.

Die heterosperme Insemination ist definiert als eine Besamung, bei der ein weibliches Individuum innerhalb einer kurzen Zeitspanne um die Ovulation mit dem Sperma zweier oder mehrerer männlicher Individuen besamt wird, so daß eine Mischung ihrer Spermien zur Befruchtung verfügbar ist (DZIUK 1996). Diese Bedingung kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfüllt werden.

#### 1. *Heterosperme Insemination im engeren Sinne (HI)*

Heterosperme Insemination (HI) ist die Applikation von gemischtem Sperma verschiedener Vatertiere, sogenanntem Mischsperma. Das bedeutet, daß die Ejakulate der männlichen Tiere zur Zeit der Insemination, also außerhalb des weiblichen Genitaltraktes, bereits gemischt vorliegen (BEATTY 1957, HESS et al. 1958, STEWART 1974, NELSON 1975, REVELL 1993). Es besteht die Möglichkeit anstelle von Mischsperma aus den Ejakulaten zweier Bullen, auch die Ejakulate von drei oder vier Bullen zu mischen (NELSON 1975).

Im internationalen Schrifttum werden auch Versuche beschrieben, in denen die Spermienfraktion eines männlichen Tieres nach Abtrennung der Seminalphase mit dem Seminalplasma eines anderen männlichen Tieres gemischt und diese Mischung dann inseminiert wurde (HENAULT und KILLIAN 1996).

Geht man von einer gleichen Anzahl von fertilen Spermien aus, die im die Verhältnis 1 : 1 gemischt wurden, so haben sie theoretisch die gleichen Bedingungen und gleichen Chancen, jeweils 50% der Nachkommen zu zeugen (BERGER 1995). Das ist in praxi jedoch fast nie der Fall.

## 2. *Doppelte Paarung mit zwei Bullen oder auch Doppelbesamung mit zwei Bullen*

Unter einer Doppelbesamung wird im Schrifttum die Besamung oder auch die natürliche Anpaarung eines weiblichen Tieres mit zwei oder mehr männlichen Tieren innerhalb einer Brunstperiode verstanden. Die Vermischung der Spermien geschieht erst im Genitaltrakt des weiblichen Tieres ( COLE und DAVIS 1914 zit.nach DZIUK 1996, HAMMOND 1934, DZIUK 1965, SHARMA und HAYS 1975, MARTIN und DZIUK 1977).

Diese Form der Doppelpaarung kommt in der Natur bei einigen Spezies regelmäßig vor und sichert so letztlich das Fortbestehen der Art. Soziale Dominanz und eine starke Libido sind nicht gleichbedeutend mit hoher Fertilität, so daß es sinnvoll für das weibliche Tier ist, sich mit mehreren Geschlechtspartnern anzupaares (DEWESBERRY 1984, GIBBS et al.1990).

Die Doppelbesamung dagegen ist die gezielte Besamung mit dem Sperma zweier unterschiedlicher Vatertiere innerhalb einer Brunst.

Hierbei liegt immer eine mehr oder weniger lange Zeitspanne zwischen den Besamungen, so daß der Zeitfaktor als wichtiges Kriterium in die Beurteilung der Befruchtungsergebnisse mit einbezogen werden muß ( DZIUK 1996).

Eine Doppelbesamung mit zwei Bullen und eine heterosperme Insemination sind folglich in keinem Fall gleichzusetzen, auch wenn zwischen ihnen in der Literatur nicht immer klar unterschieden wird.

Im Folgenden wird dennoch versucht, die Entwicklungen und Ergebnisse dieser Versuche anhand der Literatur getrennt voneinander darzustellen.

### 2.1.1 VATERSCHAFTSNACHWEISE

Um Versuche mit Mischsperma nach Doppelbesamung oder HI auswerten zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, die aus den Versuchen hervorgegangenen Nachkommen eindeutig einem Vater zuzuordnen. Bei unklarer Herkunft können sie nicht in eine Statistik aufgenommen werden (DZIUK 1996).

In frühen Experimenten wurden die Nachkommen auf Grund ihres Phänotyps einem Vater zugeordnet. Die eingesetzten männlichen Probanden mußten sich deutlich in ihrem äußeren Erscheinungsbild voneinander unterscheiden, dieses war z.B. mit einem Albino als einem der potentiellen Väter möglich (HAMMOND et al.1934 zit. nach DZIUK 1996).

Später ging man dazu über, die Nachkommen in Bezug auf ihre Blutgruppen zu typisieren (STEWART et al.1974, SAACKE et al.1980 b,c ). Diese Methode ist aber nicht immer hundertprozentig eindeutig.

Auf Grund der schnellen Fortschritte in der Gentechnik ist es heute üblich, die Vaterschaftsnachweise mittels Genanalysen durchzuführen (BURKE et al.1998, GIBBS et al.1990, VANKAN u. FADDY 1999). Diese Methode ist von höchster Genauigkeit, aber auch entsprechend aufwendig.

Auch morphologische Unterschiede zwischen den Spermien verschiedener Vatertiere ermöglichen eine Zuordnung. So benutzten MUNKITTRICK et al. (1992) in einer Studie über akzessorische Spermien mit zwei verschiedenen Bullenspermienpopulationen individuelle Kopfformunterschiede der Spermien zu ihrer Unterscheidung.

Bedeutung haben aber auch Markersubstanzen wie z.B. Fluorochrome, mit denen eine Spermienfraktion eindeutig gekennzeichnet wird (PARRISH und FOOTE 1985, HENAULT et al.1995).

Welche dieser Möglichkeiten in den einzelnen Versuchen ihre Anwendung findet, muß im Einzelfall unter Berücksichtigung der Gegebenheiten entschieden werden.

#### 2.1.2 DOPPELPAARUNG MIT ZWEI BULLEN ODER DOPPELBESAMUNG MIT ZWEI BULLEN

Berichte über Doppelbesamungen mit zwei verschiedenen Bullen sind im Schrifttum sehr selten, so daß die folgende Übersicht zu diesem Thema im vor allem andere Tierarten berücksichtigen muß.

Erste Berichte über Doppelpaarungsversuche finden sich in der Literatur um 1914 (COLE und DAVIS 1914 zit. nach DZIUK 1996), es handelte sich dabei um Versuche mit Ratten. Eingesetzt wurden Albinos und normal gefärbte Vatertiere, die nach Doppelpaarung weiblicher Tiere Nachkommen im Verhältnis 24:190 zeugten. In den Ergebnissen wurden diese Dominanzphänome eines Vatertieres erwähnt, Gründe hierfür aber nicht genannt.

In den dreißiger Jahren wurden Besamungen mit zwei Vatertieren bei Kaninchen (HAMMOND 1934) und Schweinen (ROBERTS und CARROLL 1939) durchgeführt, die Autoren beobachteten ebenfalls Fertilitätsunterschiede zwischen den eingesetzten Tieren. Erste Vermutungen waren, daß in diesem Besamungssystem die Zeit eine wichtige Rolle spielen könnte, da ein günstigerer Besamungszeitpunkt für eines der beiden Vatertiere evtl. vorliegende, leichte Fertilitätsmängel ausgleichen könnte.

Zu diesen Ergebnissen kamen auch weitere Autoren bei anderen Tierarten, so zum Beispiel bei Kaninchen (DZIUK 1965), Schweinen (SUMPTION 1961, DZIUK 1970) und Schafen (SLEE 1964, DZIUK 1970).

DZIUK (1970) kam nach Versuchen mit Schweinen zu der Erkenntnis, daß der günstigste Zeitpunkt für die Besamung ca.12 Stunden vor der Ovulation und nicht zur Zeit der Ovulation liegt und somit der Eber, der zu diesem Zeitpunkt im Zuge eines Doppelbesamungsversuches eingesetzt wurde, eine

größere Anzahl von Nachkommen zeugte, auch wenn er im direkten Fruchtbarkeitsvergleich nicht überlegen war.

Diese Studien sind zwar auf Grund der oftmals nicht standardisierten Bedingungen vorsichtig zu bewerten, zeigen aber alle deutliche Unterschiede in der relativen Fruchtbarkeit in Abhängigkeit zum Zeitpunkt der Besamung (DZIUK 1996).

Einen anderen Aspekt der Doppelpaarung mit verschiedenen Vartieren untersuchte MUSIALEK (1969).

Er bewies im Mäuseversuch, daß soziale Dominanz und eine starke Libido nicht zwangsläufig positiv mit einer hohen Fertilität korreliert sind, diese Tatsache aber in einem natürlichen Mäuseverband dadurch maskiert sein kann, daß sich das ranghöchste Tier am häufigsten paart.

Die Bedeutung des Besamungszeitpunktes in Bezug zur Ovulation ist für die Durchsetzung der Spermien eines Partners im Doppelbesamungsversuch von großer Bedeutung und war Gegenstand weiterer Untersuchungen an Ratten (SHARMA et al. 1975), Hühnern (MARTIN et al. 1974, MARTIN und DZIUK 1977), Schweinen (MARTIN und DZIUK 1977) und Hamstern (HUCK 1989).

Es wurde darauf geachtet, daß sich die Ejakulate der beteiligten Tiere makroskopisch und mikroskopisch nicht wesentlich unterscheiden (MARTIN und DZIUK 1977). In diesen Versuchen stellte sich heraus, daß der Zeitpunkt der Besamung in Bezug zur Ovulation für das Nachkommensverhältnis im Doppelpaarungsversuch entscheidend ist (HUCK 1989, DZIUK 1996). Wichtig ist auch das Verhältnis der Spermienanzahl der konkurrierenden männlichen Tiere. Unter den Versuchsbedingungen im Doppelpaarungsversuch bei Hühnern erwiesen sich dabei das Alter der männlichen Tiere, die Jahreszeit, die Rasse des weiblichen Tieres und die absolute Spermienzahl als vernachlässigbar (MARTIN et al. 1974).

Die in den Doppelbesamungsversuchen aufgestellte Fruchtbarkeitshierarchie unter den beteiligten männlichen Tieren stimmte mit der Hierarchie nach homospermer Insemination überein. Diese Versuchsform war somit ein einfacher Test, um die relative Fertilität innerhalb einer Gruppe männlicher Tiere zu ermitteln (MARTIN und DZIUK 1977). Ohne standardisierte Bedingungen ist diese These jedoch nicht haltbar.

In einer Studie mit 12 Bullen der Rasse Aberdeen Angus untersuchten LUNSTRA und LASTER (1982) sowie LUNSTRA (1985) die Trächtigkeitsraten (60 Tage) nach drei verschiedenen Anpaarungsschemata. Die erste Gruppe der eingesetzten Färsen wurde einmal mit einem Bullen, die zweite Gruppe dreimal mit dem selben Bullen und die dritte Gruppe mit drei verschiedenen Bullen angepaart. Dabei stellten sich bezüglich der Trächtigkeitsrate zwischen einer Einzelpaarung bzw. einer Dreifachpaarung mit dem selben Bullen keine signifikanten Unterschiede heraus. Die

Trächtigkeitsrate nach dem Einsatz von drei verschiedenen Bullen erwies sich jedoch mit 74,0 % der Rate nach dem Einsatz eines einzigen Bullen in Gruppe 2 (62,9 %) als statistisch signifikant überlegen ( $P < 0,05$ ). Die Autoren sahen eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis darin, daß durch den Einsatz von mehreren Bullen Fruchtbarkeitsmängel subfertiler Bullen durch andere Bullen kompensiert werden können.

DETTNER et al. (1997) führten eine Studie an Tieren der Rasse Holstein-Friesian durch. Es handelte sich dabei um Doppelbesamungsversuche im Rahmen eines kommerziellen Embryotransferprogrammes. Superovulierte Spendertiere unterschiedlichen Alters wurden zweimal im Abstand von 12 Stunden mit dem Sperma des selben Bullens oder mit zwei verschiedenen Bullen besamt. Die Embryonengewinnung erfolgte sieben Tage post inseminationem. Die Autoren beobachteten nach der Besamung mit zwei Bullen leicht verbesserte Ergebnisse der Gesamtzahl gewonnener Embryonen und der Embryonenqualität.

In einem Versuch mit Hamstern (HUCK 1985) wurden Doppelbesamungen in wechselnden Zeitabständen zur Ovulation durchgeführt, und im Extremfall zeugte ein fertiler Hamster keine Nachkommen. Der Autor postulierte daraufhin, daß die Zeit in diesen Versuchen einen vorhandenen Fertilitätsvorteil zum Teil oder sogar ganz maskieren kann. Unter diesen Umständen wäre eine aufgestellte Hierarchie nicht gültig.

Bei Nutztieren existiert ein optimaler Besamungszeitpunkt, der ungefähr 12 Stunden vor der Ovulation liegt. Um diesen Zeitpunkt herum liegt eine Zeitspanne von wahrscheinlich weniger als acht Stunden, die dem Optimum nahekommt. In dieser Zeitspanne können leichte Fruchtbarkeitsmängel ganz oder teilweise abgeschwächt werden. Die zwischen Spermienfraktionen unterschiedlicher Probanden variierende benötigte Zeit für Kapazitation und Penetration der Oozyte muß zum Besamungszeitpunkt in Relation gesetzt werden (DZIUK 1996).

Die praktische Bedeutung der Doppelbesamung mit verschiedenen Vatertieren soll in der größeren Chance liegen, ein Vatertier von hoher Fertilität unter den Probanden zu haben und so die tatsächliche Befruchtungsrates insgesamt zu steigern (MARTIN und DZIUK 1977).

Die Erkenntnisse aus diesen Versuchen zeigen aber auch, daß bei allen Auswertungen von Versuchen mit heterospermer Insemination der Einfluß des Zeitpunktes der Insemination in Bezug zur Ovulation nicht außer acht gelassen werden darf, da ansonsten in den Versuchen ermittelte Fruchtbarkeitshierarchien unter Vatertieren einer genaueren Prüfung nicht standhalten.

### 2.1.3 HETEROSPERME INSEMINATION (HI)

Erste Berichte über die Anwendung von Mischsperma stammen aus der ehemaligen U.d.S.S.R (ABDULJHANOV 1951 bei Schafen, RADNABAZARON 1951 bei Rindern, zitiert nach KUSHNER 1954). Aus ihnen ging der Vorteil einer Besamung mit Mischsperma gegenüber einer Einzelbesamung hervor. Bei der heterospermen Insemination war den Autoren zu Folge von einer erhöhten Trächtigkeitsrate, größeren Würfen und einem höheren Geburtsgewicht der Nachkommen auszugehen. Der Vorteil der HI wurde damals auf einen „vigor heterospermicus“ zurückgeführt. Die Ergebnisse konnten jedoch in den folgenden Jahren nicht in ihrer Gesamtheit bestätigt werden.

So konnten FRAPPEL und WILLIAMS (1956) und BEATTY (1957) in ihren Studien an Kühen bzw. Kaninchen keine Steigerung der Konzeptionsraten feststellen.

HESS et al. (1958) stellten fest, daß Mischsperma im Vergleich zu Mono-sperma eine verbesserte Motilität und Überlebensrate aufwies. Sie verbesserten außerdem durch HI in einem Versuch mit 1422 Kühen die Non-Return-Rate (NRR) nach 16 Wochen um 11,5% bei Holstein-Bullen und um 10% bei Guernsey-Bullen.

Eine leichte Verbesserung der NRR um 2,6% nach heterospermer Insemination gelang auch BEATTY et al. (1969). Sie konnten jedoch keine Motilitätssteigerung nach Mischung der verschiedenen Ejakulate feststellen. Letzteres gelang auch nicht in einem Versuch mit Tiefgefriersamen (NELSON et al. 1975).

Eine gesteigerte Befruchtungsrate nach HI konnte von weiteren Autoren in den folgenden Jahren nachgewiesen werden (STEWART et al. 1974).

BEATTY (1960) stellte in Untersuchungen an Kühen ein weiteres Phänomen fest: War ein Bulle nach homospermer Besamung nicht in der Lage Nachkommen zu zeugen, so konnten nach HI nachweislich einige Nachkommen von ihm gezeugt worden sein. Der Autor bezeichnete dieses als „assisted fertility“. Eine Art Heterosiseffekt durch die Mischung mehrerer Ejakulate wurde ebenfalls diskutiert (LEVIS 1976, GROOTEN 1988 beim Schwein).

In einer dreijährigen Studie mit Mischsamen von drei Bullen wurden sowohl Disperma- als auch Trispermakombinationen getestet (NELSON et al. 1975). Die Befruchtungsrate ließ sich nach HI mit Disperma leicht, jedoch nicht statistisch signifikant, steigern. Nach Trispermabesamung ließ sich die Befruchtungsrate um 7,3% signifikant erhöhen.

STEWART et al. (1974) mischten Sperma von vier Bullen und erreichten so eine Steigerung der Non-Return-Rate um 8,9%. ELLIOT (1974) ermittelte in seinen Versuchen eine ähnlich signifikante Steigerung.

Im internationalen Schrifttum gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen über den Mischspermaeinsatz in der Schweinereproduktion. Sie befassen sich mit der Frage der Steigerung der Befruchtungsrate und speziell mit einer Steigerung der Wurfgröße durch HI.

In Versuchen mit Mischsperma konnte eine statistisch abgesicherte Anhebung der Ferkelzahl je besamte Sau um 13,2% und eine um 5,5% erhöhte Trächtigkeitsrate gegenüber Besamungen mit nur einem Vatertier festgestellt werden (HEYDORN und PAUFLER 1976, HEYDORN und HOBEIN 1977). Dieser Trend konnte jedoch von WEGMANN (1990) in seiner Studie an Sauen nicht bestätigt werden.

Eine mögliche Ursache für die gesteigerte Fertilität nach heterospermer Insemination soll in einer unterschiedlichen Kapazitations- und Überlebensdauer der verschiedenen Spermien liegen (HEYDORN et al. 1977, HEYDORN und MEYER 1977).

Es ist davon auszugehen, daß in Mischsamenportionen die Wahrscheinlichkeit steigt, Spermien von hoher Vitalität zu beeinhalteten.

Verschlechterungen in der Befruchtungsrate bei einigen Eberkombinationen waren jedoch auch zu beobachten. Dieses Phänomen wurde von den Autoren auf gegenseitige Hemmung der Spermienfraktionen evtl. auch auf Agglutinationen der Spermienköpfe zurückgeführt.

GROOTEN (1988) berichtet über den Einsatz von Mischsperma beim Schwein mit unterschiedlichen Ergebnissen. Insgesamt geht er jedoch von einem Vorteil der Mischspermaanwendung in der Mastschweineproduktion aus. Diese These konnte durch die Arbeit von BORTOLOZZO (1992) bestätigt werden. Vor allem der Einsatz von HI in Betrieben mit schlechten Abferkelraten und bei Jungsauen, deren Trächtigkeitsraten gewöhnlich niedriger als bei Altsauen liegen, scheint angezeigt. In diesen Fällen konnte in den Versuchen eine signifikante Erhöhung der Trächtigkeitsraten und der Wurfgrößen nachgewiesen werden.

REVELL (1993) griff in jüngerer Zeit den postulierten Vorteil der Trisperma-Besamung beim Rind auf.

In dem beschriebenen Versuch wurde auf möglichst standardisierte Bedingungen geachtet. Die drei eingesetzten Bullen einer Rasse wiesen jeder für sich im Besamungseinsatz befriedigende Fruchtbarkeitsergebnisse auf. Die Samenportionen enthielten eine definierte Anzahl an Spermien.

Die Befruchtungsrate nach Trispermaeinsatz konnte in diesem Versuch nur um 2,1% gesteigert werden. REVELL (1993) ging deshalb davon aus, daß die Ejakulate von Bullen verschiedener Rassen gemischt werden müßten, um die Fruchtbarkeitsrate signifikant steigern zu können. Dieses vermuteten bereits NELSON et al. (1975).

#### 2.1.4 UNGLEICHE NACHKOMMENSVERHÄLTNISSE UND DER FERTILITÄTSINDEX

Nach heterospermer Insemination traten wiederholt ungleiche Nachkommensverhältnisse auf.

Hierüber wird bei verschiedenen Tierarten berichtet, so z.B. beim Kaninchen (BEATTY 1960, O`REILLY 1972), bei Rindern (ELLIOT 1974, NELSON et al. 1975, SAACKE et al. 1980) und Hühnern (MARTIN et al. 1974, MARTIN und DZIUK 1977).

Nach BEATTY (1960) ist die ungleiche Nachkommensverteilung auf eine unterschiedliche Spermiovitalität in den originären Ejakulaten zurückzuführen.

Saisonale Unterschiede beeinflussten die Ergebnisse nicht (BEATTY et al. 1969, MARTIN et al. 1974, STEWART et al. 1974). Die Ergebnisse wurden vorhersehbar und eine Fertilitätshierarchie bildete sich unter den Probanden aus. Gründe für das ungleiche Nachkommensverhältnis liegen im Gegensatz zu Doppelbesamungs- Versuchen nicht in dem direkten Zeitvorteil einer Spermienfraktion, da die Ejakulate bereits vor der Besamung gemischt vorlagen. Die Ursachen sind komplex und noch nicht endgültig erforscht.

Bei Tiefgefriersperma hängt es z.B. von der Widerstands- und Überlebensfähigkeit der Spermien ab, die Kryokonservierung zu überstehen. Diese Fähigkeit der Spermien zeichnet sich durch eine hohe, individuelle Variabilität bei den Bullen aus (STEWART et al. 1974, NELSON et al. 1975, BEATTY et al. 1976, SAACKE et al. 1980 a,b,c).

ROBL und DZIUK (1988) stellten in ihren Studien bei Mäusen fest, daß die Nachkommensverhältnisse im HI Versuch u.a. von der zwischen den männlichen Tieren variierenden Zeit abhing, die die Spermien zur Wanderung durch den weiblichen Reproduktionstrakt zum Ort der Befruchtung, sowie zur Anheftung und Penetration der Oozyte benötigten.

Diese benötigte Zeit scheint vor allem mit der Effektivität der Kapazitation zusammenzuhängen und einer genetischen Fixation zu unterliegen (HOPPE 1980). DZIUK (1996) vermutete ebenfalls eine genetische Fixation und ging davon aus, daß die Überlebensfähigkeit der Spermien und ihre Fähigkeit zur schnellen Anheftung und Penetration der Eizelle genetisch eng miteinander gekoppelt sind und die Fertilität entscheidend beeinflussen.

Der Besamungszeitpunkt spielt bei der HI insofern eine Rolle, als daß es individuell, für die Spermien eines jeden Tieres, einen optimalen Zeitpunkt zur Besamung gibt, da die Zeitdauer der Kapazitation differiert. Weicht der tatsächliche Besamungszeitpunkt vom Optimum für einen Bullen erheblich davon ab, so wird sich das Nachkommensverhältnis zu seinen Ungunsten verschieben (DZIUK 1996).

Die in Versuchen mit heterospermer Insemination bei Kühen ermittelten Fruchtbarkeitshierarchien unter den eingesetzten Bullen können praktisch genutzt werden. BEATTY et al. (1969) entwickelten unter den

Versuchsbullen nach HI einen Fertilitätsindex, der mit dem Index nach homospermer Besamung übereinstimmte. Er war durch heterosperme Insemination 170 mal genauer zu bestimmen.

MARSHALL et al. (1988) sahen eine enge Verbindung des Fertilitäts- oder auch HI-Index mit Labortests, wie z.B. der Spermienmotilitätsprüfung, die zur Beurteilung der Fruchtbarkeit herangezogen werden.

In den Studien von ROBL und DZIUK (1987,1988) wird deutlich, daß verborgene, minimale Fertilitätsunterschiede in einer Gruppe männlicher Probanden mit großer Sensibilität durch Versuche mit HI aufgedeckt werden können. Ein einmal eingestelltes Verhältnis der Nachkommen bleibt unabhängig von der Saison und der absoluten Spermienzahl konstant, solange das Verhältnis der Komponenten zueinander nicht verändert wird. Drastische, fertilitätsbeeinflussende Maßnahmen am Tier oder direkt an den Spermien, wie z.B. Umweltgifte, Radioaktivität oder aber unsachgemäße Lagerung der Spermien, sind mittels HI-Versuchen mit großer Empfindlichkeit und Genauigkeit nachzuweisen. Hier liegen praktische Anwendungsmöglichkeiten dieser Versuche (DZIUK 1996).

#### 2.1.5 ZUSAMMENFASSUNG MÖGLICHER URSACHEN FÜR FERTILITÄTSUNTERSCHIEDE BEI DOPPELBESAMUNG UND HETEROSPERMER INSEMINATION

Eine endgültige Erklärung für die durch Versuche mit heterospermer Insemination entdeckten Fertilitätsunterschiede gibt es bis dato nicht. In der Literatur wird jedoch eine Vielzahl von Erklärungsansätzen geboten. Sie spielen in unterschiedlichem Maße zusammen.

Gegenüber Samen von nur einem Vatertier hat Mischsamen den vermuteten Vorteil in der Art eines Heterosiseffekts zwischen den Spermienfraktionen, der die Fertilität insgesamt steigert (SEIDL und HEYDORN 1978, LEVIS 1976, GROOTEN 1988). HEYDORN et al. (1977) und HENAULT und KILLIAN (1995) beobachteten in ihren Studien, daß Interaktionen zwischen Seminalplasma und Spermien oder aber direkte Spermienwechselwirkungen der verschiedenen Vatiertiere für eine verbesserte Fruchtbarkeit des Mischsamens verantwortlich sind. Die Bedeutung des Seminalplasmas wird in jüngster Zeit durch die Identifizierung der im Seminalplasma vorhandenen Fertilitätsfaktoren, bei denen es sich um Peptide / Proteine aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen handelt, offensichtlich (KANDELL et al. 1992, KILLIAN et al. 1993). Sie verbinden sich zur Zeit der Ejakulation mit den Spermien und beeinflussen die Fruchtbarkeit entscheidend (BELLIN et al. 1994, 1996, 1998; McCAULEY et al. 1999, PARENT et al. 1999). Auf diese Thematik wird in Kapitel 2.2 der vorliegenden Arbeit eingegangen.

SEIDL und HEYDORN (1977) stellten in ihren Untersuchungen an Ebersperma fest, daß es auch zu negativen Interaktionen bei Mischsamen kommen kann. Bei einigen Eberkombinationen waren die Befruchtungsergebnisse nach HI schlechter als die jedes einzelnen Ebers für sich im monospermen Einsatz. An den Spermischwänzen dieser Eber fanden sich nach Zugabe des Seminalplasmas des jeweils anderen Ebers morphologische Veränderungen in Form flockiger Anlagerungen. Diese wurden bei anderen Mischkombinationen nicht beobachtet und die Autoren gingen davon aus, daß die Veränderungen durch die Interaktion Seminalplasma - Spermium entstanden waren.

Zu den Fertilitätsunterschieden der einzelnen Probanden innerhalb der HI-Versuche bietet das Schrifttum verschiedene Erklärungsansätze.

BEATTY et al.(1960) sahen die Ursache in einer unterschiedlichen Überlebenszeit und Vitalität der verschiedenen Spermienfraktionen im Mischsperma.

Im Falle der Tiefgefrierung kommt eine unterschiedliche Widerstandsfähigkeit der Spermien gegenüber diesem Prozess hinzu (STEWART et al. 1974; NELSON et al. 1975; SAACKE et al. 1980). So weichen die Befruchtungsergebnisse bei Frischsperma und TG-Sperma im Mischspermaversuch z.T. erheblich voneinander ab.

Die Zeit spielt in all diesen Versuchen eine wichtige, die effektive Fertilität beeinflussende Rolle. In Doppelbesamungsversuchen ist es der direkte Zeitvorteil, den eine Spermienfraktion gegenüber der anderen haben kann. Es gibt einen optimalen Besamungszeitraum, der ca. 12 Stunden vor der Ovulation liegt und nur einen kurzen Zeitraum umfaßt. In dieser Zeit können leichte Fertilitätsmängel zum Teil oder aber ganz ausgeglichen werden. Dieses kann sich im Nachkommensverhältnis positiv für den betreffenden Probanden auswirken (DZIUK 1996). Die negative Auswirkung eines ungünstigen Besamungszeitpunktes ist offensichtlich.

Bei der heterospermen Insemination im engeren Sinne gilt dieser Zeitvorteil nicht. Hier ist es sehr wahrscheinlich vor allem die von den Spermien benötigte Kapazitationszeit der Spermien unterschiedlicher Vatertiere, die einem der Probanden unter Umständen einen Zeitvorteil verschaffen kann (ROBL und DZIUK 1987, HOPPE 1980, DZIUK 1996). Die Kapazitationszeit ist genetisch fixiert und individuell sehr unterschiedlich (HOPPE 1980). DZIUK (1996) geht zudem davon aus, daß die Überlebenszeit der Spermien genetisch eng mit den genannten Faktoren gekoppelt ist, bewiesen ist dies jedoch noch nicht.

### 2.1.6 ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN UND VORTEILE DER HETEROSPERMEN INSEMINATION

Die Fertilität eines Vatertieres ist zum einen von Umweltfaktoren, dem Alter und Gesundheitszustand des Tieres und der Saison abhängig. Sie wird aber zum anderen auch von weniger deutlichen Faktoren beeinflusst. Die aus ihnen resultierenden Fertilitätsunterschiede innerhalb einer Gruppe männlicher Zuchttiere sind von großem Interesse für den Tierzüchter. Denn wird zum Beispiel ein Vatertier an 100 weibliche Tiere angepaart, so ist sein Einfluß auf die Reproduktionsleistung 100 mal größer als der jedes einzelnen weiblichen Tieres (DZIUK 1996).

Der von BEATTY et al. (1969) im HI-Versuch ermittelte Fertilitätsindex mit einer 170mal größeren Genauigkeit als ein nach homospermer Insemination ermittelter Index könnte praktische Anwendung als Bestandteil von Fruchtbarkeitsprüfungen bei Bullen finden (MARSHALL et al. 1988). Eine Überprüfung der Reproduktionsleistung / Fertilität einer Gruppe von männlichen Probanden und die Aufstellung einer Fruchtbarkeitshierarchie ist unter den Bedingungen des HI-Versuchs *in vivo* (NELSON et al. 1975) und *in vitro* (HAMMITT et al. 1989) möglich.

Da Fertilitätsunterschiede auch zwischen Tieren vorhanden sind, deren Ejakulate sich bei den üblichen makroskopischen und mikroskopischen Untersuchungen nicht unterscheiden, stellen die HI-Versuche eine Möglichkeit dar, diese Differenzen aufzudecken (MARTIN und DZIUK 1977).

Unterschiede lassen sich innerhalb einer Versuchsgruppe durch die gleichen Ausgangsbedingungen der Spermien im HI-Versuch mit großer Genauigkeit ermitteln (ROBL und DZIUK 1987, 1988).

Jedes Spermium hat theoretisch die gleiche Chance, die Eizelle zu befruchten, unabhängig von variierenden Einflüssen wie die des weiblichen Tieres, der Saison, der Umwelt, des Managements und der Fähigkeit des Besamungstechnikers (DZIUK 1996).

Nach BERGER (1995) haben die HI- Versuche gegenüber der homospermen Besamung den Vorteil der viel höheren Genauigkeit und Wiederholbarkeit.

In einer Studie mit Bullensperma konnte REVELL (1993) die Befruchtungsrates nach Trispermaeinsatz deutlich, jedoch nicht statistisch signifikant steigern. Der Trend zu einer verbesserten Befruchtungsrates nach Mischspermaeinsatz beim Rind ist jedoch gegeben (BEATTY et al. 1969, NELSON et al. 1975, REVELL 1993).

ENGELBRECHTEN et al. (1973) und GROOTEN (1988) sahen bei der Benutzung von Mischsperma bei Sauen zudem weitere praktische Vorteile und Anwendungsmöglichkeiten. Sie sind bedingt auch für das Rind zutreffend:

- 1) Der Uterus ist in der Lage, Antikörper gegen bestimmte Spermientypen zu bilden. Bei Mischsperma liegt dieses Phänomen möglicherweise nur gegen das Sperma eines Vatertiers vor.
- 2) Preissenkung bei evtl. verringerbaren Samenzellportionen.
- 3) Überprüfung der Kombinationseignung verschiedener Rassen durch eine Zuchtwertermittlung der männlichen Tiere mit heterospermer Insemination.
- 4) Fertilitätsverbesserung bei Jungsaunen und speziell in Betrieben mit schlechten Befruchtungsraten.
- 5) Steigerung der Wurfgrößen.
- 6) Erzeugung von Mastferkeln (REED et al. 1984).

## 2.2 BULLEN HOHER FRUCHTBARKEIT (HIGH FERTILITY BULLS)

Unter Bullen hoher Fruchtbarkeit versteht man im internationalen Schrifttum Tiere, deren Befruchtungsergebnisse im Besamungseinsatz deutlich über dem Durchschnitt liegen.

Die Befruchtungsraten werden mit der NRR nach 59 Tagen angegeben. Die NRR werden für hochfertile Bullen mit  $78 \pm 1\%$  und für subfertile Bullen mit  $66 \pm 2\%$  angegeben (EID et al. 1994, LONERGAN 1994).

Die Ursachen für diese erheblichen Fruchtbarkeitsunterschiede sind vielfältig und bis heute noch nicht endgültig geklärt.

Fest steht, daß Standardcharakteristika von Spermaproben wie Volumen, Spermienkonzentration, der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien und der Prozentsatz intakter Akrosomen nur in geringem Maße mit der Fruchtbarkeit der Bullen korreliert sind (EID et al. 1994). Viel entscheidender sind die *in vivo* im weiblichen Tier und dort am Ort der Befruchtung ablaufenden Prozesse wie Kapazitation, Akrosomreaktion und die tatsächliche Befruchtung der Eizelle (LONERGAN 1994, PARRISH et al. 1994).

Diese Prozesse *in vitro* nachzuvollziehen, um so letztlich auf die Fruchtbarkeit einzelner Bullen rückschließen zu können, ist Gegenstand vieler *In-vitro*-Befruchtungsversuche (LONERGAN 1994).

Die Zeitdauer der Kapazitation der Spermien im weiblichen Geschlechtsapparat variiert unter den Bullen ganz erheblich und scheint genetisch determiniert zu sein (LEIBFRIED–RUTLEDGE et al. 1989, LONERGAN 1994). Auch die Eizellenpenetrationsrate *in vitro* weist auf große Unterschiede unter den männlichen Probanden hin.

So wiesen DAVIS et al. (1987 a, b) in ihren Versuchen nach, daß Bullen von hoher Fruchtbarkeit auch *in vitro* an zonalosen Hamstereizellen die höchsten Penetrationsraten erreichten.

Einen solch direkten Zusammenhang zwischen einem *In-vitro*-Spermienpenetrationstest und der im Besamungseinsatz ermittelten NRR konnte LINNENBRINK (1990) nicht nachweisen, seine Versuche ergaben keine signifikante Korrelation. Auch SHAMSUDDIN et al. (1993) zeigten in ihren Versuchen, daß die NRR und die in *In-vitro-Fertilisationversuchen* (IVF) ermittelte Fruchtbarkeit eines Bullen sehr unterschiedlich sein kann.

Diese Tatsache führen Autoren wie SHAMSUDDIN et al. (1993) und LONERGAN (1994) darauf zurück, daß die NRR nicht nur die Befruchtung als solche, sondern auch die frühembryonale Entwicklung und hier besonders die Embryonenmortalität beinhaltet. Auch maternale Einflüsse wie Frühaborte durch Infektionen etc. spiegeln sich letztlich in der NRR wieder.

Bullen, die die gleiche Befruchtungsrate im Zweizellstadium aufweisen, unterscheiden sich ganz erheblich voneinander, wenn man später die Anzahl entwickelter Blastozysten ermittelt (LONERGAN 1994).

„*High fertility bulls*“ weisen im IVF-Versuch eine größere Anzahl entwickelter Blastozysten auf als „*low fertility bulls*“. Die Degenerationsrate ist bei diesen Bullen niedriger als bei Bullen mit einer geringeren Fruchtbarkeit und die Blastozysten der Bullen hoher Fruchtbarkeit haben ein größeres Entwicklungspotential. Dieses Phänomen spiegelt sich in der höheren NRR wieder. MARQUANT LE GUIENNE et al. (1992) sehen deshalb auch eher einen Zusammenhang zwischen der NRR (Tag 60-90) und der Anzahl entwickelter Blastozysten.

Der paternale Einfluß über die eigentliche Befruchtung hinaus auf die frühembryonale Entwicklung darf nicht unterschätzt werden (COUROT et al. 1986, HILLERY et al. 1990, SHAMSUDDIN et al. 1993). Er erstreckt sich über die Entwicklung des Embryos durch die Gravidität bis hin zum lebenden Nachkommen (COUROT et al. 1986). Wo genau die Ursachen für diese Einflüsse durch das Vatertier liegen, ist bis heute nicht endgültig geklärt. Sie sind aber sehr wahrscheinlich im Bereich minimaler genetischer Abweichungen zu suchen (COUROT et al. 1986).

In den letzten Jahren sind auf dem Gebiet der Ursachenforschung für die erheblichen Unterschiede in der Fruchtbarkeit innerhalb einer Gruppe männlicher Individuen wichtige Erkenntnisse veröffentlicht worden. Hierauf wird im folgenden eingegangen (Kapitel 2.2.1 und 2.2.2).

### 2.2.1 KOMPENSIERBARE UND NICHT KOMPENSIERBARE SEMINALFAKTOREN

Grundsätzlich muß zwischen der Bedeutung der Spermienqualität im weiblichen Geschlechtstrakt vor der Eizellenpenetration und des paternalen Einflusses nach dem Eindringen des befruchtenden Spermiums in die Eizelle unterschieden werden. DEN DAAS (1992) prägte in diesem Zusammenhang die Begriffe *extrinsic sperm quality* auf der einen und *intrinsic sperm quality* auf der anderen Seite.

Zu ersterer zählt die Autorin Faktoren wie Spermienmotilität, Membranintegrität, Akrosomintegrität und das Bindungsvermögen der Spermien an die *Zona pellucida*. Hier bestehen große Unterschiede zwischen den männlichen Probanden.

Zu der *intrinsic sperm quality* hingegen zählt DEN DAAS (1992) die Qualität des einen befruchtenden Spermiums, und hier vor allem seinen Einfluß auf die Entwicklungsfähigkeit des entstehenden Embryos. Zu diesen Faktoren gehören die Qualität, der Anteil einsträngiger Desoxyribonucleinsäure (DNA) sowie deren Kondensationszustand in den männlichen Erbanlagen (BALLACHEY et al.1988). Über diese Aspekte ist bislang wenig bekannt. Fest steht jedoch, daß sie unter den Bullen erheblich variieren.

SAACKE et al. (1998) unterscheiden in Anlehnung an DEN DAAS (1992) zwischen kompensierbaren und nicht kompensierbaren Seminalfaktoren, wobei erstens *extrinsic* mit *kompensierbar* und zweitens *intrinsic* mit *nicht kompensierbar* gleichzusetzen ist.

### 2.2.2 KOMPENSIERBARE SEMINALFAKTOREN

DEN DAAS (1992) und SAACKE et al.(1998) gehen davon aus, daß die zu den *extrinsic* Faktoren gehörenden Parameter bis zu einem gewissen Grad durch eine Erhöhung der Spermiodosis pro Besamungsportion kompensiert werden können.

Durch eine Steigerung der Dosis erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, daß mehr befruchtungskompetente Spermien die Selektionsbarrieren im weiblichen Geschlechtstrakt überwinden und zur Befruchtung zur Verfügung stehen (SAACKE et al. 1998).

Von Bedeutung ist nicht nur das befruchtende Spermium, sondern auch die Anzahl der akzessorischen Spermien. Zu den ersten Autoren, die über die Bedeutung dieser Spermien für die Fruchtbarkeit berichteten, zählten WILMUT und HUNTER (1984).

Es handelt sich hierbei um die Spermien, die zu dem Zeitpunkt, an dem die Zonareaktion stattfindet, um eine polysperme Befruchtung zu verhindern, bereits an die *Zona pellucida* gebunden haben (DE JARNETTE et al. 1992, NADIR et al. 1993, SAACKE et al. 1998, HUNTER et al. 1998).

Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der akzessorischen Spermien, der Fruchtbarkeit und der Embryonenqualität. NADIR et al. (1993) gelang es in ihrer Versuchsreihe, die Anzahl akzessorischer Spermien durch eine Dosiserhöhung der Besamungsportion zu steigern. NADIR et al. (1993) vermuteten außerdem einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der akzessorischer Spermien und dem Bullen selbst. In ihren Versuchen wiesen einige Bullen dosisunabhängig eine höhere Anzahl dieser Spermien auf.

Auch DE JARNETTE et al. (1992) vermuteten einen Zusammenhang, konnten ihn jedoch nicht beweisen.

Die Befruchtungsrate ist durch eine Erhöhung der Spermienkonzentration nur bis zu einem gewissen Grad zu steigern, denn ab einer bestimmten Anzahl Spermien nimmt die Kurve einen asymptotischen Verlauf und eine weitere Steigerung ist nicht möglich (DEN DAAS 1992, 1998).

In dieser maximalen Fruchtbarkeitsrate unterscheiden sich die Bullen einer Testreihe ganz erheblich. Bullen hoher Fruchtbarkeit liegen in der maximalen Konzeptionsrate deutlich höher als Bullen mit einer geringeren Fertilität (DEN DAAS 1992).

### 2.2.3 NICHT KOMPENSIERBARE SEMINALFAKTOREN

Über die nicht kompensierbaren Seminalfaktoren ist bis heute wenig bekannt. Sie sind durch Manipulationen, wie z.B. eine Dosiserhöhung der Besamungsportion, nicht auszugleichen. Sie sollen erst nach der Penetration der Eizelle zum Tragen kommen und betreffen nur die Qualität des einen, die Eizelle befruchtenden Spermiums. Die Auswirkungen dieser Qualitätsunterschiede sind weitreichend, gehen über die Befruchtung der Eizelle hinaus und beeinflussen die embryonale Entwicklung entscheidend (HILLERY- WEINHOLD 1991, EID et al.1994).

So zeichnen sich die im ET eingesetzten Bullen hoher Fruchtbarkeit sowohl durch eine höhere Embryonengewinnungsrate als auch durch eine höhere Embryonenqualität aus (SAACKE et al. 1998).

Untersuchungen auf molekularer Ebene, die in den letzten Jahren an Ejakulaten von Bullen unterschiedlicher Fruchtbarkeit vorgenommen wurden, lieferten wichtige Erkenntnisse.

Die Erkenntnisse wurden größtenteils unter *in vitro* Bedingungen gewonnen, *in vivo* liegen kaum Ergebnisse vor. So wird nachfolgend im wesentlichen auf *In- vitro* -Bedingungen eingegangen.

HENAULT und KILLIAN (1995) führten einen Versuch mit Seminalplasma, Spermien und zonafreien Rinderoocyten durch. Sie stellten dabei fest, daß aus dem Nebenhoden entnommene Spermien von subfertilen Bullen durch hinzugefügtes Seminalplasma von hochfertilen Bullen in ihrer Befruchtungsfähigkeit, gemessen im Eizellenpenetrationstest, gesteigert wurden. An ejakulierten Spermien vom gleichen Tier gelang dieses nicht.

Aus diesen Beobachtungen folgerten die Autoren, daß im Seminalplasma Komponenten enthalten sind, die sich zum Zeitpunkt der Ejakulation eng mit den Spermien verbinden und die Fertilität entscheidend beeinflussen.

Es sollte sich dabei wahrscheinlich um Plasmaproteine handeln, die v.a. aus den Samenblasendrüsen stammen.

Dieser Effekt wurde in einem ähnlichen Versuch bei Ratten nachgewiesen (CURRY und ATHERTON 1990).

In anderen Versuchsreihen wurde das Seminalplasma fertiler und subfertiler Männer (BOUE und SULLIVAN 1996) und Bullen auf das Plasmaproteinmuster hin untersucht (SADOWSKI und ROGERS 1985, KILLIAN et al. 1993). Die Autoren stellten dabei fest, daß die Plasmaproteinmuster dieser Gruppen unterschiedlich sind. Bei subfertilen Männern bzw. Bullen fehlten bestimmte Proteine oder waren in erheblich niedrigerer Konzentration als bei vergleichsweise fertilen Probanden vorhanden.

Es ist also wahrscheinlich, daß es Komponenten im Seminalplasma gibt, die die Fruchtbarkeit zum Zeitpunkt der Ejakulation determinieren.

BELLIN et al. (1998) identifizierten zwei *Fertilitätsproteine* im Seminalplasma. Sie verbinden sich zum Zeitpunkt der Ejakulation mit den Spermien.

Das größere der beiden Peptide mit einem Molekulargewicht von 31 Kilodalton (kDA) erhielt den Namen *fertility-associated antigen (FAA)*, (BELLIN et al. 1994,1996,1998; McCAULEY et al. 1999).

Bullen, auf deren ejakulierten Spermien dieses *FAA* festgestellt werden konnte, wiesen in einem fünfjährigen Feldversuch eine um 19% höhere Fruchtbarkeit auf als jene, auf deren Spermien *FAA* nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Autoren sehen darin eine Chance, gezielt für den Embryotransfer Bullen hoher Fertilität selektieren zu können, denn die Anwesenheit von *FAA* scheint eindeutig positiv mit der Fertilität korreliert zu sein.

Ein kommerzieller Test, der *FAA* auf Spermien nachweist, steht der Praxis bereits zur Verfügung.

Zwei weitere *heparinbindende Proteine (HBP)* auf der Spermienoberfläche sind zwei Proteine mit einem Gewicht von 21,5 bzw. 24 Kilodalton. Sie sind dem *FAA* ähnlich und ebenfalls positiv mit der Fruchtbarkeit korreliert (McCAULEY et al. 1999).

Ein auf ejakulierten Spermien anzutreffendes Membranprotein wurde von PARENT et al. (1999) identifiziert: *P25b* ist ein Oberflächenprotein. Seine Konzentration ist bei subfertilen Bullen deutlich vermindert, während es bei hochfertilen Tieren in hoher Konzentration auf der Spermienoberfläche lokalisiert ist. Möglicherweise kann es in Zukunft als ein Fruchtbarkeitsmarker bei Bullen verwendet werden.

CANCEL et al. (1997) und GERENA et al. (1998) wiesen in ihren Studien zwei Peptide nach, deren Konzentration mit den Non-Return-Raten der

untersuchten Bullen positiv korrelierte. Es handelt sich dabei um *Osteopontin* und um eine *Prostaglandin-D-Synthase* des *Lipocalintyps*. Die *Prostaglandin-D-Synthase* war bereits auf Nebenhodenspermien nachzuweisen.

Die Bedeutung dieser Fertilitätsfaktoren auf den Spermien selbst oder aber im Seminalplasma ist erst in den letzten Jahren erkannt worden und ihre genaue Erforschung steckt erst in den Anfängen.

Außer Frage steht jedoch, daß sie die Fertilität eines männlichen Tiers entscheidend beeinflussen. Identifizierte fertilitätsassoziierte Proteine im Bullenejakulat sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1: Fruchtbarkeitsassoziierte Proteine im Bullenejakulat**

AUTOR	PROTEIN / MG IN KDA	HERKUNFT	KORRELATION MIT FRUCHTBARKEIT
KILLIAN et al. 1993	Proteine mit Molekulargewichten von <b>26 kDA</b> <b>55 kDA</b> <b>16 kDA</b>	Seminalplasma	+ + -
BELLIN et al. 1994, 1996, 1998	<b>FAA</b> (Fertility-associated-Antigen), 31 kDA	Seminalplasma	+
CANCEL et al. 1997	<b>Osteopontin</b> , 55 kDA	Seminalplasma	+
GERENA et. al. 1998	<b>Prostaglandin-D-Synthase</b> vom Lipocalintyp	Spermiumoberfläche	+
McCAULEY et al. 1999	<b>FAA</b> , 31 kDA <b>HBP</b> , 24 kDA <b>HBP</b> , 21,5 kDA	Seminalplasma Seminalplasma Seminalplasma	+ + +
PARENT et al. 1999	<b>Pb25</b> ; 25 kDA	Seminalplasma	+

MG: Molekulargewicht; kDA: Kilodalton

### 2.3 DIE EMBRYONENQUALITÄTSBEURTEILUNG

Die Embryonengewinnung erfolgt beim Rind vorzugsweise zwischen dem 6. und 8.Tag nach der ersten Besamung transzervikal. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich der Embryo in der Uterushornspitze und ist mit dem Medium leicht ausschwemmbar.

Die Embryonen befinden sich bei zeitgemäßer Entwicklung im Stadium der Morula oder Blastozyste, sind in diesem Stadium recht stabil und gut geeignet für die direkte Übertragung oder weitere Manipulation (LINDNER und WRIGHT 1983, KUZAN 1990).

Nach ihrer Gewinnung werden die Embryonen auf ihre morphologische Qualität hin untersucht und selektiert.

Dieses ist insofern von entscheidender Bedeutung, als daß nur solche Embryonen zum Transfer geeignet sind, die ein ihrem Alter entsprechendes Entwicklungsstadium aufweisen und deren morphologische Struktur eine Weiterentwicklung zum gesunden Kalb erwarten läßt. Die genaue Qualitätsbeurteilung ist folglich von großer wirtschaftlicher Bedeutung für gute Transferergebnisse im kommerziellen Embryotransfer (SCHNEIDER et al. 1980, SHEA 1981, HAHN et al. 1983, LINDNER und WRIGHT 1983, KUZAN 1990). Zwischen Tag fünf und sieben werden Embryonen gewonnen, die sich im Entwicklungsstadium der Morula, kompakten Morula oder Blastozyste befinden (KUZAN 1990).

Der bovine Embryo weist am Tag acht eine Größe von rund 160 µm auf.

Nach dem 8. Tag schlüpft die Blastozyste aus der sie umgebenden *Zona pellucida* aus und beginnt zu wachsen.

Da zwischen dem 8. und 10.Tag die *Zona pellucida* als schützende Hülle verloren geht, besteht bei Embryonen, die nach dem Tag acht gewonnen werden, ein größeres Risiko, beschädigt zu werden (KUZAN, 1990).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Embryonen qualitativ zu beurteilen:

#### 2.3.1 MORPHOLOGISCHE BEURTEILUNG

Die morphologische Beurteilung der Embryonen stellt die gebräuchlichste Form der Klassifizierung der Embryonen in Qualitätsstufen dar. Die Embryonen werden mikroskopisch bei einer 10 - 40 fachen Vergrößerung (KUZAN 1990) untersucht. Anhand von Form, Farbe, Anzahl und Kompaktheit der Zellen, Größe des perivitellinen Raumes, Intaktheit der *Zona pellucida*, Anzahl degenerierter und aus dem Verband ausgeschlossener Zellen und dem Vorhandensein von Vesikeln werden die Embryonen beurteilt (LINDNER und WRIGHT 1983, NIEMANN 1986, BOLTON et al.1989, KUZAN 1990). Auch der zu diesem Zeitpunkt erwartete Entwicklungsstand ist von Bedeutung ( KUZAN 1990).

Je nach Gewinnungstag (Tag 0 = Östrusbeginn) sind nach LINDNER und WRIGHT (1983) bei Rinderembryonen die in Tabelle 2 verzeichneten Entwicklungsstadien zu erwarten:

**Tabelle 2: Entwicklungsstadium der Rinderembryonen nach LINDNER u. WRIGHT (1983)**

Tag	Entwicklungsstand
5	Morula
6	Kompakte Morula
7	Frühe Blastozyste
7,5	Blastozyste
8	Expandierte Blastozyste
9	Geschlüpfte Blastozyste

Die Einteilung der Embryonen in Qualitätsklassen wird im internationalen Schrifttum unterschiedlich gehandhabt. BOLAND et al. (1978), SHEA (1981), WRIGHT (1981) und NIEMANN (1986) teilen Rinderembryonen in drei Klassen ein. Die Einteilung in vier Qualitätsstufen ist ebenfalls gebräuchlich (ELDSEN et al. 1978, SCHNEIDER et al. 1981, LINDNER und WRIGHT 1983). Auch fünf (KENNEDY et al. 1983, BOLTON et al. 1989) oder sechs Klassen (KUZAN 1990) sind möglich.

Die erste Klasse umfaßt jedoch einheitlich jene an Tag sieben gewonnenen Embryonen, die ein zeitgemäßes Entwicklungsstadium ohne morphologische Abweichungen aufweisen (runde, sphärische Blastomeren ohne Vesikel und Zellfragmente sowie eine intakte *Zona pellucida*).

Mehr als zwei Tage in der Entwicklung zurückgebliebene Embryonen und Embryonen mit massiven Schäden, wie z.B. starker Fragmentation und Vesikelbildung, werden der schlechtesten Klasse zugeordnet. Gleiches gilt für eine massive Schädigung der *Zona pellucida*. Alle anderen Qualitäten an Embryonen verteilen sich über die übrigen Klasse(n) (LINDNER und WRIGHT 1983, KENNEDY et al. 1983, NIEMANN 1986, BOLTON 1989, KUZAN 1990). Eine weitere Klasse stellen die unbefruchteten Oozyten dar.

So ergibt sich zum Beispiel nach KUZAN (1990) die Einteilung in die sechs Qualitätsstufen: exzellent, gut, mittelmäßig, schlecht, degeneriert und unbefruchtet.

Bis heute gibt es kein allgemein gültiges Klassifizierungssystem für Rinderembryonen.

Mit der ADR – Empfehlung Nr.7.1 (Bonn, 10.4.1991) ist ein Versuch unternommen worden, diese Grundlage für am Tag 7 gewonnene Eizellen / Rinderembryonen zu schaffen.

Als Tag 0 wird der Tag der ersten Besamung gerechnet.

Die Klassifizierung erfolgt in sechs Qualitätsstufen, von Klasse eins (sehr gut) bis Klasse vier (schlecht), eigene Klassen stellen unbefruchtete Oozyten und degenerierte Embryonen.

Diese Einteilung entspricht im wesentlichen der von der International Embryo Transfer Society (IETS) verwendeten Klassifizierung der Embryonen (ROBERTSON u. NELSON 1998).

Die Eignung der Embryonen für den direkten Transfer bzw. weiterführende Manipulationen wird nach der IETS (1998) in einem Schlüssel festgelegt, wobei die mit Kategorie 1 bezeichneten Embryonen am besten gefrier-tauglich sind. Die in die Kategorie 2 eingestuften Embryonen können nur mit geringerem Erfolg eingefroren werden, sind aber tauglich für den Direkttransfer. Die Embryonen der dritten Kategorie liefern nur schlechte Trächtigkeitsraten und die der letzten Kategorie sind untauglich.

### 2.3.2 ANDERE MÖGLICHKEITEN DER BEURTEILUNG

Eine andere Möglichkeit der Beurteilung stellt die Anfärbung der Embryonen mit sogenannten Vitalfarbstoffen dar. Durch die Anfärbung mit FDA (3´6´-Fluorescein-Diacetyl) oder DAPI (4´6´-Diamidino-2-Phenylindol) können auch mikroskopisch nicht einfach feststellbare Schädigungen nachgewiesen werden. FDA färbt das Plasma lebender Zellen grünlich, DAPI die Kerne degenerierter Zellen gelblich an. So wird eine Aussage über die Vitalität der Embryonen möglich (SCHILLING und SMIDT 1979, NIEMANN 1980).

Ein weiterer Test auf die Lebensfähigkeit gewonnener Embryonen stellt die Prüfung ihrer Stoffwechselaktivität in einem glukosehaltigen Kulturmedium dar. Anhand der Glukoseaufnahme wird die Stoffwechselaktivität der Embryonen ermittelt, wobei eine hohe Glukoseaufnahme der Embryonen mit guten Trächtigkeitsraten positiv korreliert ist (RENARD et al. 1980).

Auch die *in vitro* Kultivierung der Embryonen stellt eine Möglichkeit der Feststellung auf ihre Lebensfähigkeit dar (LINDNER und WRIGHT 1983, NIEMANN 1986).

## **2.4 EINFLÜSSE AUF EMBRYONENQUALITÄT UND EMBRYONENGEWINNUNGSRATE**

Im Embryotransfer (ET) haben die Embryonenqualität und die Anzahl gewonnener Embryonen eine zentrale Bedeutung. Sie sind ein Maßstab für die Wirtschaftlichkeit solcher Programme.

Unter guten Bedingungen gehen Autoren wie SEIDEL et al. (1989) von 4 - 8 Embryonen pro Spülung aus.

CAMP (1989) und HAHN (1989) beobachteten im Durchschnitt 1,8 Kälber pro Spülung und Spender. Nur in Spitzenbetrieben wurden 3 und mehr Kälber pro Tier und Spülung erreicht.

Um erfolgreich zu sein, ist es notwendig, die Faktoren, die diese Variablen beeinflussen, zu kennen und entsprechend zu beachten. Die Erforschung dieser Einflüsse ist in den letzten Jahren intensiv betrieben worden und so existieren heute eine große Anzahl von Veröffentlichungen, die sich mit dieser Thematik befassen.

Die Embryonenqualität und die Anzahl gewonnener Embryonen hängen von vielen Faktoren ab. Diese können ihrem Ursprung nach in maternale, paternale und solche Faktoren gegliedert werden, die die Umwelt der Spendertiere ausmachen.

### **2.4.1 MATERNALE EINFLÜSSE**

Die sorgfältige Auswahl der Spendertiere, die einer Superovulationsbehandlung unterzogen werden, ist von ganz entscheidender Bedeutung für gute Embryonenqualität und zufriedenstellende Embryonengewinnungszahlen. Denn trotz standardisierter Behandlungsmethoden zeigen die Spendertiere ganz erhebliche, individuelle Reaktionen. Dieses äußert sich in einer hohen Variabilität der Ovarreaktionen, häufig unbefriedigenden Befruchtungsergebnissen und einer hohen Rate an degenerierten Embryonen (NIEMANN 1991, NIEMANN und MEINECKE 1993). So ist die Superovulation noch immer ein limitierender Faktor im Embryotransfer.

#### **2.4.1.1 GENETIK**

Die Eignung für den Einsatz im Embryotransfer ist auch im Bereich der genetischen Anlagen des Individuums zu suchen.

BETTERIDGE (1977), HAHN (1989) und SEIDEL et al. (1978, 1989) gehen von einer mitvererbten, genetischen Komponente zur Eignung der Tiere für ET-Programme aus.

HAHN (1990) und PREISINGER (1992) heben die Bedeutung der gezielten Selektion auf Fruchtbarkeit und Gesundheit durch den Züchter hervor.

Denn auch innerhalb einer Herde, in der die Tiere den gleichen Umweltbedingungen ausgesetzt sind, zeichnet sich deren Fruchtbar-

keitsleistung und Ansprechbarkeit auf eine Superovulationsbehandlung durch eine sehr hohe Variabilität der Ovarreaktion aus ( NIEMANN und MEINECKE 1993, McMILLAN und DONNISON 1999).

Damit übereinstimmend beobachteten MONNIAUX et al. (1983) und MOOR et al. (1984) erhebliche individuelle Unterschiede in dem Verhältnis von funktionstüchtigen zu atresierten Follikeln und schrieben diese genetisch fixierten, intraovariellen Kontrollmechanismen zu. Es gibt Tiere, die auf die Superovulationsbehandlung wiederholt mit einer abnormalen Follikel- bzw. Eizellreifung reagieren. Diese Tiere liefern Eizellen und Embryonen schlechter Qualität, deshalb sollte eine strenge Vorselektion der Spendertiere erfolgen (CALLESEN et al. 1986).

Auch LINDNER und WRIGHT (1983) gehen bei der großen Variabilität in der Embryonenqualität innerhalb einer Gruppe von Spendertieren von einer genetischen Mitverantwortlichkeit aus.

Durch gezielte Selektion der Tiere läßt sich der Erfolg von ET-Programmen deutlich steigern (KING et al. 1985, BROADBENT et al. 1991).

#### 2.4.1.2 RASSE

Es gibt deutliche Rassenunterschiede hinsichtlich des Erfolgs einer Superovulationsbehandlung.

Rassen differieren in ihrer Ansprechbarkeit auf Pregnant Mare's Serumgonadotropin (PMSG). So fand BETTERIDGE (1977) heraus, daß Holstein Friesian schlechter auf PMSG reagierten als Charolais oder Kreuzungen aus Hereford x Angus. Hereford wiederum sprachen besser auf die Superovulationsinduktion an als Tiere der Rasse Angus.

HAUPT (1979) stellte beim Vergleich der Rassen Deutsche Rotbunte, Deutsche Schwarzbunte und Holstein-Friesian für letztere ebenfalls die schlechtesten Superovulationsergebnisse nach PMSG-Behandlung fest.

Auch andere Autoren beobachteten bei Holstein Friesian im Rassenvergleich die niedrigste Ansprechbarkeit der Ovarien auf PMSG (SAUMANDE et al. 1978, SCHILLING 1982). BREUEL et al. (1991) ermittelten in einer vergleichenden Studie für Simmentaler Kühe höhere Prozentzahlen transfertauglicher Embryonen als für Tiere der Rassen Angus, Charolais oder Hereford.

Generell liefern fleischbetonte Rassen bessere Ergebnisse als Tiere einer milchbetonten Rasse, bei ersteren lagen die Ovulationsraten deutlich höher (SAUMANDE et al. 1978, SCHILLING 1982, LAURIA 1983, DONALDSON 1984).

Bei kleinen Wiederkäuern stellten VIVANCO et al. (1994) fest, daß es deutliche, rassespezifische Unterschiede in dem Prozentsatz von Embryonen guter Qualität pro Spülung gibt. KING et al. (1995) stellten mittels Chromosomenanalysen bei Rinderembryonen fest, daß Embryonen der Rasse

Holstein-Friesian mehr Erbgutschäden aufwiesen als Embryonen anderer Rassen.

#### 2.4.1.3 ALTER

Ein anderer Aspekt, der bei der Auswahl der Tiere für den ET bedacht werden muß, ist deren Alter. Das Alter beeinflusst auf der einen Seite die Embryonengewinnung als solche, auf der anderen Seite auch die Ansprechbarkeit der Ovarien auf die hormonelle Superovulationsinduktion.

Präpubertäre Rinder sind zwar nach BETTERIDGE (1977) mit PMSG zu superovulieren, jedoch ist die Gewinnungsrate sehr gering.

DU MESNIL DU BUISSON et al. (1977) stellten außerdem fest, daß der Prozentsatz bei der *In-vitro* - Entwicklung zur Blastozyste bei Embryonen aus präpubertären Spendertieren im Gegensatz zu adulten Tieren sehr viel niedriger lag. Die Entwicklungskapazität der aus präpubertären Tieren gewonnenen Embryonen war auch in der Studie von SALAMONE et al. (1998) deutlich schlechter als bei Embryonen adulter Tieren.

Färßen sind nach SCHILLING (1982) zum Einsatz in ET-Programmen durchaus geeignet, da sie in der Regel höhere Ovulationsraten als ältere Kühe aufweisen.

Mit höherem Alter sinkt die Fruchtbarkeit bei Säugetierspezies wieder. Zwar ist es so, daß im Nutztierbereich nur wenige Tiere ein entsprechend hohes Alter erreichen, jedoch ist es bei wertvollen Tieren durchaus sinnvoll, sie lange im Embryotransfer zu nutzen (LERNER et al. 1986).

LERNER et al. (1986) untersuchten deshalb den Einfluß des Alters des Spendertieres auf Embryonengewinnungsrate und Embryonenqualität.

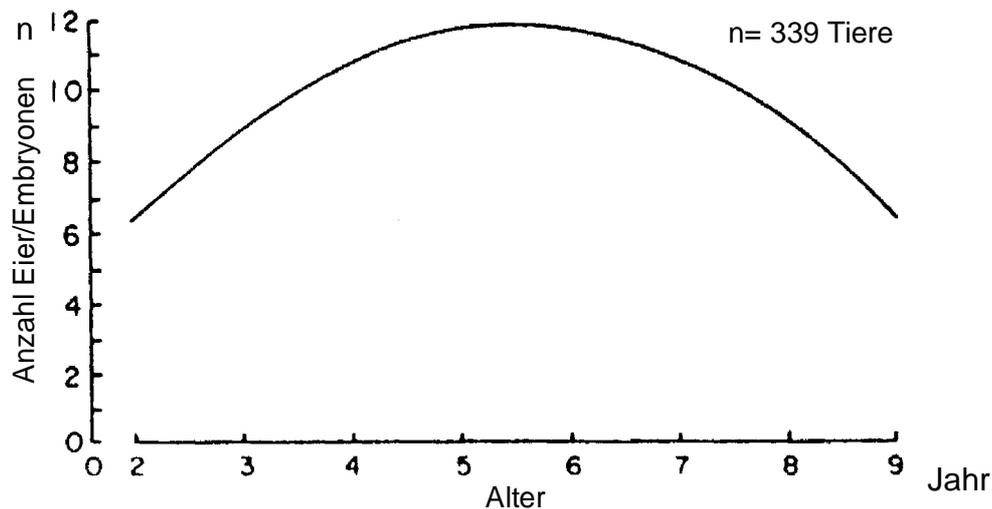
Tiere in einem Alter von 1,8 – 17,8 Jahren wurden in drei Altersgruppen eingeteilt. Die Autoren stellten in ihrer Studie fest, daß die Embryonenqualität, gemessen an der Zahl übertragbarer Embryonen, nicht von dem Alter des Tieres beeinflusst wurde. Auch die eingesetzte FSH-Dosis hatte keinen Einfluß auf die Qualität. Es stellte sich jedoch heraus, daß die Gesamtzahl gewonnener Eizellen / Embryonen vom Alter des Tieres, von der verabreichten FSH- Dosis zur Superovulationsinduktion und der Interaktion dieser beiden Komponenten abhängt.

Zunächst stieg die Embryonengewinnungszahl bei den Tieren in den Versuchsgruppen mit zunehmendem Alter an, erreichte ein Maximum bei einem Alter von 5,6 Jahren und sank dann kontinuierlich ab. Das spiegelt sich in Abbildung 1 deutlich wieder.

Mit zunehmendem Alter der Tiere nahm die Embryonengewinnungsrate deutlich ab - es sei denn, daß die verabreichte FSH-Dosis gesteigert wurde.

In niedriger Dosierung von FSH jedoch nahm die Anzahl gewonnener Embryonen in den Altersgruppen >10 und älter 10 Jahre deutlich ab. Einen

ähnlichen Effekt hatte eine Steigerung der FSH-Dosis bei den jüngeren Tieren – in diesen Fällen führte sie zu verringerten Gewinnungsraten.



**Abbildung 1: Embryonengewinnungszahl in Abhängigkeit vom Alter der Donorkuh**

Modifiziert nach LERNER et al. (1986)

Die Ursache für die verminderte Spülrate sahen LERNER et al. (1986) darin, daß ältere Kühe auf Grund einer reduzierten Anzahl reaktionsfähiger Follikel nur noch in vermindertem Maße auf die Superovulation ansprechen. Eine Steigerung der FSH-Dosis bewirkt vermutlich eine Stimulierung und Rekrutierung möglicher „Reservefollikel“.

Bei jüngeren Tieren jedoch scheint eine gesteigerte FSH-Dosis zu einer mit negativer Auswirkung behafteten Überstimulierung der Ovarien zu führen.

Auch SCHILLING (1982) stellte fest, daß bei jungen Tieren mit steigender FSH-Dosis eine Verschlechterung der Embryonenqualität zu beobachten ist.

Aus den Angaben in der Literatur geht hervor, daß das Alter der Spendertiere für die Embryonengewinnungsrate, nicht aber für die Embryonenqualität eine entscheidende Rolle spielen soll.

#### 2.4.1.4 GESUNDHEITZUSTAND

Der Gesundheitszustand der Tiere ist ebenfalls von großer Relevanz für den Erfolg der ET-Programme. Nur gesunde, fruchtbare Spendertiere garantieren im Embryotransfer dauerhaft gute Leistungen (SCHILLING 1982, HAHN 1990).

Jede Form von Krankheit, klinisch apparent oder inapparent, akut oder chronisch, mindert die Leistung der Tiere. Sie reagieren schlechter auf die

hormonelle Behandlung und die Erfolgsraten werden entsprechend geringer sein (HASLER et al. 1981, HAHN 1989, SEIDEL et al. 1989).

Einen sehr hohen Stellenwert nehmen neben akuten Erkrankungen vor allem inapparente, nicht erkannte Krankheiten wie Endometritiden und Ovarveränderungen ein (HAHN 1990).

Bei letzteren sind es vor allem azyklische und zystische Ovarien (HAHN et al. 1977, HASLER et al. 1983, AHMAD et al. 1996). Auch Manipulationen bei vorangegangenen Spülungen können unerkannte Schäden am Uterus zur Folge gehabt haben (SEIDEL et al. 1978).

Akute Endometritiden führen nach der Erfahrung von HAHN (1990) zu einer deutlich herabgesetzten Embryonenqualität.

#### *2.4.1.5 LETZTE GRAVIDITÄT UND LAKTATIONSTADIUM*

Ein weiterer wichtiger Faktor, der den Erfolg einer Superovulationsbehandlung beeinflusst, ist der Verlauf der letzten Gravidität, vor allem der Geburt und des Puerperiums.

Der Einfluß des Laktationsstadiums der Spenderkuh ist noch nicht endgültig geklärt.

SCHILLING et al. (1982) beobachteten bei laktierenden Kühen einen höheren Prozentsatz transfertauglicher Embryonen als bei trockenstehenden Tieren.

Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von DARROW et al. (1982) und HASLER et al. (1983), die bei trockenstehenden Kühen im Vergleich mehr degenerierte Embryonen auffanden.

CAMP (1989) konnte in seiner Arbeit keinen statistisch signifikanten Einfluß der Milchleistung auf die Embryonengewinnungsrate oder die Embryonenqualität nachweisen. Im Gegensatz dazu ermittelte WICHMANN (1990) bei Hochleistungstieren (>10.000 kg Milch) schlechtere Ergebnisse als bei Vergleichsgruppen mit einer geringeren Leistung. Sie führte dieses auf eine energetische Mangelversorgung der Tiere zurück.

Das Laktationsstadium des Spendertieres kann nach BETTERIDGE (1978) insofern von Bedeutung sein, als daß in der Zeit sehr hoher Milchleistung die Reaktion der Ovarien auf eine Hormonbehandlung vermindert sein kann. Bei einigen Tieren kann kurz nach der Abkalbung die ovarielle Aktivität stark vermindert sein. Dies hängt allem Anschein nach mit einer unzureichenden Sekretion des Luteinisierenden Hormons (LH) gepaart mit einer stark negativen Energiebilanz der Tiere zusammen. Hierbei scheint es sich um ein Adaptationsproblem der betroffenen Tiere an diese Phase der Laktation zu handeln – was wiederum einen genetischen Zusammenhang haben könnte (LUCY et al. 1991).

LUCY et al. (1992 a) beobachteten in ihren Untersuchungen, daß laktierende Kühe eine geringere Anzahl Follikel während der ersten Follikelwelle anbildeten als trockenstehende Kühe. Eine endgültige Klärung steht aus.

Die Bedeutung des Verlaufs der letzten Gravidität für den Erfolg der Superovulation wird in der Literatur ebenfalls diskutiert.

Generell liefern die Tiere die besten Ergebnisse, die nach niedrigem KB-Index und kurzer Zwischenkalbezeit eine unproblematische Gravidität und Geburt hatten und nach einem ungestörten Puerperium spätestens vier Wochen post partum (p.p.) wieder einen regelmäßigen Zyklus mit deutlicher Brunst aufweisen (HAHN et al. 1980, GÖRLACH 1997).

Nach der Geburt eine ausreichende Rastzeit zu gewähren, wird widersprüchlich diskutiert.

SEIDEL et al. (1989) empfehlen eine Rastzeit von 75 Tagen, KWEON et al. (1986) konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen Rastzeit und Erfolg der Superovulationsinduktion nachweisen.

#### 2.4.1.6 ZYKLUSSTADIUM

Einer der allerwichtigsten Einflüsse auf die Embryonengewinnungszahl, aber auch die Qualität der Embryonen, ist das Zyklusstadium der Spenderkuh zu dem Zeitpunkt, an dem mit der hormonellen Behandlung zur Superovulation begonnen wird. Der hormonelle Status der Donorkuh ist für gute Ergebnisse sehr wichtig. Dies wird von Autoren wie LERNER et al. (1986), SEIDEL et al. (1989), HAHN (1990) und ARMSTRONG (1993) deutlich hervorgehoben.

Bereits SCHILLING (1982) wies darauf hin, daß der Progesteronwert bei Beginn der Hormongaben für gute Superovulationsergebnisse entscheidend ist.

Der Beginn der Superovulationsbehandlung sollte idealerweise in der Gelbkörperphase, in der Mitte des Zyklus liegen (SEIDEL et al. 1989, HAHN 1990). DONALDSON (1984) empfiehlt Tag 8-13 des Zyklus.

LERNER et al. (1986) erreichten in ihrer Studie die höchste Embryonengewinnungszahl, wenn die erste FSH-Gabe am Tag 10 oder 11 des Zyklus erfolgte (Tag 0 = Tag des Östrusbeginns). In dieser Studie wurden die Tiere an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit FSH behandelt und am vorletzten Tag der FSH-Gabe zusätzlich mit Prostaglandin  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ), um eine Luteolyse zu induzieren. Dies ist eines der üblichen Behandlungsmuster seitdem bekannt ist, daß hohe Progesteronwerte zum Zeitpunkt der Befruchtung zu schlechten Befruchtungsraten führen und die Anzahl degenerierter Embryonen durch ein ungünstiges Milieu im Eileiter bei hohen Progesteronwerten erhöht ist (HAHN et al. 1977; SCHILLING 1982).

HERRLER (1989) wies in seinen Untersuchungen nach, daß nicht nur die Embryonengewinnungszahl sondern auch die Embryonenqualität bei höheren Progesteronwerten zu Beginn der Superovulationsinduktion verbessert sind. Der Autor geht davon aus, daß hohe Progesteronwerte zum Zeitpunkt des Östrus den LH-Peak stören und auch die endgültige Reifung und Ovulation der Oozyte verhindern können (GUILBAULT et al. 1993).

#### 2.4.1.7 ANZAHL SUPEROVULATIONEN IN DER LAKTATION

Die Anzahl der, der aktuellen Superovulation vorangegangenen Superovulationen, beeinflusst die Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls deren Erfolg (SAUMANDE et al. 1978, SEIDEL et al. 1978, HASLER et al. 1983, WARFIELD et al. 1986).

HASLER et al. (1983) beobachteten bei fünf aufeinanderfolgenden Superovulationen keine Verschlechterung der Ovulationsrate, ließen die Tiere jedoch auch einen „normalen“ Zyklus zwischen jeder Behandlung durchlaufen. CAMP (1989) dagegen berichtete über einen deutlichen Trend zur Verringerung der Embryonengewinnungsrate und der Qualität der Embryonen mit steigender Superovulationsanzahl. Eine mögliche Ursache stellen Immunreaktionen und Antikörperbildung gegen die verabreichten Gonadotropine dar (DONALDSON und PERRY 1983). Auch OIKAWA et al. (1998) stellten verminderte Ergebnisse bei wiederholten Superovulationen fest. Sie beobachteten einen mit der steigenden Anzahl von Behandlungen negativ korrelierenden LH-Peak und sahen darin eine mögliche Ursache der verminderten Embryonenqualität. Im Übrigen hielten sie aber bis zu sechs Superovulationen pro Jahr für praktikabel.

#### 2.4.1.8 DIE BEDEUTUNG DES DOMINANTEN FOLLIKELS FÜR DIE SUPEROVULATION

Der bovine Zyklus ist charakterisiert durch das Auftreten von zwei bis drei Follikelbildungswellen pro Zyklus (SIROIS und FORTUNE 1988, GINTHER et al. 1989, SAVIO et al. 1989, 1990, ASSEY et al. 1994).

Die Follikelwellen beginnen bei drei Wellen pro Zyklus in der Regel am Tag 2, 9 und 16 des Zyklus (SIROIS und FORTUNE 1988, 1990).

Ob zwei oder drei Wellen pro Zyklus auftreten, hängt beim einzelnen Tier vom Zeitpunkt der Luteolyse und dem Beginn der zweiten Welle ab. Tiere mit drei Wellen weisen einen leicht verlängerten Zyklus gegenüber zweiwelligen Zyklen auf, da der dritte dominante Follikel zusätzliche Zeit zur kompletten Entwicklung und Dominanz benötigt (TAYLOR und RAJAMAHANDRON 1991).

Nach GIUBAULT et al. (1991) inhibiert während dieser Wellen der dominante Follikel ab einer Größe von ca. 9 mm das Wachstum der anderen Follikel. Er verhinderte außerdem die Rekrutierung neuer Follikel. Dieses stellten auch andere Autoren wie BADINGA et al. (1992) und BURKE et al. (1998) fest.

Es ist von Bedeutung, zwischen morphologischer und funktioneller Dominanz des Follikels zu unterscheiden.

Als morphologisch dominant bezeichnet man den größten Follikel (>10mm) innerhalb einer Follikelwelle (SIROIS und FORTUNE 1990). Er ist jedoch, wie jüngste Studien ergeben haben, nicht zwangsläufig auch der funktionell dominante Follikel dieser Welle (OTOI et al. 1999).

Funktionell dominant ist der Follikel, der das Wachstum der übrigen Follikel seiner Welle und die Anbildung einer neuen Welle verhindert (LUCY et al. 1992 b). Er hat die Kompetenz, bei geeigneten hormonellen Gegebenheiten zu ovulieren. In der Regel ist der dominante Follikel der dritten Welle der ovulatorische Follikel, die dominanten Follikel der vorangegangenen Wellen sind nicht ovulatorische dominante Follikel (SIROIS und FORTUNE 1990, FORTUNE 1993, 1994).

Der dominante Follikel der ersten Welle bleibt ungefähr bis zur Mitte des Zyklus, also Tag 8-11, aktiv. Er kann nach einer Injektion von PGF $2\alpha$  zur Einleitung der Luteolyse an den Tagen fünf bis acht des Zyklus zur Ovulation gebracht werden (KASTELIC et al. 1990, SAVIO et al. 1990). Das weist darauf hin, daß der hormonelle Status in der Lutealphase des Zyklus (hoher Progesteronwert, niedriger basaler LH-Wert) eine endgültige Ausreifung und die Ovulation des dominanten Follikels nicht zuläßt (CUPP et al. 1990, SIROIS und FORTUNE 1990).

Der nicht ovulatorische, dominante Follikel verliert zunächst seine funktionelle, dann seine morphologische Dominanz und eine neue Follikelwelle kann beginnen (FORTUNE et al. 1991). Dieser Verlust seiner Aktivität und die folgende Atresie liegen bei der ersten Follikelwelle zwischen Tag 7 und 12 des Zyklus (GUILBAULT et al. 1993).

Die An- oder Abwesenheit eines dominanten Follikel zum Zeitpunkt der Superovulation beeinflußt deren Erfolg maßgeblich (PIERSON und GINTHER 1988, GRASSO et al. 1989, HUHTINEN 1992, BARTMANN 1992, BUNGARTZ 1993, BUNGARTZ und NIEMANN 1994, VARISANGA 1998).

Wiesen Tiere zu Beginn der Superovulationsbehandlung einen dominanten Follikel (DF) auf, so fiel die Ovulationsrate geringer aus als bei Kontrolltieren ohne DF (GUILBAULT et al. 1991). Auf Grund seiner Dominanz unterdrückte der DF das Wachstum und die Reifung der untergeordneten Follikel (GRASSO et al. 1989, VARISANGA et al. 1998). Diese Verschlechterung der Ergebnisse war jedoch nur während der funktionellen Dominanz in der Wachstums- und der Plateauphase des DF zu beobachten, die je nach Autor mit drei (BUNGARTZ und NIEMANN 1994) oder vier Tagen (GUILBAULT et al. 1991) angegeben wird. DF in der Regression hatten diesen negativen Einfluß nicht (WILSON et al. 1990, GRAY 1992).

Die Problematik des dominanten Follikels war Gegenstand vieler Untersuchungen in den letzten Jahren. So wiesen BUNGARTZ und NIEMANN (1994) in ihren Untersuchungen an 117 Holstein Friesian Kühen nach, daß Tiere ohne DF zum Zeitpunkt der Superovulation eine doppelt so hohe Gewinnungsrate von Embryonen aufwiesen als Tiere mit DF. Zu einem

ähnlichen Verhältnis kamen auch BARTMANN (1992), HUHTINEN (1992) und ASSUMPCAO et al. (1997).

Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, um den DF vor Beginn der Hormonbehandlung zu entfernen.

Die Ovariectomie des den DF tragenden Ovars bzw. die Elektrokoagulation des DF führte zu verbesserten Ovulationsraten (STAIGMILLER und ENGLAND 1982, KO et al. 1991).

Weniger invasive Methoden stellen unter Ultraschallkontrolle die manuelle Entfernung durch Kompression vom Rektum aus (BARTMANN 1992) und die transvaginale Follikelpunktion dar ( BUNGARTZ 1993, BERGFELDT et al. 1994, BUNGARTZ und NIEMANN 1994, EDE et al. 1999, GRADELA et al. 1999, RUIGH u. MULLAART 1999).

Es besteht außerdem die Möglichkeit, den dominanten Follikel auf medikamentellem Wege zu entfernen. Hier wird, je nach Behandlungsschema, hCG (RAJAMAHENDRAN und CALDER 1993) oder GnRH (KOHRAN et al. 1998) appliziert. Auch eine, aus Östradiol und Progesteron oder aber Östradiol und GnRH kombinierte Hormongabe ist möglich (ADAMS et al. 1994, BO et al. 1991,1995,1998, MITCHELL et al. 1998, MAPLETOFT et al. 1999).

Bei all diesen Methoden geht man davon aus, daß die Entfernung des dominanten Follikels zu einer Verbesserung der Superovulationsraten und/oder einer Verbesserung der Embryonenqualität führt (BARTMANN 1992, BUNGARTZ 1993, ADAMS et al. 1994, BO et al. 1995, EDE 1999, GRADELA et al. 1999, RUIGH und MULLAART 1999) .

Es ist jedoch zu bedenken, daß der morphologisch dominante Follikel nicht zwangsläufig auch der funktionell dominante ist, so daß eine Entfernung des größten Follikels nicht immer zu einer Verbesserung führt (OTOI et al. 1999). Durch die Entfernung des DF steigt nach der Beobachtung von ADAMS et al. (1992, 1993) die Plasmakonzentration von FSH rasch an und führt zwei Tage später zu einer neuen Follikelwelle, die für die Superovulation genutzt werden kann. Ohne den hemmenden Einfluß des DF ist die Ovulationsrate erhöht. Auch eine erhöhte Vitalität der Embryonen ist zu beobachten (EDE 1999, GRADELA et al. 1999, RUIGH und MULLAART 1999). Eine Literaturübersicht über die Superovulationsergebnisse nach der Entfernung des DF ist Tabelle 3 zu entnehmen.

**Tabelle 3: Auswahl von Ergebnissen der Superovulation nach Entfernung des DF**

AUTOR	PRÄPARAT	n	EIZELLEN U. EMBRYONEN	TRANSFERTAUG. EMBRYONEN	BEMERKUNGEN
			$\xi \pm SD$	$\xi \pm SD$	
Bartmann 1992	PMSG oder FSH	13	7,5 ± 8,9	3,6 ± 6,0	Kontrollgruppe
		18	12,3 ± 8,0	9,6 ± 8,3	Manuelle Ent- fernung des DF
Calder et al. 1993	FSH	10	5,0 ± 2,1	3,1 ± 1,4	Kontrollgruppe
		9	8,8 ± 2,3	5,4 ± 1,6	hCG am Tag 7
Bungartz 1993	FSH	11	5,1 ± 1,4	1,0 ± 0,5	Kontrollgruppe
		13	18,7 ± 2,7	10,1 ± 1,5	DF 48 h vor Superovulation punktiert
Lindsey et al. 1994	FSH	144	5,8	2,8	Kontrollgruppe
		144	8,7	5,2	1-3 Tage vor Superovulations- beginn Punktion aller Follikel >6mm
Bo et al. 1995	FSH	18	8,9 ± 1,5	3,9 ± 0,8	Kontrollgruppe
		19	13,2 ± 2,1	6,6 ± 1,8	Progesteron und E2 am Tag 2 des Zyklus
Ede et al. 1999	FSH	556	10,0 ± 0,3	5,8 ± 0,6	Kontrollgruppe
		82	12,3 ± 1,0	6,5 ± 0,2	Punktion DF 48h vor Superovulations- beginn
Ruigh und Mullaart 1999	FSH	64		4,26 ± 3,47	Kontrollgruppe
		55		4,98 ± 4,46	68-72 h vor Superovulations- beginn DF entfernt

n: Anzahl der Probanden,  $\xi$  : Mittelwert, SD: Standardabweichung, DF: Dominanter Follikel

#### 2.4.2 HORMONE ZUR SUPEROVULATIONBEHANDLUNG

Auch die Auswahl der verwendeten Hormone und deren Verabreichungsweise ist eine wichtige Variable (BETTERIDGE 1978).

Unter einer Superovulation wird die Auslösung multipler Ovulationen durch Verabreichung eines exogenen Hormons wie eCG (equines Choriongonadotropin), im weiteren auch als PMSG (Pregant Mare's Serum Gonadotropin) bezeichnet, FSH (Follikelstimulierendes Hormon) oder hMG (Humanes Menopausengonadotropin) verstanden. Ziel ist es, eine größere Anzahl befruchteter Eizellen/Embryonen zu gewinnen (NIEMANN 1991; NIEMANN und MEINECKE 1993).

Es gibt deutliche Unterschiede in der Ovarreaktion bei der Verwendung unterschiedlicher Hormone.

So sind nach MONNIAUX et al. (1983) nach der Gabe von PMSG erfolglose Spülungen häufiger als nach FSH-Behandlungen. Die Embryonengewinnungsraten sind nach der Superovulationsinduktion mit FSH höher als nach PMSG (HAHN 1978, AILMEIDA 1987). Diese Beobachtungen scheinen mit dem LH-Gehalt der verwendeten Gonadotropine zusammenzuhängen. Ein hoher LH-Gehalt, wie er oft in PMSG- Präparaten vorkommt, wird mit einer vorzeitigen Ovulation der Follikel in Zusammenhang gebracht. Dadurch treten vermehrt unbefruchtete Eizellen auf (FOOTE und ELLINGTON 1988, HERRLER et al. 1991).

HERRLER (1989) wies ein früheres Auftreten des LH-Peaks nach der Applikation von pFSH mit hohen LH-Anteilen (80%, 40 Stunden nach Prostaglandin- F2 $\alpha$ - Applikation) als nach der Verwendung eines Präparates mit niedrigem LH-Anteil (20%, 46 Stunden nach Applikation des Präparates) nach.

In einer Untersuchung der Superovulationsergebnisse nach FSH-Präparaten mit unterschiedlichem LH-Gehalt (20%, 40% und 80%) erzielten HERRLER et al. (1991) die besten Ergebnisse mit dem FSH-Präparat mit mittlerem LH-Gehalt.

Folltropin-V®, ein hochgereinigtes FSH-Präparat, weist einen LH-Gehalt von nur 16% auf, was MAPLETOFT et al. (1992) als Grund für nur befriedigende Superovulationsergebnisse ansahen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen SALAMONE et al. (1998).

Das Verhältnis von LH : FSH im verwendeten Hormonpräparat ist folglich für die Erfolgsrate nach einer Superovulation wichtig (SUGANO et al.1999).

Die Dauer und die Höhe des endogenen LH-Peaks sind für die Embryonenqualität wichtig. Das Fehlen oder das zu frühe Auftreten des LH-Peaks ist negativ mit der Embryonenqualität korreliert (HERRLER 1989).

Nach einer Superovulationsbehandlung mit PMSG kommen derartige abnorme LH-Peaks vermehrt vor. Zudem kann PMSG auf Grund der langen

Halbwertszeit (YADAV et al. 1986) stimulierend auf eine, zwischen superovulatorischer Brunst und der Spülung gelegene, zweite Follikelreifungswelle wirken. Die damit verbundenen erhöhten Östradiolwerte korrelieren negativ mit der Reifung und der frühembryonalen Entwicklung (GREVE et al. 1988, NAKAJIAMA et al. 1992). Durch die Verabreichung von Anti-PMSG zur Neutralisierung der Langzeitwirkung des PMSG kann dieser negative Effekt vermindert werden, wenn die Applikation von Anti-PMSG zum richtigen Zeitpunkt, nämlich nach dem LH-Peak, erfolgt (DIELEMAN et al. 1993 b).

#### 2.4.2.1 GONADOTROPIN- PRIMING

Durch die Verabreichung eines Gonadotropins (FSH) in der frühen Zyklusphase besteht die Möglichkeit, eine erhöhte Anzahl stimulierungsfähiger Follikel zu induzieren (MONNIAUX et al. 1983). Eine größere Zahl solcher Funktionskörper führte zu einer erhöhten Ovulationszahl (MONNIAUX et al. 1983).

Im internationalen Schrifttum wird Priming jedoch kontrovers diskutiert. RAJAMAHENDRAN et al. (1987), PETR et al. (1990), JABLONKA (1991) und CHANDRA et al. (1997) kamen nach Gonadotropinpriming zu verbesserten Superovulationsergebnissen. Im Gegensatz dazu konnten GRAY et al. (1991, 1992) nach FSH- Priming keine Verbesserung feststellen, sahen die Ursache dafür aber in einem ungünstigen Verhältnis von Behandlungszeitpunkt bis Superovulationsbeginn.

Die Superovulationsbehandlung sollte dann begonnen werden, wenn durch das Priming stimulierte antrale Follikel vorliegen (ARMSTRONG 1993; FORTUNE et al. 1993). Auch scheint die verwendete Primingdosis von Bedeutung zu sein (GRAY et al. 1992).

#### 2.4.2.2 DOWN- REGULATION DER HYPOPHYSE

Eine andere Möglichkeit der Beeinflussung der Zahl stimulierbarer Follikel stellt eine Behandlung mit GnRH über einen längeren Zeitraum hinweg dar, wie es insbesondere in der Humanmedizin vor der Ovarstimulation angewendet wird. Eine *down regulation* der GnRH- Rezeptoren der Hypophyse resultierte in einer Suppression der LH-Freisetzung und der FSH-Plasmakonzentration. Dadurch kam es zur Regression der Follikel. Eine exogene FSH-Applikation führte dann zu einer Vielzahl stimulierbarer Follikel (LOUMAYE 1990). Beim Rind trat jedoch in einer Untersuchung von KANITZ et al. (1993) trotz verminderter basaler Plasma-LH- Werte nach GnRH- Behandlung ein Follikelwachstum auf, so daß die Ergebnisse der *down regulation* letztlich unbefriedigend waren.

MÜLLER (1988) ermittelte beim Rind nach GnRH- Applikation am dritten Zyklostag im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine gesteigerte Anzahl

transfertauglicher Embryonen und HAHN (1990) schließlich ging davon aus, daß die Embryonenqualität bei Problemtieren durch eine Unterstützung der Gelbkörperanbildung durch Gaben von GnRH zu Beginn des Zyklus verbessert werden kann.

#### 2.4.3 UMFELD DES SPENDERTIERES

Nach den Erfahrungen vieler Autoren hat die Jahreszeit einen nicht zu vernachlässigenden Anteil an guten Embryogewinnungsraten. So stellten LERNER et al. (1986) in ihren Versuchen fest, daß die Gesamtzahl gewonnener Embryonen und die Qualität der Embryonen im Frühjahr deutlich höher lagen als im Rest des Jahres ( $P < 0,01$ ). Auch der Prozentsatz transferfähiger Embryonen war im Frühjahr am höchsten ( $P < 0,01$ ).

Unter extremeren Umweltbedingungen ist eine deutliche saisonale Abhängigkeit festzustellen. So beobachteten TEGEGNE et al. (1997) in Äthiopien bei Rindern der Kreuzung Boran x Friesian eine deutlich bessere Ansprechbarkeit der Ovarien auf die Superovulation in der Regenzeit. Daraus resultierten im Vergleich zur Trockenzeit eine höhere Gewinnungsrate und deutlich mehr transfertaugliche Embryonen. In unseren Breiten scheint dieser Effekt kaum ausgeprägt zu sein (WICHMANN 1990, KINSEL et al. 1998).

BETTERIDGE (1977) vermutete eine saisonabhängige, endokrine Sensibilität der Spendertiere in Bezug auf die PMSG-Applikation im Zuge einer Superovulationsbehandlung. Er sah es auch im Bereich des Möglichen, daß die Eizellqualität als solche saisonalen Einflüssen unterliegt.

Der Einfluß der Tageslichtdauer wurde von SAUMANDE et al. (1978) untersucht. Sie setzten zwei Gruppen von Färsen einem Lichtprogramm von 8 bzw. 16 Stunden Licht /Tag aus. Die Versuchsgruppe, die 8 Stunden am Tag Licht erhielt, reagierte im Vergleich zur anderen Gruppe mit einer deutlich reduzierten Ovulationsrate,

Auch HAHN (1990) vermutete eine jahreszeitliche Variabilität in der Reaktion der Eierstöcke nach einer hormonalen Superovulationseinleitung. Dieses deckt sich jedoch nicht mit den Untersuchungsergebnissen von SHEA et al. (1984) und MASSEY et al. (1984), die keinen statistisch gesicherten Einfluß der Saison auf den Erfolg der Superovulation nachweisen konnten. BADINGA et al. (1993) gehen davon aus, daß Hitzestress die Effizienz der Follikel-selektion und –dominanz zu beeinflussen scheint und sich zudem negativ auf die Qualität der Oozyte auszuwirken scheint.

Die Bedeutung der Fütterung der Spendertiere für den Erfolg einer hormonellen Superovulation induktion darf nicht außer acht gelassen werden (HAHN 1990, LUCY et al. 1991, 1992; ROSCHLAU 1996). Eine kurzfristige restriktive Fütterung führte in neueren Untersuchungen zu einer erhöhten Follikelanzahl, einer verbesserten Entwicklung zur Blastozyste und mehr

transfertauglichen Embryonen (HUMBLOT et al. 1998, NOLAN et al. 1998). Eine Diät auf sehr hohem Energieniveau verschlechterte die ovarielle Reaktion deutlich und verringerte die Anzahl transfertauglicher Embryonen (GONG et al. 1999).

Eine andauernde Mangelernährung allerdings verschlechtert die Fruchtbarkeit und kann zur Einstellung des ovariellen Zyklus führen (NOLAN et al. 1998).

Sozialer Stress der Tiere führt zu unbefriedigenden Ergebnissen, da in anhaltenden Stresssituationen die Fortpflanzung für das Individuum in den Hintergrund tritt und solche Tiere nur wenig oder gar nicht auf Hormonbehandlungen ansprechen (ECHTERNKAMP 1984, EDWARDS et al. 1987). Hierbei ist ein erhöhter sozialer Stress nicht zwangsläufig von der Haltungform abhängig. So konnten KINSEL et al. (1998) zwischen Laufstall und Anbindehaltung keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Fruchtbarkeit feststellen.

PFEIFFER und HERZ (1984) diskutierten, daß das im Stress vermehrt ausgeschüttete ACTH mit einer erhöhten Sezernierung von  $\beta$ -Endorphinen einhergeht. Durch  $\beta$ -Endorphine wird nach Ansicht der Autoren u.a. die LH-Sekretion unterdrückt. Hieraus erklärt sich dann der negative Einfluß von Stress auf die Ovarien und die Ergebnisse einer Superovulationsinduktion. EDWARDS et al. (1987) wiesen nach, daß Transportstress die superovulatorische Reaktion vermindert, vermutlich über erhöhte Kortisolspiegel. Gestresste Tiere mit einem erhöhten Plasmakortisolspiegel wiesen erhöhte Plasmaprogesteron- und verminderte LH-Konzentrationen im Plasma auf (ECHTERNKAMP 1984). In ihren Untersuchungen bei kleinen Wiederkäuern ermittelten DALEY et al. (1999), daß eine stressbedingte Erhöhung des Plasmakortisolspiegels in der späten Gelbkörper- oder frühen Follikelwachstumsphase zu einer Suppression der Östradiolsekretion und einer gestörten Follikelreifung führte. Ein physiologischer LH-Peak war bei mehr als 50% der Probanden nicht vorhanden, bei den übrigen Tieren trat er deutlich verspätet auf. Die Autoren folgerten aus diesen Ergebnissen, daß Stress die ovarielle Funktionen beim kleinen Wiederkäuer empfindlich stört.

#### *2.4.3.1 UNMITTELBARER EINFLUß DES MENSCHEN*

Die mit den Tieren betrauten Personen beeinflussen den Erfolg von ET-Programmen maßgeblich (HAHN 1990, SEIDEL et al. 1978, 1989).

Ein gutes Herdenmanagement und Betriebsklima sind die Voraussetzungen für erfolgreiche ET-Programme (CAMP 1989, HAHN 1990, PREISINGER 1992, ROSCHLAU 1996). Hierzu gehören neben der Stallhygiene und Fütterung vor allem auch die Brunstbeobachtung (WICHMANN 1990, BROADBENT 1991, McMILLAN 1999). Die große Bedeutung der Umwelteinflüsse stellten TONHATI et al. (1999) in ihrer Studie an 2941 Holstein Friesian in

473 Herden fest. Von der Umwelt der Spendertiere hingen die Ergebnisse der Superovulationsbehandlungen am signifikantesten ab.

Die Selektion der Spendertiere auf Gesundheit und Fruchtbarkeit führt letztlich zu einer höheren Embryonengewinnungsrate (HAHN 1990, McMILLAN 1999).

Aufgabe des untersuchenden Tierarztes ist es, eine korrekte und sorgfältige Untersuchung auf den Gesundheitszustand und das Zyklusstadium der Tiere hin vorzunehmen.

Bei dem Stationspersonal, das die Behandlung, Insemination, die Gewinnung und Qualitätsbeurteilung der Embryonen vornimmt, kommt es stark auf die Erfahrung und Sorgfalt des Einzelnen an. Gleiches gilt für die Behandlung der Embryonen im Labor um iatrogene Schäden zu minimieren. (SEIDEL et al. 1978, 1989, HAHN 1990).

#### 2.4.4 PATERNALE EINFLÜSSE

Der Einfluß des Besamungsbullen auf die Embryonenqualität ist nicht so unmittelbar deutlich wie der des Muttertieres – er ist aber von ebenso großer Bedeutung (SAACKE et al. 1995, 1995, 1998).

Die männliche Fruchtbarkeit ist in entscheidendem Maße von der Befruchtungsfähigkeit der Spermien und der Kompetenz der entstandenden Zygote, sich von der frühembryonalen Stufe bis zum lebensfähigen Kalb zu entwickeln, abhängig (EID et al. 1994)

HAHN et al. (1980) untersuchten zunächst nur den Einfluß der Spermaqualität unterschiedlicher Bullen auf Trächtigkeitsergebnisse nach Embryotransfer. Sie fanden bei insgesamt 14 verwendeten Bullen erhebliche Unterschiede in den Trächtigkeitsraten, die zwischen 14% und 75% angesiedelt waren. In einem ähnlich angelegten Versuch teilten CALLAGHAN und KING (1980) Bullen, die in einem Embryotransferprogramm eingesetzt wurden, nach ihren NRR in zwei Gruppen ein. Die Gruppe mit einer sehr hohen NRR erzielte im Embryotransfer Befruchtungsraten von 89% während die Bullen der Gruppe II signifikant niedrigere Befruchtungsraten von nur 69,7% erreichten. HILL et al. (2000) untersuchten den Einfluß eines einzigen Besamungsbullen auf die Embryonengewinnung aus 669 Spenderkühen. Untersucht wurde zunächst der Einfluß des Bullenalters und es stellte sich heraus, daß der Bulle als junges Tier eine signifikant höhere Prozentzahl tauglicher Embryonen erzielte. Im Frühwinter gewonnene und tiefgefrorene Spermien befruchteten Oozyten in einer signifikant höheren Prozentrage als Spermien, die in der Sommersaison gewonnen wurden, so daß von einer jahreszeitlich unterschiedlichen Spermaqualität des Bullen auszugehen war. Die Autoren vermuteten, daß ein Teil der Spermien, die sich an die Oozyte anlagern, eine embryonale Entwicklung verhindern und daß dieser Prozentsatz an inhibierenden Spermien einer jahreszeitlichen Variabilität

unterliegt. Es gibt also nicht nur Unterschiede zwischen den Bullen sondern auch Schwankungen in der Fruchtbarkeit eines einzelnen Tieres.

Der paternale Einfluß auf die Befruchtungsraten und die Embryonenqualität wurde vor allem *in vitro* erforscht, *in vivo* liegen nur wenige Erkenntnisse vor. So wird im folgenden überwiegend auf paternale Einflüsse unter *In-vitro*-Bedingungen eingegangen.

In den letzten Jahren wurde von Autoren wie LONERGAN (1994) der Begriff des *Bullen sehr hoher Fruchtbarkeit* mit einer NRR von >78% geprägt. Schon DAVIS et al. (1987) wiesen in ihren Versuchen nach, daß Bullen sehr hoher Fertilität auch *in vitro* vergleichsweise höhere Befruchtungsraten aufwiesen.

LONERGAN (1994) sowie PARRISH und EID (1994) stellten in ihren Untersuchungen ebenfalls fest, daß die Befruchtungsraten bei diesen Bullen signifikant höher liegen als bei *Bullen niedriger Fruchtbarkeit* ( $P < 0,05$ ). Autoren wie SHAMSUDDIN und LARSSON (1993) beobachteten in Abhängigkeit von den eingesetzten Bullen signifikante Unterschiede sowohl in der Befruchtungsrate (72 Stunden nach *In-vitro*-Befruchtung) als auch in der Rate der Embryonen, die sich über den 8-Zell-Block hinaus entwickelten. Sie sahen einen engen Zusammenhang zwischen den Befruchtungsergebnissen in der KB und in IVF-Programmen. HILLERY et al. (1990) ermittelten einen signifikanten Bulleneinfluß auf den Prozentsatz der Embryonen, die sich bis zur kompakten Morula bzw. bis zum Stadium der Blastozyste entwickelten.

Deutlicher wurde die Bedeutung des Bullen bei den Beobachtungen, die SHI et al. (1991), EID et al. (1994) und LONERGAN (1994) hinsichtlich der Entwicklung und der Qualität der Embryonen machten.

SHI et al. (1991) ermittelten in ihrem Versuch bullenabhängige, signifikante Unterschiede in dem Prozentsatz befruchteter Eizellen, die sich zur Blastozyste entwickelten (10,6% - 30,5%). Erzielten Bullen einer Testreihe gleiche Befruchtungsraten, so konnten dennoch erhebliche Qualitätsunterschiede in bezug auf die Embryonen zwischen den Vatertieren bestehen (LONERGAN 1994).

LONERGAN (1994) ging davon aus, daß Bullen die frühembryonale Entwicklung beeinflussen und die von verschiedenen Bullen gezeugten Embryonen sich in dieser Phase der Embryonenentwicklung voneinander unterscheiden.

Vor allem die Entwicklung bis zum 8-Zellstadium und die Überwindung des sogenannten 8-Zell-Blocks ist bullenabhängig (LONERGAN 1994, SHAMSUDDIN et al. 1993). HILLERY- WEINHOLD (1991) sowie EID et al. (1994) engten den Beginn des paternalen Einflusses ein und setzten ihn um das 2-Zellstadium fest. Die spätere Entwicklung des Embryos bis zum

Stadium der Morula oder Blastozyste scheint weniger vom Bullen beeinflusst zu werden (SHAMSUDDIN und LARSSON 1993).

Der Grund für dieses unterschiedlich gute Entwicklungspotential der Embryonen mag seine Ursache in minimalen Qualitätsunterschieden der Spermienportionen verschiedener Bullen haben, die erst nach der Befruchtung der Eizelle offenbar werden (LONERGAN 1994, LEIBFRIED-RUTHLEDGE et al. 1986, HILLERY et al. 1990).

Offensichtliche Qualitätsmängel wie verminderte Vitalität oder morphologische Abweichungen der Spermienköpfe wie Kopfmißbildungen oder Kernvakuolen resultieren in jedem Fall in einer verminderten Embryonenqualität und einer erhöhten frühembryonalen Sterblichkeit (SETCHELL et al. 1988, DE JARNETTE et al. 1992, SAACKE et al. 1998). Dies gilt auch für die Embryonenentwicklung *in vitro* (EYESTONE und FIRST 1989, SHI et al. 1991, PARRISH et al. 1994). Die Mängel fallen *in vivo* jedoch nur bei niedriger Spermiengesamtosis zu Gewicht, wenn mißgebildete Spermien auf Grund der Selektionsmechanismen im weiblichen Reproduktionstrakt den Ort der Befruchtung nicht erreichen und nicht durch morphologisch intakte Spermien ersetzt werden können. Ist die Dosis hoch genug, so werden intakte Spermien die Oozyte erreichen. Morphologische Unterschiede können die zwischen den Bullen stark variierende Embryonenqualität folglich nicht ausreichend erklären (EID et al. 1994).

PARRISH und EID (1994) fanden heraus, daß es erhebliche Unterschiede in der zeitlichen Entwicklung von Embryonen unterschiedlicher Bullen gibt.

Am Tag sechs gewonnene Embryonen von Bullen hoher Fertilität waren in einem fortgeschritteneren Entwicklungsstadium angelangt als Embryonen von Bullen niedrigerer Fruchtbarkeit. Die Autoren beobachteten, daß die Penetration der Eizelle zwar noch zeitgleich erfolgte, die Bildung der Vorkerne geschah jedoch bei Zygoten der hochfertilen Bullen eine Stunde früher als bei den subfertilen Bullen. Bereits im 2-Zellstadium lagen dann diese Embryonen sieben Stunden in der Entwicklung zurück. Dieser Zeitrückstand wurde bis zum 8-Zellstadium beibehalten. Dieses Phänomen beobachteten auch MARQUANT LE GUIENNE et al. (1990). Die DNA-Synthese wurde in den Zygoten der hochfertilen Bullen 2-4 Stunden früher begonnen und dauerte länger an als bei den Zygoten von Bullen niedriger Fertilität (PARRISH und EID 1994). EID et al. (1994) beobachteten bei, von hochfertilen Bullen gezeugten Embryonen einen früheren Eintritt in das 2-Zellstadium und ein größeres Entwicklungspotential zur Blastozyste. Der als S-Phase charakterisierte Zellzyklusabschnitt dauerte bei diesen Embryonen länger als bei Embryonen von subfertilen Bullen, und die Embryonen traten früher in die S-Phase ein (PARRISH et al. 1992, EID et al. 1994).

Dieses könnte mit DNA - Abweichungen in dem Erbmateriale der Spermien zusammenhängen. Die zeitliche Verspätung der Zygote beim Eintritt in die S-

Phase könnte ihre Ursache in dem Versuch der Zelle haben, bestehende DNA - Schäden am paternalen Erbgut zu reparieren. EID et al. (1994) widerlegten mit diesen Untersuchungen die Beobachtungen anderer Autoren, die einen paternalen Einfluß auf die Entwicklung der Embryonen erst zum Zeitpunkt der ersten Transkription und Genexpression, die bis dahin um das 4- bis 8-Zellstadium vermutet wurde, für möglich hielten (FIRST et al. 1989, BARNES et al. 1989). Tatsächlich spielen paternale Einflüsse schon vor diesem Zeitpunkt eine Rolle (EID und PARRISH 1995, MARCUCIO et al. 1995).

Die Folge der oben beschriebenen Vorgänge ist eine verminderte Entwicklungskapazität der Embryonen (EID et al. 1994, QIU et al. 1995).

Es sind also wahrscheinlich vor allem jene, in Kapitel 2.2. aufgeführten nicht kompensierbaren Seminalparameter, die letztlich eine optimale Embryogenese verhindern (SAACKE et al. 1998).

Ein anderer, mit verbesserter Embryonenqualität einhergehender Faktor sind die, ebenfalls in Kapitel 2.2. erklärten, sogenannten akzessorischen Spermien. Eine Vielzahl von Autoren sehen eine positive Korrelation zwischen der Anzahl akzessorischer Spermien und der Embryonenqualität (NADIR et al. 1993, DE JARNETTE et al. 1992, SOEDE et al. 1995, SAACKE et al. 1998). Worin dieser Zusammenhang besteht, ist aber noch nicht endgültig geklärt.

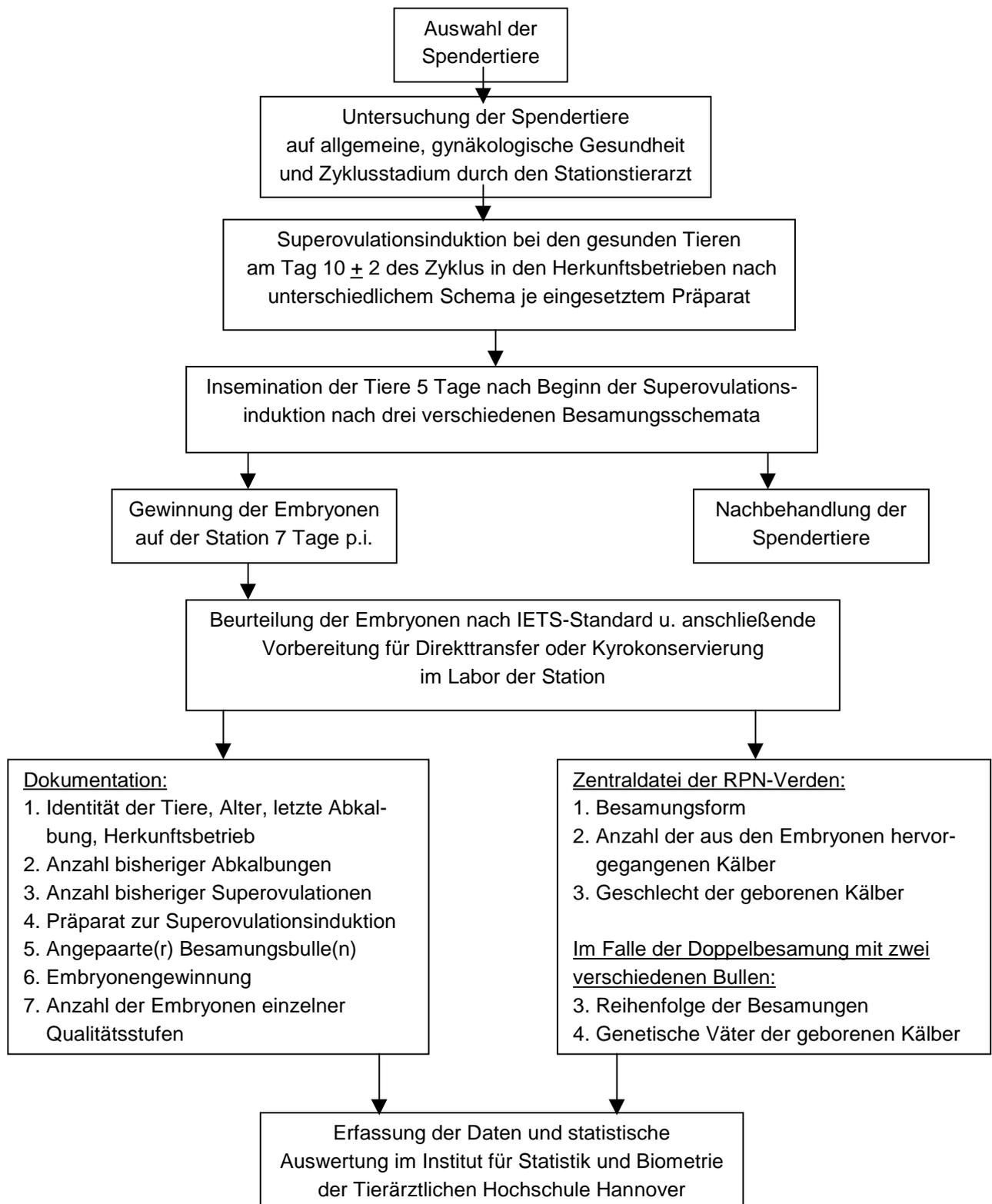
Da eine Steigerung der Inseminationsdosis in einigen Untersuchungen zu einer erhöhten Anzahl akzessorischer Spermien führte und diese wiederum mit der Embryonenqualität positiv korreliert, ist zu vermuten, daß auch zwischen der Inseminationsdosis und der Embryonenqualität ein Zusammenhang bestehen mag (NADIR et al. 1993). Der Beweis steht noch aus.

### **3 MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 DATENERFASSUNG**

In der Embryotransferstation des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter (VOSt) in Georgsheil sind in dem Beobachtungszeitraum von Mai 1991 bis April 1999 Uterusspülungen (n = 1934) zur Gewinnung von Embryonen nach einer Superovulationsbehandlung vorgenommen worden, die der vorliegenden Arbeit zur Auswertung zu Grunde liegen. Der Ablauf der Datenerfassung ist Abbildung 2 zu entnehmen.

Abbildung 2: Die Erfassung des Datenmaterials



### 3.1.1 SPENDERTIERE

Bei den ausgewählten Tieren handelt es sich um Tiere der Rasse Deutsche Holstein-Friesian. Die züchterische Auswahl erfolgte durch den Landwirt selbst, es sei denn, daß der VOST Tiere im Rahmen eines Zuchtprogrammes nach vorgegebenen Kriterien auswählte.

Die Tiere stammten aus 161 Herkunftsbetrieben, wobei für die Analyse des Standortes nur die 29 Betriebe Eingang in die Statistik fanden, in denen im Beobachtungszeitraum mehr als 20 Superovulationsbehandlungen vorgenommen wurden.

Die Spenderkühe wurden drei Altersklassen zugeordnet:

- Altersklasse I: Rinder (keine Abkalbung); n= 337
- Altersklasse II: Färsen (eine Abkalbung); n= 257
- Altersklasse III: Kühe (mehr als eine Abkalbung); n= 1340

Die Kühe wurden des weiteren in drei Superovulationsgruppen eingeteilt:

- Gruppe I: erste Superovulation; n= 1359
- Gruppe II: zwei Superovulationen; n= 282
- Gruppe III: drei und mehr Superovulationen; n= 293

### 3.1.2 PRÄPARATE & BEHANDLUNGSSCHEMATA ZUR SUPEROVULATIONSINDUKTION

Auf der Station Georgsheil kamen im Beobachtungszeitraum vier Präparate zur Superovulationseinleitung zum Einsatz:

- a) FSH-P® (Rigeaux, Segre); n= 470 Tiere
- b) pFSH: Folltropin-V® (Vetrepharm, London); n= 332 Tiere
- c) Ovines FSH: Ovagen® (ICP, Auckland, New Zealand); n= 85 Tiere
- d) PMSG(eCG): Intergonan® ( Intervet, Tönisvorst); n= 110 Tiere

Die Applikation der Präparate erfolgte intramuskulär (i.m.)

Die Dosierungen sind den Tabellen 4 und 5 zu entnehmen.

Zur Einleitung der Luteolyse und Auslösung der superovulatorischen Brunst wurde folgendes PGF<sub>2α</sub>-Präparat verwendet:

- Pronilen® (Intervet, Tönisvorst), 2 x 2 ml i.m. im Abstand von 12 Stunden ( 2 ml = 15 mg Luprostiol)

Zur Einengung des Ovulationszeitraumes wurde im Falle der Superovulationsinduktion mit FSH-P®, Folltropin® oder Ovagen® mit der ersten Besamung humanes Choriongonadotropin (hCG) appliziert:

- Ovogest® (Intervet, Tönisvorst), 5000 I.E. i.m.

Das zur Unterdrückung der Langzeitwirkung von PMSG verwendete Anti-PMSG war im Beobachtungszeitraum das folgende Präparat:

- Neutra-PMSG® (Intervet, Tönisvorst), 750 I.E. i.v.

Der Applikationszeitpunkt der Präparate ist aus den Tabellen 4 und 5 ersichtlich.

**Tabelle 4: Die Behandlungsschemata für FSH-P® und Folltropin-V®**

ZYKLUSTAG	ALTERSKLASSE	FSH-P®	FOLLTROPIN-V®
10 ± 2	Kühe / Färsen	6,0 mg 2 x/d	70 mg 2x/d
	Rinder	6,0 mg 2 x/d	40 mg 2x/d
11 ± 2	Kühe / Färsen	5,0 mg 2 x/d	60 mg 2x/d
	Rinder	5,0 mg 2 x/d	40 mg 2x/d
12 ± 2	Kühe / Färsen	4,0 mg 2 x/d	40 mg 2x/d
	Rinder	4,0 mg 2 x/d	40 mg morgens 32 mg abends
13 ± 2	Kühe / Färsen	6,0 mg morgens 3,0 mg abends	20 mg 2x/d
		15 mg PGF2α 2x/d i.m.	15 mg PGF2α 2x/d i.m
	Rinder	6,0 mg morgens 3,0 mg abends	28 mg morgens 20 mg abends
		15 mg PGF2α 2x/d i.m.	15 mg PGF2α 2x/d i.m
14 ± 2	Alle Gruppen	1,5 mg morgens	20 mg morgens
15 ± 2	Alle Gruppen	Besamung und Applikation von 5000 I.E. hCG i.m.	
22 ± 2		Gewinnung, Beurteilung und Behandlung der Embryonen	
Gesamtdosis des Präparates	Kühe / Färsen	40,5 mg	400 mg
	Rinder	40,5 mg	300 mg

Brunstbeginn d = 0, d: dies

**Tabelle 5: Die Behandlungsschemata für Ovagen® und Intergonan®**

ZYKLUSTAG	ALTERSKLASSE	OVAGEN® ( in mg NIH-FSH-S1)	INTERGONAN®
10 ± 2	Kühe / Färsen	61,6 mg 2x/d	3000 I.E.
	Rinder	35,2 mg 2x/d	1800 I.E.
11 ± 2	Kühe / Färsen	52,8 mg 2x/d	
	Rinder	35,2 mg 2x/d	
12 ± 2	Kühe / Färsen	35,2 mg 2x/d	
	Rinder	35,2 mg morgens 28,16 mg abends	
13 ± 2	Kühe / Färsen	17,6 mg 2x/d	15 mg PGF2 $\alpha$ morgens und abends
		15 mg PGF2 $\alpha$ 2x/d i.m.	
	Rinder	24,64 mg morgens 17,6 mg abends	15 mg PGF2 $\alpha$ morgens und abends
		15 mg PGF2 $\alpha$ 2x/d i.m.	
14 ± 2	Alle Gruppen	17,6 mg morgens	
15 ± 2	Alle Gruppen	Besamung und Applikation von 5000 I.E. hCG i.m.	Besamung und 750 I.E. Anti-PMSG i.v.
22 ± 2	Alle Gruppen	Gewinnung, Beurteilung und Behandlung der Embryonen	
Gesamtdosis des Präparates	Kühe / Färsen	352 mg	3000 I.E.
	Rinder	264 mg	1800 I.E.

Brunstbeginn d = 0, d: dies

Zu Ovagen®: 1 ml entspricht 0,88mg NIADDK-oFSH-17 bzw. 17,6 mg NIH-FSH-S1

### 3.1.3 BESAMUNGSSCHEMATA

Im Beobachtungszeitraum wurden auf der Station Georgsheil alternativ drei verschiedene Besamungsformen angewendet:

1. Die Spendertiere wurden nur einmal besamt (n = 21).
2. Doppelbesamung im Abstand von zwölf Stunden mit dem selben Bullen (n = 1294).
3. Doppelbesamung mit zwei verschiedenen Bullen im Abstand von zwölf Stunden (n = 276).

Als Besamungsbullen kamen 215 Bullen zum Einsatz, in die statistische Auswertung fanden nur die 30 Bullen Eingang, die mehr als 20x zum Einsatz kamen. Der Datensatz umfaßte 1591 Spülungen. In der Untersuchung des Besamungstyps wurden alle Bullen berücksichtigt. Bei der gesamten Gruppe handelte es sich um Bullen der Rasse Holstein-Friesian.

### 3.1.4 GEWINNUNG DER EMBRYONEN 7 TAGE POST INSEMINATIONEM

#### Materialien:

- Lidocain® 2%ig (Belapharm, Vechta), 4-6 ml für die kleine Epiduralanästhesie
- Spülkatheter mit eingesetztem Mandrin (Modell „Neustadt/ Aisch, Fa. Wörrlein, Ansbach):  
Katheterdurchmesser für Kühe und Färsen 18 mm, für Rinder 12-16 mm
- Spülmedium: Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline (DPBS); Gibco Brl, Life technologies TM®, Washington D.C. (ca.800 ml pro Spülung)
- Makromolekularer Zusatz zum Liter Spülmedium: 3ml bovines Serumalbumin (BSA); Biochrom KG, Berlin
- 20 ml Einwegspritzen (Fa. Braun, Melsungen)
- Filtersystem: Embryo Miniflush System TM® (minitube of America, Verona, Wisconsin)

Die Gewinnung der Embryonen erfolgte sieben Tage post inseminationem (p.i.). Hierfür wurden die Spendertiere nach Georgsheil auf die Station gebracht. Die Gewinnung der Embryonen sowie ihre Beurteilung und weitere Behandlung erfolgte durch den Stationstierarzt und einen erfahrenen Embryotransfertechniker. Nach der Reinigung des äußeren Genitales und dessen Umgebung wurde die Kuh zur Erleichterung des Spülprozesses in einem Fixationsstand vorne leicht hochgestellt.

Zur Unterdrückung der Bauchpresse wurde eine kleine Epiduralanästhesie gesetzt. Bei dem eingesetzten Lokalanästhetikum handelte es sich um Lidocain® 2%ig (Belapharm, Vechta) in einer Dosierung von 4-6 ml, je nach Größe der Spenderkuh.

Nach Spreizen der Schamlippen zur Passage der Vagina wurde der sterile Spülkatheter unter manueller Kontrolle durch die Zervix und das Corpus uteri in ein Uterushorn vorgeschoben. Dabei wurde der eingesetzte Mandrin langsam zurückgezogen. Eine am Katheter sitzende Manschette wurde zu seiner Fixation mit bis zu 20 ml Luft gefüllt, je nach Größe des Uterushornes. Die Spülung pro Horn erfolgte mit ca. 400 ml körperwarmer DPBS in Etappen von 20-60 ml. Sie wurden über eine Einwegspritze über den Katheter in den Uterus verbracht. Als makromolekularer Zusatz zur Verhinderung der Adhäsion der Embryonen im Katheter wurden der DPBS ca. 3 ml/l BSA zugesetzt.

Nach der Spülung des ersten Uterushornes verlief die Spülung des zweiten Hornes auf die gleiche Weise.

Das aus der Gebärmutter zurückgewonnene Medium wurde filtriert (Embryo Miniflush System TM®), so daß die gewonnenen Embryonen in der Filterschale des Systems zurückblieben.

### 3.1.5 BEURTEILUNG DER EMBRYONEN

#### Materialien:

- ca. 20 ml DPBS zur Freispülung des Filtersystemes
- Plastikpetrischalen , Durchmesser 94/16 mm (Fa. Greiner, Solingen)
- Plastikpetrischalen, Durchmesser 35/10 mm (Fa. Greiner, Solingen)
- Einwegpipetten (Fa.Greiner, Solingen)
- Mikroskop: Olympus SZ-40 (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg)
- Embryotransfermedium: ET-Medium FZ 9991 (Biochrom KG, Berlin; seromed® for in vitro use only)

Im Labor wurde zunächst der Filter mit DPBS freigespült, um auch zurückgebliebene Embryonen in einer Petrischale aufzufangen.

Der Inhalt der Petrischale und die eigentliche Filterschale wurden unter dem Stereomikroskop bei 10 - facher Vergrößerung durchgemustert. Mit einer sterilen Einwegpipette wurden aufgefundene Embryonen aspiriert und in kleine Petrischalen umgesetzt, die 1-2 ml des Embryotransfermediums enthielten.

Die Klassifizierung der Embryonen erfolgte bei 40 facher Vergrößerung unter dem Stereomikroskop. Auf der Station Georgsheil wird nach dem System der *International Embryo Transfer Society, IETS* (ROBERTSON und NELSON 1998) klassifiziert. Die Einteilung ist Tabelle 6 zu entnehmen.

Am Tag 7 p.i. gewonnene Embryonen sollten sich im Entwicklungsstadium der Morula oder Blastozyste befinden.

**Tabelle 6: Qualitative Beschreibung und Klassifizierung der Embryonen nach IETS-Standard (ROBERTSON und NELSON 1998)**

Qualitätsstufe	Zustand der Blastozyste	% intakte/ vitale Zellen	Transfer- kategorie
<b>sehr gut/gut</b>	symmetrische, sphärische Embryonen mit Blastomeren, die von einheitlicher Größe, Färbung und Dichte sind zeitgemäßer Entwicklungsstand kaum ausgeschleustes Zellmaterial im perivitellinen Raum glatte, intakte Zona pellucida ohne Verformungen	≥ 85%	1
<b>mittelmäßig</b>	moderate Unregelmäßigkeiten in Größe, Färbung und Dichte der Blastomeren	≥ 50%	2
<b>schlecht</b>	größere Normabweichungen der Blastomeren in Farbe, Größe, Dichte	≥ 25%	3
<b>degeneriert oder tot</b>	- Oozyten - in der Entwicklung stark zurückgebliebene Embryonen - degenerierte Embryonen		4

Als für den Direkttransfer taugliche Embryonen werden in Georgsheil die in die Kategorien 1 und 2 fallenden Embryonen ausgewählt. Für die Tiefgefrierung eignen sich vornehmlich die Embryonen der Kategorie 1.

### 3.1.6 NACHBEHANDLUNG DER SPENDERTIERE

Zur Induktion der Gelbkörperregression erhielten die Tiere im Anschluß an die Eizell/ Embryonengewinnung eine Injektion PGF2 $\alpha$  i.m. (2 ml Pronilen®, Intervet, Tönisvorst). Bei Verdacht auf Vorliegen einer Irritation wurde der Uterus lokal antibiotisch versorgt (1 Injektor Metricure®, Intervet, Tönisvorst).

### 3.1.7 WEITERE BEHANDLUNG DER EMBRYONEN

Die weiteren Behandlungsschritte richteten sich danach, ob die Embryonen tiefgefroren wurden oder aber im Direkttransfer auf ein Empfängertier übertragen wurden. Sie sind nicht Gegenstand dieser Arbeit.

### 3.1.8 ERFASSUNG WEITERER DATEN

Im Falle der Doppelbesamung mit zwei verschiedenen Bullen (n= 276 weibliche Tiere) wurde die Reihenfolge der eingesetzten Bullen aus der Zentraldatei der RPN Verden ermittelt. Der genetische Vater der aus den entsprechenden Embryotransfers hervorgegangenen Kälber wurde anhand dieser Datei festgestellt. In ihr liegen für alle ET- Kälber aus Herdbuchtieren PCR (Polymerase chain reaction)- Analysen vor. So ist es möglich, den genetischen Vater zu bestimmen.

Um eine Analyse einer potentiellen paternalen Beeinflussung auf das Geschlecht der Nachkommen vornehmen zu können, wurde dieser Zentraldatei das Geschlecht der geborenen Kälber entnommen. Das geschah jedoch nur bei den Kälbern, die von den Bullen gezeugt worden waren, die im Beobachtungszeitraum mehr als 20 mal eingesetzt wurden (n= 30 Bullen).

### 3.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG:

Die Daten wurden im Institut für Statistik und Biometrie der Tierärztlichen Hochschule Hannover statistisch ausgewertet. Mittelwerte (arithmetisches Mittel), Standardabweichungen und Prozentangaben wurden mit excel (excel für Windows Version 97) berechnet.

Die statistische Auswertung selbst erfolgte mit dem Statistical Analysis System SAS®, Version 6.04, USA 1990.

Als statistisch signifikant galten Unterschiede von  $P \leq 0,05$ ; als hochsignifikant Werte von  $P \leq 0,01$ .

Die verwendeten Tests waren für die Prüfung auf Signifikanz zunächst ein- und anschließend mehrfaktorielle Varianzanalysen mit dem *General Linear Models Procedure (GLM)*.

Im Falle einer statistischen Signifikanz wurden bei normalverteilten Daten der t - Test für ungepaarte Stichproben nach *Tukey* und nach *Student* angeschlossen. Im Falle der Nichtnormalverteilung kam der *Wilcoxon's rank sum test* zur Anwendung. Mit diesen Tests wurden die einzelnen Unterabteilungen eines Faktors, also zum Beispiel die vier verschiedenen Hormone hinsichtlich ihres unterschiedlich starken Einflusses auf die Merkmale Anzahl gewonnene Eizellen/ Embryonen, unbefruchtete Embryonen, degenerierte Embryonen und transfertaugliche Embryonen, untersucht und auf signifikante Unterschiede geprüft.

Im Falle des Einflusses der Zeit über die Versuchsjahre wurde eine Korrelations-und Regressionsanalyse angewandt.

Im Falle der Überprüfung des Bulleneinflusses auf das Geschlechterverhältnis seiner Nachkommen kam der  $\chi^2$  - Test zum Einsatz.

Die genannten Testverfahren sind dem Buch: Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden (SACHS 1999) zu entnehmen und wurden auf einem PC durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 EINFLÜSSE DURCH DIE SPENDERKUH

#### 4.1.4 EINFLUß DES ALTERS DER SPENDERKUH

In der vorliegenden Studie wurden die Spendertiere drei Altersklassen zugeteilt, die sich nach den Abkalbungen des Tieres richteten und folglich auch als Faktor „Kalbezahl“ bezeichnet wurden.

Altersklasse I: Rinder: noch keine Abkalbung

Altersklasse II: Färsen: eine Abkalbung

Altersklasse III: Kühe: mehr als eine Abkalbung

Der Einfluß des Alters der Kuh auf die Erfolgsrate der Embryospülungen war Gegenstand dieser Untersuchung. In der Altersklasse Rinder wurden insgesamt 2203 Eizellen/ Embryonen gewonnen, davon waren 607 degeneriert, 277 unbefruchtete Oozyten und 1318 taugliche Embryonen. In der Klasse Färsen lag die Gesamtsumme bei 1976 Eizellen/ Embryonen, davon 576 degenerierte Embryonen, 195 unbefruchtete Oozyten und 1205 taugliche Embryonen. In der Klasse Kühe wurden 12649 Eizellen/ Embryonen gewonnen, davon waren 3986 degeneriert, 938 unbefruchtet und 7725 tauglich.

Die erreichten Mittelwerte der einzelnen Merkmale innerhalb des Untersuchungszeitraumes sind der Tabelle 7 zu entnehmen:

**Tabelle 7: Embryonengewinnungszahl und -qualität in Abhängigkeit vom Alter der Donorkuh**

	Rinder (n=337)		Färsen (n=257)		Kühe (n=1340)	
	ξ	SD	ξ	SD	ξ	SD
<b>EG</b>	6,54	5,28	7,69	6,31	9,44	7,27
<b>Edeg.</b>	1,8	2,78	2,24	3,02	2,98	5,4
<b>Ounb.</b>	0,82	1,5	0,76	1,8	0,70	1,5
<b>Etaug.</b>	3,91	4,07	4,69	4,63	5,77	4,96
<b>%taugl.</b>	59,78		60,98		61,12	

ξ: Mittelwert, SD: Standardabweichung, EG: Gesamtzahl gewonnene Eizellen/ Embryonen, Edeg. Anzahl degenerierte Embryonen, Ounb.: Anzahl unbefruchtete Oozyten, Etaug.: Anzahl taugliche Embryonen, %taugl: Prozentsatz tauglicher Embryonen

Mit zunehmendem Alter stiegen die Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen (EG), die Anzahl und der Prozentsatz tauglicher Embryonen (Etaug.) kontinuierlich an.

In der *Varianzanalyse* ergaben sich für den Faktor „Kalbezahl“, und damit das Alter der Spenderkuh für drei Untersuchungsparameter signifikante Einflüsse:

- 1. Anzahl gewonnene Eizellen/Embryonen  $P= 0,0001$
- 2. Anzahl degenerierter Embryonen:  $P= 0,0001$
- 3. Anzahl unbefruchtete Oozyten:  $P= 0,207$
- 4. Anzahl taugliche Embryonen:  $P= 0,018$

Das Merkmal Anzahl unbefruchteter Oozyten (Ounb.) unterliegt in dieser Studie mit keiner statistisch gesicherten Beeinflussung durch das Alter der Spenderkuh.

Um die drei verschiedenen Altersklassen untereinander vergleichen zu können, wurde ein *t-Test* angeschlossen. Er lieferte folgende Ergebnisse (Tabellen 8-11).

**Tabelle 8: Anzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen in Abhängigkeit vom Alter der Kuh**

	Rind	Färse	Kuh
Rind		$P= 0,007$	$P=0,001$
Färse			$P=0,01$

„Rinder“ erzielten signifikant weniger Eizellen/ Embryonen als die Altersklassen „Färsen“ und „Kühe“. Die Ergebnisse der beiden letzten Altersklassen unterschieden sich ebenfalls signifikant voneinander, wobei „Kühe“ mehr Eizellen/Embryonen lieferten als „Färsen“.

**Tabelle 9: Anzahl degenerierter Embryonen in Abhängigkeit vom Alter der Kuh**

	Rind	Färse	Kuh
Rind		$P= 0,24$	$P= 0,0001$
Färse			$P= 0,01$

Bei dem Merkmal degenerierte Embryonen (Edeg.) traten signifikante Unterschiede zwischen „Rindern“ und „Kühen“ auf der einen Seite und „Färsen“ und „Kühen“ auf der anderen Seite auf. In beiden Fällen erzielten die, der Altersklasse „Kühe“ zugeordneten Tiere signifikant mehr degenerierte Embryonen als die Vergleichsgruppe.

**Tabelle 10: Anzahl unbefruchteter Oozyten in Abhängigkeit vom Alter der Kuh**

	<b>Rind</b>	<b>Färse</b>	<b>Kuh</b>
<b>Rind</b>		<i>P= 0,3</i>	<i>P= 0,58</i>
<b>Färse</b>			<i>P= 0,07</i>

Bezüglich des Merkmals Ounb. traten in der Analyse zwischen den Altersklassen keine Signifikanzen auf.

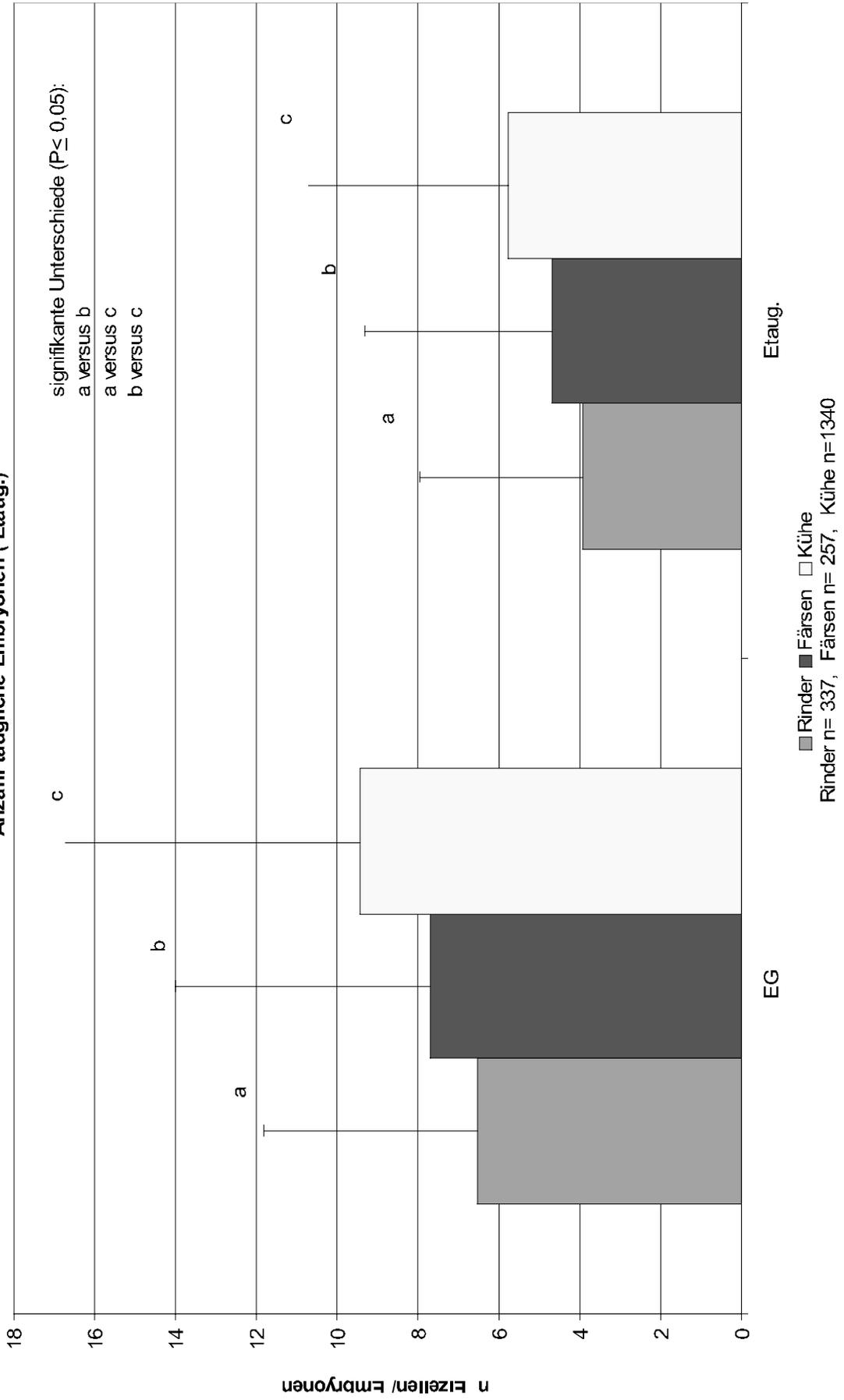
**Tabelle 11: Anzahl tauglicher Embryonen in Abhängigkeit vom Alter der Kuh**

	<b>Rind</b>	<b>Färse</b>	<b>Kuh</b>
<b>Rind</b>		<i>P= 0,038</i>	<i>P= 0,006</i>
<b>Färse</b>			<i>P= 0,0003</i>

Die Altersklasse „Kühe“ erreichte im Vergleich mit den beiden anderen Altersklassen signifikant mehr taugliche Embryonen. Im Vergleich „Rinder-Färsen“ lieferten Färsen signifikant mehr Embryonen.

Aus den Ergebnissen ist abzuleiten, daß das Alter des Spendertieres in dieser Studie einen signifikanten Einfluß auf die Anzahl gewonnener Eizellen und Embryonen und die Anzahl tauglicher Embryonen je Spülung hat. Die in dieser Studie als Altersklasse „Kühe“ bezeichneten Spendertiere im Alter von 4- 7 Jahren, erzielten pro Embryogewinnung sowohl signifikant mehr Eizellen/ Embryonen als auch signifikant mehr taugliche Embryonen als die Tiere der beiden anderen Altersklassen. Abbildung 3 zeigt den Einfluß des Alters der Spenderkuh auf die Gesamtzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen und die Embryonenqualität.

**Abbildung 3: Einfluß des Alters der Spenderkühe auf die Merkmale Anzahl gewonnene Eizellen/Embryonen (EG) und Anzahl taugliche Embryonen ( Etaug.)**



4.1.2 EINFLUß DER SUPEROVULATIONSANZAHL INNERHALB DER LAKTATION

Die Spenderkühe wurden bei der Untersuchung des Einflusses der Anzahl von Superovulationen in der Laktation drei Gruppen zugeordnet:

1. Tiere mit der ersten Superovulation in der aktuellen Laktation
2. Tiere mit der zweiten Superovulation in der Laktation
3. Tiere mit drei und mehr Superovulationen in der Laktation

In Gruppe 1 wurden insgesamt 12000 Eizellen/ Embryonen gewonnen, davon waren 4553 degeneriert, 666 unbefruchtet und 6781 tauglich. In Gruppe 2 lag die Gesamtsumme für das Merkmal EG bei 2495 Eizellen/ Embryonen, davon 1073 degenerierte Embryonen, 149 unbefruchtete Oozyten und 1273 taugliche Embryonen.

Gruppe 3 wies Werte von 2695 Eizellen/ Embryonen, 1289 degenerierten Embryonen, 193 unbefruchteten Oozyten und 1213 tauglichen Embryonen auf.

In den Jahren 1991-1999 wurden auf der Station Georgsheil von den drei Untersuchungsgruppen die in Tabelle 12 ersichtlichen Ergebnisse erzielt.

**Tabelle 12: Embryonengewinnungszahl und –qualität in Abhängigkeit von der Superovulationsanzahl**

		EG		Edeg.		Ounb.		Etaug.		%taug
SUPEROV.	n	ξ	SD	ξ	SD	ξ	SD	ξ	SD	
<b>Gruppe 1</b>	1359	8,83	6,79	3,35	4,6	0,49	1,68	4,99	4,72	56,51
<b>Gruppe 2</b>	282	8,84	7,09	3,81	4,99	0,53	1,28	4,53	4,96	51,24
<b>Gruppe 3</b>	293	9,20	7,05	4,40	5,07	0,66	6,98	4,14	4,88	45,00

Superov.: Anzahl Superovulationen/Laktation, ξ: Mittelwert, SD:Standardabweichung  
 %taug.: Prozent taugliche Embryonen, EG, Edeg., Ounb., Etaug. vergleiche Tabelle 7

Anhand der Mittelwerte lassen sich Tendenzen erkennen. So nimmt die Anzahl unbefruchteter und degenerierter Embryonen mit steigender Anzahl von Superovulationen zu.

Die Anzahl und der Prozentsatz tauglicher Embryonen hingegen nimmt mit steigender Superovulationsanzahl deutlich ab, vor allem im Vergleich der Gruppe 1 gegen Gruppe 3.

Die angeschlossene *Varianzanalyse* eragb folgende *P- Werte* für die untersuchten Merkmale EG, Edeg., Ounb. und Etaug. bezüglich des Faktors Superovulationsanzahl:

1. Anzahl gewonnener Eizellen/Embryonen:  $P= 0,64$
2. Anzahl degenerierter Embryonen:  $P= 0,035$
3. Anzahl unbefruchteter Oozyten:  $P= 0,004$
4. Anzahl tauglicher Embryonen:  $P= 0,08$

Für die Merkmale EG und Etaug. ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Der anhand der Mittelwerte ersichtliche Trend zu einer höheren Anzahl und vor allem einem höheren Prozentsatz tauglicher Embryonen in der Untersuchungsgruppe 1, also bei Tieren mit der ersten Superovulation innerhalb der aktuellen Laktation, bleibt aber als Trend bestehen.

Im Vergleich der drei Gruppen ergaben sich im *t-Test* in Bezug auf die beiden Merkmale signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabellen 13-16).

**Tabelle 13: Anzahl gewonnener Eizellen /Embryonen in Abhängigkeit von der Superovulationsanzahl pro Laktation**

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe3</b>
<b>Gruppe 1</b>		$P= 0,86$	$P= 0,18$
<b>Gruppe 2</b>			$P= 0,19$

In der statistischen Analyse traten bezüglich des Merkmals EG keine signifikanten Unterschiede auf.

**Tabelle 14: Anzahl degenerierter Embryonen in Abhängigkeit von der Superovulationsanzahl pro Laktation**

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>
<b>Gruppe 1</b>		$P= 0,32$	$P= 0,012$
<b>Gruppe 2</b>			$P= 0,139$

Tiere mit nur einer Superovulation erzielten signifikant weniger degenerierte Embryonen als Tiere mit drei und mehr Superovulationen.

Gruppe 2 und 3 unterschieden sich nicht signifikant.

**Tabelle 15: Anzahl unbefruchteter Oozyten in Abhängigkeit von der Superovulationsanzahl pro Laktation**

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>
<b>Gruppe 1</b>		<i>P= 0,02</i>	<i>P= 0,008</i>
<b>Gruppe 2</b>			<i>P= 0,139</i>

In Bezug auf das Merkmal „Anzahl unbefruchteter Embryonen“ traten in der Untersuchungsgruppe 1 signifikant weniger unbefruchtete Embryonen als in den Gruppen 2 und 3 auf.

Die Gruppen 2 und 3 unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

**Tabelle 16: Anzahl tauglicher Embryonen in Abhängigkeit von der Superovulationsanzahl pro Laktation**

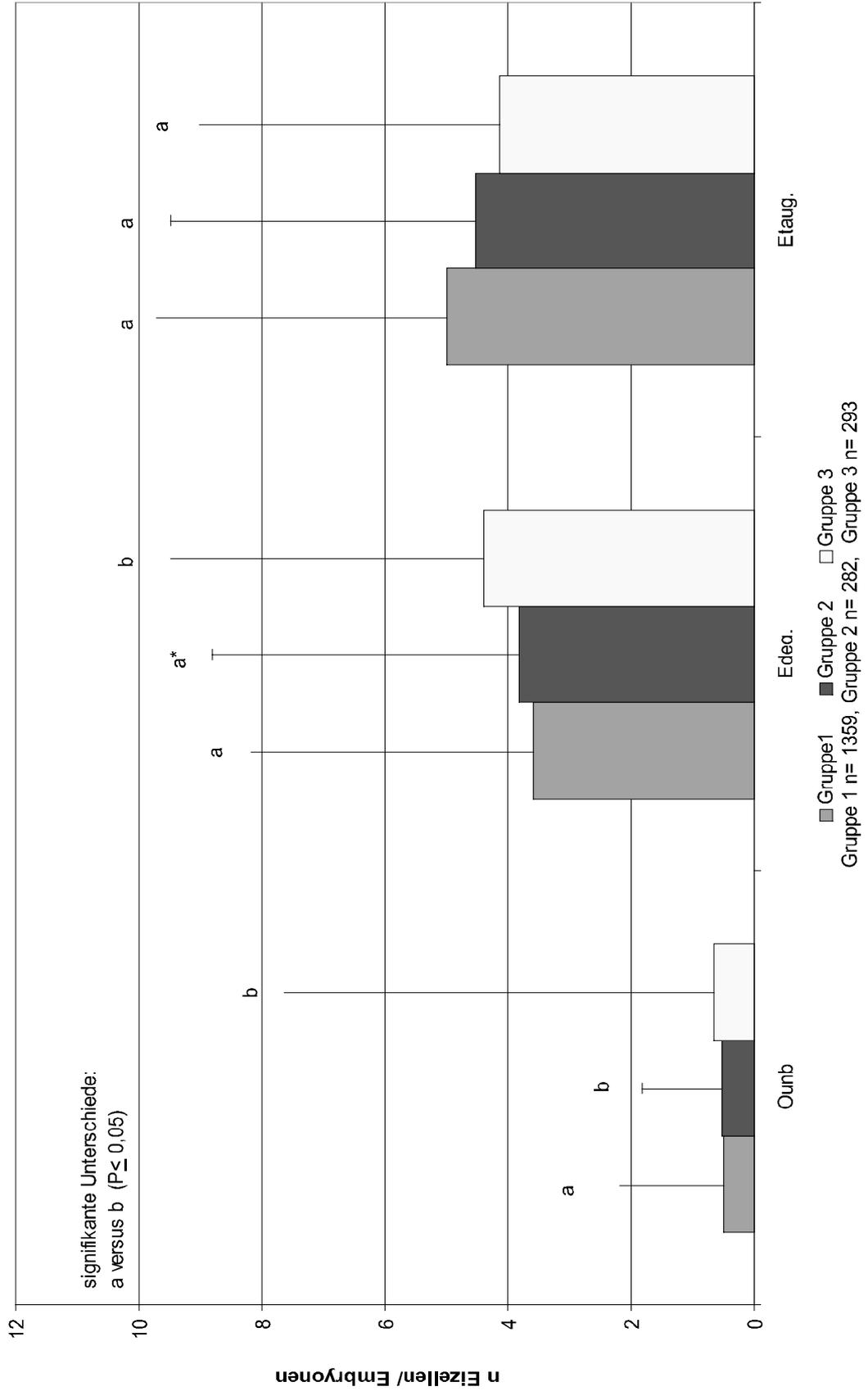
	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>
<b>Gruppe 1</b>		<i>P= 0,89</i>	<i>P= 0,463</i>
<b>Gruppe 2</b>			<i>P= 0,589</i>

In der Analyse des Merkmals Etag. traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Superovulationsgruppen auf.

Es ist folglich festzuhalten, daß die Anzahl tauglicher Embryonen mit steigender Superovulation tendenziell abnimmt (ohne statistische Absicherung), die Anzahl unbefruchteter Oozyten und degenerierter Embryonen hingegen bei dem dieser Studie zu Grunde liegenden Datenmaterial in gleicher Richtung signifikant zunimmt.

Es besteht hier ein statistisch abgesicherter, biologischer Einfluß des Faktors „Anzahl von Superovulationen in der Laktation“ auf den Erfolg der Embryonengewinnung. Abbildung 4 veranschaulicht den Einfluß der Superovulationsanzahl pro Laktation auf die Gesamtzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen und die Merkmale Eted., Ounb. und Etag.

Abbildung 4: Einfluß der Superovulationsanzahl pro Laktation auf die Embryonenqualität



4.1.3 EINFLUß DER RASTZEIT

In dieser Untersuchung galt es herauszufinden, ob der Erfolg einer Embryonengewinnung von der Zeitspanne abhängt, die vom Tag der letzten Abkalbung bis zum Tage der Embryonengewinnung vergangen ist (Rastzeit). Gemessen wird dieser Erfolg an der Anzahl transfertauglicher, degenerierter und unbefruchteter Embryonen sowie an der Gesamtzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen.

Die Zeit wurde berechnet aus der Differenz des Spüldatums und des Kalbedatums. Folglich konnten die als Rinder bezeichneten Tiere (keine Abkalbung vor der Superovulatingsinduktion) in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt werden. Es wurden 1234 Spülungen in die Rechnung einbezogen. Insgesamt wurden 10952 Eizellen/ Embryonen gewonnen, davon waren 4014 degeneriert, 832 unbefrucht und 6110 tauglich.

Die Mittelwerte für die untersuchten Merkmale im Beobachtungszeitraum sind Tabelle 17 zu entnehmen.

**Tabelle 17: Erzielte Mittelwerte aus allen Spülungen bei „Kühen“ und „Färsen“ (n= 1234) im Untersuchungszeitraum bezüglich zur Rastzeit**

Merkmal	gewonnene Eizellen und Embryonen pro Spülung	
	$\xi$	SD
<b>EG</b>	8,88	6,88
<b>Edeg.</b>	3,24	4,86
<b>Ounb.</b>	0,67	1,55
<b>Etaug.</b>	4,94	4,78

$\xi$ : Mittelwert, SD: Standardabweichung, EG, Edeg., Ounb., Etaug.siehe Tabelle 7

Die durchschnittliche Rastzeit der Tiere betrug  $\xi = 249 \pm 110,9$  Tage. Um eine potentielle Korrelation der Rastzeit mit den Merkmalen EG, Edeg., Ounb. und Etaug. zu überprüfen, wurde die *Rangkorrelationsanalyse nach Spearman* angewandt. Die ermittelten Rangkorrelationskoeffizienten sind der Tabelle 18 zu entnehmen.

**Tabelle 18: Rangkorrelationskoeffizienten von EG, Edeg.; Ounb. und Etaug. zur Rastzeitzeit**

	<b>EG</b>	<b>Edeg.</b>	<b>Ounb.</b>	<b>Etaug.</b>
<b>v</b>	0,0003	0,006	- 0,12	-0,06

v= Rangkorrelationskoeffizient , EG, Edeg., Ounb., Etaug. siehe Tabelle 7

Die Merkmale Anzahl degenerierte Embryonen, unbefruchtete Oozyten und transfertaugliche Embryonen korrelieren nur sehr schwach mit dem Faktor Zeit. Das bedeutet, daß in dieser Untersuchung die Embryonengewinnungsrate nicht von der Zeitspanne zwischen der letzten Abkalbung und dem Tag der Embryonengewinnung beeinflusst wird .

Um dies zu verdeutlichen, wurde das *Bestimmtheitsmaß* für die untersuchten Merkmale berechnet.

Das *Bestimmtheitsmaß* ist definiert als der Anteil der Varianz von y (Merkmal), der sich aus dem Variieren des Faktors (hier der Zeit) erklären läßt:

$$\text{Bestimmtheitsmaß } B = v^2$$

Ein Bestimmtheitsmaß von  $B=1$  entspricht einer Abhängigkeit eines Merkmales von einem Faktor von 100%.

Es beträgt für den stärksten Rangkorrelationskoeffizienten, der bei Merkmal Anzahl unbefruchtete Oozyten ( $v= - 0,12$ ) zu verzeichnen ist:

$$B = - 0,12^2 = 0,014$$

Das ist ein schlechtes Bestimmtheitsmaß, denn es bedeutet, daß das Merkmal „Anzahl degenerierter Embryonen“ nur zu 1,4% vom Faktor Zeit beeinflusst wird. Anders gesagt wird dieses Merkmal zu annähernd 99% nicht von der Zeit nach der Kalbung beeinflusst.

Die Bestimmtheitsmaße für die Merkmale Edeg. und Etaug. betragen jeweils  $B=0,0036$ .

Es bestand im Untersuchungszeitraum demnach eine lockere Korrelation zwischen der Rastzeit und den untersuchten Merkmalen „Anzahl degenerierter Embryonen, unbefruchteter Oozyten und tauglicher Embryonen“. Eine Varianzanalyse wurde auf Grund der schwachen Korrelation der Daten nicht durchgeführt. Es bestand kein statistisch gesicherter biologischer Einfluß der Rastzeit auf die untersuchten Merkmale und es ist aufgrund dieser Ergebnisse nicht möglich, eine Zeitspanne nach der letzten Abkalbung anzugeben, in der mit statistischer Sicherheit besonders gute Ergebnisse nach einer Superovulationsbehandlung zu erwarten sind. Hinzu kommt, daß es sich bei dieser Untersuchung um eine Feldstudie handelte und nicht jede Zeitspanne gleichberechtigt war, d.h. nicht gleich oft vorkam. Deshalb wäre selbst bei einer stärkeren Korrelation eine Angabe fragwürdig.

4.1.4 EINFLUß DES VERWENDETEN HORMONPRÄPARATES

Zur Superovulationsinduktion wurden auf der Station Georgsheil in den Jahren 1991-1999 vier verschiedene Hormone eingesetzt:

1. FSH-P®
2. Folltropin-V®
3. PMSG
4. Ovagen®

Der Einfluß des eingesetzten Hormonpräparates auf den Erfolg der Spülungen wurde in Bezug auf die Merkmale Anzahl gewonnene Eizellen/ Embryonen (EG), Anzahl degenerierter Embryonen (Edeg.), Anzahl unbefruchteter Oozyten (Ounb.) und Anzahl tauglicher Embryonen (Etaug.) hin statistisch analysiert.

In der FSH-P®- Gruppe wurden 4562 Eizellen/ Embryonen gewonnen, davon waren 1767 degeneriert, 435 unbefruchtet und 2360 tauglich. Für die Folltropin-V®- Gruppe ergaben sich Werte von 2973 Eizellen/ Embryonen, davon 1192 degenerierte Embryonen, 229 unbefruchtete Oozyten und 1552 taugliche Embryonen. Für PMSG bzw. Ovagen® lagen die erzielten Gesamtsummen bei 696 bzw. 627 Eizellen/ Embryonen (davon Edeg.: 303 bzw. 241, Ounb.: 70 bzw. 42, Etaug.: 323 bzw. 344).

Im Mittel wurden bei Verwendung der vier Hormone die folgende Anzahl von Embryonen pro Spülung erzielt (Tabelle 19):

**Tabelle 19: Mittelwert der Embryonengewinnungsrate und –qualität in Abhängigkeit vom eingesetzten Präparat.**

	n	EG		Edeg.		Ounb.		Etaug.		% taugl.
		ξ	SD	ξ	SD	ξ	SD	ξ	SD	
<b>FSH-P®</b>	470	9,69	7,37	3,77	5,09	0,93	1,87	5,04	4,73	52,01
<b>Folltropin-V®</b>	332	8,96	7,16	3,59	5,93	0,69	1,4	4,67	4,27	52,12
<b>PMSG</b>	110	6,32	5,24	2,77	4,23	0,65	1,23	3,08	3,57	48,73
<b>Ovagen®</b>	85	7,38	5,67	2,82	5,1	0,48	1,5	3,89	3,9	52,71

ξ: Mittelwert; SD:Standardabweichung, %taugl., EG, Edeg., Ounb., Etaug.: vergleiche Tabelle 7

FSH-P® und Folltropin sind bezüglich der Merkmale EG und Etaug. dem Ovagen® und PMSG deutlich überlegen. Bezogen auf den Prozentsatz

tauglicher Embryonen ist Ovagen den beiden erstgenannten Präparaten gleichwertig.

In der *Varianzanalyse* stellten sich signifikante Einflüsse des Faktors „Hormon“ auf die untersuchten Merkmale heraus:

1. Anzahl gewonnene Eizellen/Embryonen:  $P= 0,0001$  hochsignifikant
2. Anzahl degenerierter Embryonen:  $P= 0,304$  nicht signifikant
3. Anzahl unbefruchteter Oozyten:  $P= 0,05$  signifikant
4. Anzahl transfertauglicher Embryonen:  $P= 0,007$  signifikant

Nachdem ein statistisch gesicherter, signifikanter Einfluß des verwendeten Hormons auf die untersuchten Merkmale 1, 2 und 4 besteht, wurden mittels des *Wilcoxon-Tests* für nicht normalverteilte Daten Unterschiede zwischen den vier eingesetzten Hormonen auf ihre statistische Signifikanz hin analysiert (Tabellen 20-23).

**Tabelle 20: EG in Abhängigkeit vom eingesetzten Präparat**

	<b>FSH-P®</b>	<b>FOLLTROPIN-V®</b>	<b>PMSG</b>	<b>OVAGEN®</b>
<b>FSH-P®</b>		$P= 0,148$	$P= 0,0001$	$P= 0,0082$
<b>Folltropin-V®</b>			$P= 0,0002$	$P= 0,051$
<b>PMSG</b>				$P= 0,203$

Aus Tabelle 20 geht hervor, daß sich die Hormone FSH-P® und Folltropin-® bezüglich der EG nicht signifikant voneinander unterscheiden. Der Einsatz dieser beiden Hormone lieferte im Untersuchungszeitraum signifikant mehr Embryonen als der Einsatz von PMSG oder Ovagen®. Im Falle des PMSG ist der Unterschied hochsignifikant.

PMSG und Ovagen® unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

**Tabelle 21: Anzahl degenerierter Embryonen im Abhängigkeit vom eingesetzten Präparat**

	<b>FSH-P®</b>	<b>FOLLTROPIN-V®</b>	<b>PMSG</b>	<b>OVAGEN®</b>
<b>FSH-P®</b>		$P=0,913$	$P= 0,043$	$P=0,036$
<b>Folltropin-V®</b>			$P= 0,041$	$P= 0,027$
<b>PMSG</b>				$P= 0,841$

Auch bei dem Merkmal Edeg. unterscheiden sich FSH-P® und Folltropin-V® nicht signifikant voneinander. Sie erzielten im Untersuchungszeitraum dieser Studie jedoch signifikant mehr degenerierte Embryonen als vergleichsweise

PMSG und Ovagen®. Letzere unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

**Tabelle 22: Anzahl unbefruchteter Oozyten in Abhängigkeit vom eingesetzten Präparat**

	<b>FSH-P®</b>	<b>Folltropin-V®</b>	<b>PMSG</b>	<b>Ovagen®</b>
<b>FSH-P®</b>		<i>P=0,18</i>	<i>P=0,019</i>	<i>P=0,008</i>
<b>Folltropin-V®</b>			<i>P=0,02</i>	<i>P=0,4</i>
<b>PMSG</b>				<i>P=0,72</i>

Nach der Verwendung von FSH-P® traten signifikant mehr unbefruchtete Oozyten auf als nach PMSG oder Ovagen®. Folltropin-V® erzielte signifikant mehr unbefruchtete Oozyten als PMSG. FSH-P® und Folltropin® einerseits und PMSG und Ovagen® andererseits unterschieden sich nicht signifikant.

**Tabelle 23: Anzahl transfertauglicher Embryonen in Abhängigkeit vom eingesetzten Präparat**

	<b>FSH-P®</b>	<b>FOLLTROPIN-V®</b>	<b>PMSG</b>	<b>OVAGEN®</b>
<b>FSH-P®</b>		<i>P=0,755</i>	<i>P=0,0001</i>	<i>P=0,093</i>
<b>Folltropin-V®</b>			<i>P=0,0001</i>	<i>P=0,092</i>
<b>PMSG</b>				<i>P=0,052</i>

FSH-P® und Folltropin-V® unterschieden sich statistisch gesehen nicht signifikant.

Wurden sie zur Superovulationsinduktion eingesetzt, so lieferten die entsprechenden Spülungen hochsignifikant mehr taugliche Embryonen als vergleichsweise PMSG.

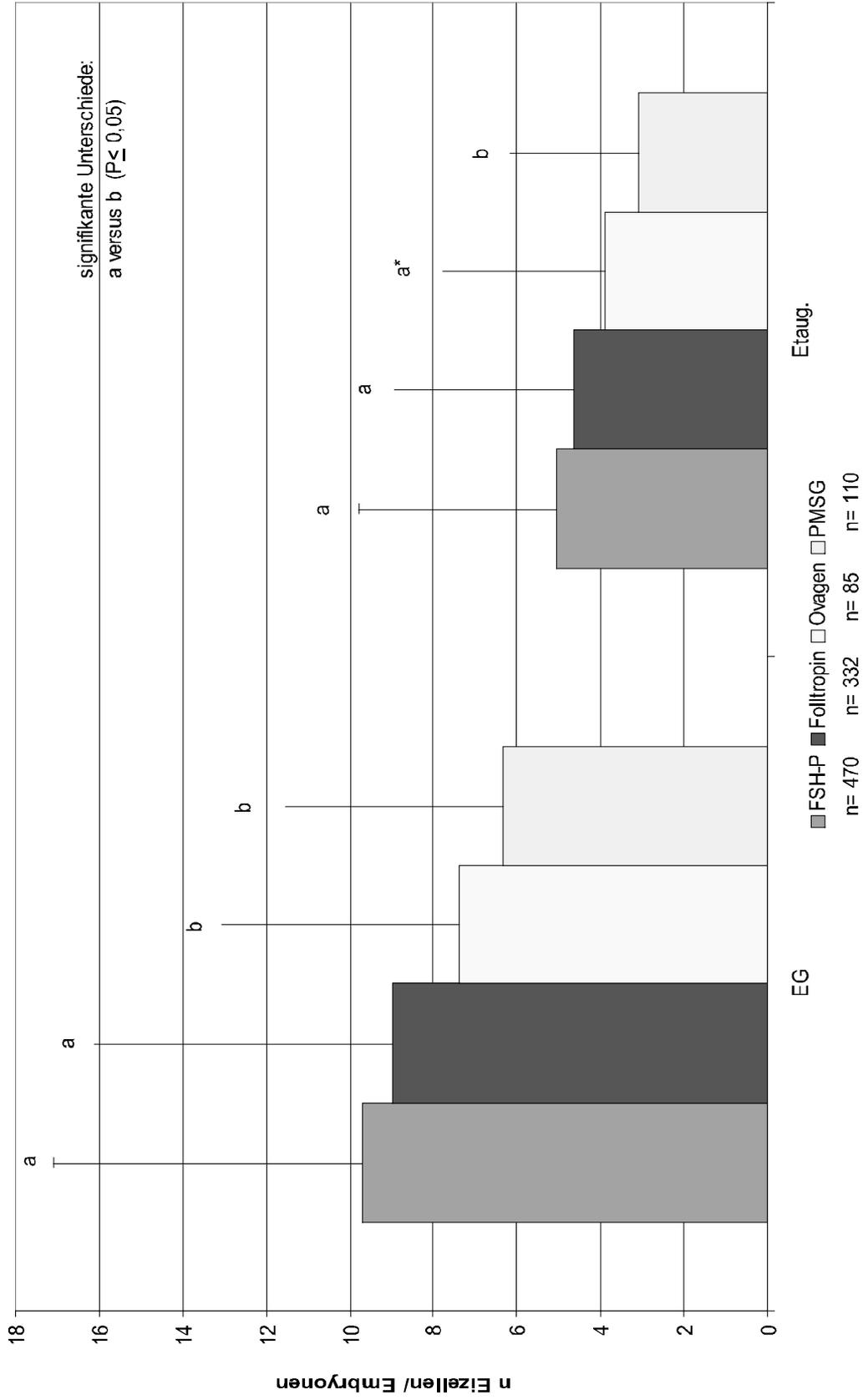
Die beiden Präparate erzielten, wie an den oben aufgeführten Mittelwerten ersichtlich, mehr taugliche Embryonen als das Hormon Ovagen®.

Diese Tatsache zeichnet sich anhand der Mittelwerte nur als Trend ab, sie ist statistisch nicht abgesichert. Abbildung 5 zeigt die verwendeten Gonadotropine im Vergleich hinsichtlich der Gesamtzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen und der Embryonenqualität.

Als Ergebnisse sind festzuhalten:

1. Es besteht ein signifikanter Einfluß des verwendeten Hormons auf die Merkmale Anzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen, Anzahl degenerierter Embryonen, Anzahl unbefruchteter Oozyten und Anzahl tauglicher Embryonen.
2. Der Einsatz der Hormone FSH-P® oder Folltropin-V® zur Superovulationsinduktion beim Spendertier lieferte signifikant mehr Eizellen/ Embryonen als der Einsatz von PMSG oder Ovagen®.
3. Der Einsatz von FSH-P® oder Folltropin-V® lieferte signifikant mehr taugliche Embryonen als vergleichsweise PMSG. Als Trend zu erkennen erzielten beide Präparate ebenfalls mehr taugliche Embryonen als Ovagen®.
4. In Bezug auf den Prozentsatz tauglicher Embryonen erwies sich Ovagen® den Präparaten FSH-P® und Folltropin-V® als gleichwertig.

Abbildung 5: Einfluß des Gonadotropins auf die Merkmale Anzahl gewonnene Eizellen/ Embryonen ( EG) und Anzahl taugliche Embryonen ( Etaug.)



## 4.2 BULLENEINFLÜSSE

### 4.2.1 BEEINFLUSSUNG DES GESCHLECHTS DER NACHKOMMEN DURCH DEN BULLEN

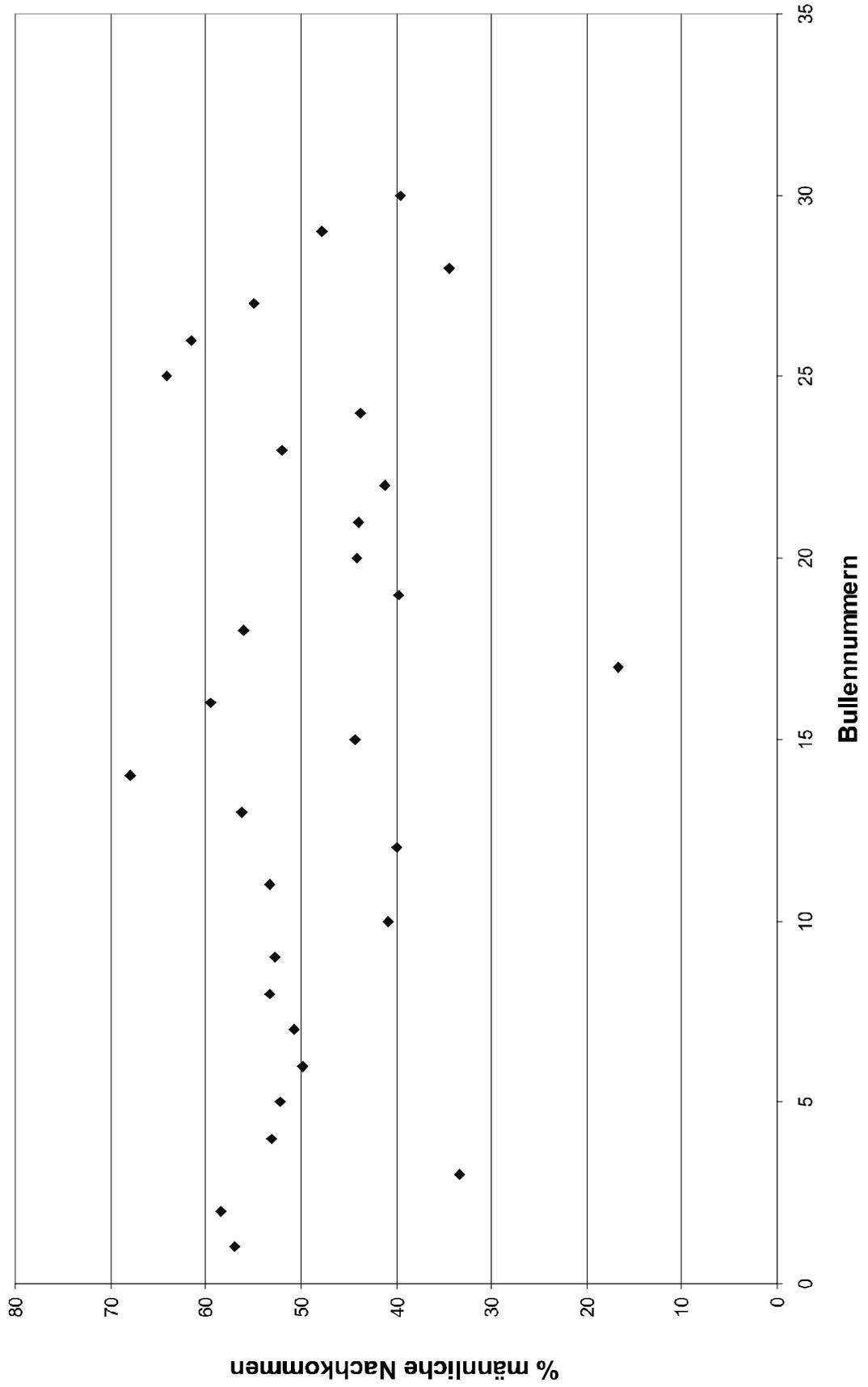
Bei der Fragestellung nach einer potentiellen paternalen Beeinflussung des Geschlechts der Nachkommen wurden die 538 Nachkommen der untersuchten Bullen ( $n=30$ ) in die Analyse einbezogen. Zunächst wurde mit dem Datenmaterial eine *Varianzanalyse* gerechnet, um festzustellen, inwiefern eine signifikante Beeinflussung des Geschlechts durch den Bullen vorliegt. Mit  $P = 0,662$  ergab sich jedoch kein statistisch gesicherter Einfluss der Gesamtpopulation der Bullen auf das Geschlechterverhältnis, hier als Prozent männliche Nachkommen berechnet. Die Daten waren annähernd normalverteilt mit einer Häufung um die 50%-Marke, so daß von einem Verhältnis von 1:1 der Geschlechter auszugehen war. Die Bullenpopulation in dieser Untersuchung beeinflusst dieses Verhältnis nicht.

In den angeschlossenen *Tukey*- und *t-Tests* traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bullen auf.

Es gab jedoch einzelne Bullen, die eine deutliche Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zu Gunsten der männlichen oder aber der weiblichen Nachkommen aufwiesen:

Bulle 14, 25 und 26 zeugten im Untersuchungszeitraum dieser Studie mehr als 60 Prozent männliche Nachkommen. Bulle 28 und 19 zeugten weniger als 40 Prozent männliche Nachkommen. Der Prozentsatz männlicher Nachkommen an der Gesamtzahl der gezeugten Kälber einzelner Bullen ist Abbildung 6 bzw. Tabelle 24 zu entnehmen.

Abbildung 3: Verteilung männlicher Nachkommen der einzelnen Bullen in Prozent



**Tabelle 24: Anzahl der Nachkommen und Anteil männlicher Kälber nach Embryotransfer in Bezug auf die analysierten Bullen (n= 30) im Beobachtungszeitraum**

BULLENNUMMER	MÄNNLICHE NACHKOMMEN	NACHKOMMENZAHL
	%	n
14	67,97	12
25	64,03	12
26	61,46	12
16	59,45	6
2	58,33	14
1	56,95	6
13	56,22	15
18	56,02	18
27	54,86	23
11	53,27	18
8	53,24	15
4	53,12	17
9	52,67	10
5	52,18	31
23	52,08	24
7	50,71	7
6	49,67	14
29	47,71	16
15	44,33	25
20	44,15	25
21	43,97	81
24	43,78	31
22	41,17	11
10	40,91	11
12	40,00	14
19	39,77	29
30	39,58	4
28	34,38	27
3	33,33	7
17	16,67	3
<b>Gesamt</b>	<b>50,35</b>	<b>538</b>

4.2.2 EINFLUß DES BESAMUNGSBULLEN AUF DIE EMBRYONENGEWINNUNG

Der Einfluß des Besamungsbullen auf den Erfolg der Embryonengewinnung im Rahmen des ET war Gegenstand dieser Untersuchung.

In die statistische Analyse fanden nur Bullen Eingang, die mehr als 20 mal während des Untersuchungszeitraumes im Besamungseinsatz für den ET waren. Es handelte sich dabei um 30 Bullen. Das Datenmaterial umfaßte 1294 Spülungen, da nur Doppelbesamungen mit demselben Bullen untersucht wurden, um einheitliche Bedingungen zu gewährleisten. Untersuchtes Merkmal war die Anzahl und der Prozentsatz tauglicher Embryonen. Der Vollständigkeit halber wurden auch die Merkmale EG, die Anzahl degenerierter Embryonen und unbefruchteter Oozyten in die Untersuchung einbezogen.

Die Bullen unterschieden sich zum Teil ganz erheblich voneinander.

In Tabelle 25 sind die im Zeitraum dieser Studie erreichten Mittelwerte der Gesamtpopulation der Bullen, die Standardabweichungen für die untersuchten Merkmale sowie der Prozentsatz tauglicher Embryonen aufgelistet. Für die einzelnen Bullen sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Prozentwerte den Tabelle 28, 29 und 31 zu entnehmen.

**Tabelle 25: Mittelwerte der untersuchten Merkmale in Abhängigkeit zur Bullenpopulation (n= 30)**

	EG		Edeg.		Ounb.		Etaug.		%taug.
$\xi \pm SD$	9,29	7,35	3,16	4,81	0,69	1,53	5,45	5,44	57,02
<b>Minimum /SD</b>	6,89	4,99	1,29	1,67	0,29	0,90	3,52	3,72	
<b>Maximum / SD</b>	14,81	9,33	5,67	6,01	2,00	3,57	9,00	7,59	

ξ: Mittelwert; SD: Standardabweichung; EG, Edeg., Ounb., %taug. Vergleiche Tabelle 7

Elf Bullen erzielten Mittelwerte von über zehn gewonnenen Eizellen/ Embryonen pro Spülung.

Vier Bullen erzielten Mittelwerte von unter acht gewonnenen Eizellen und Embryonen.

Bei dem Merkmal Anzahl degenerierter Embryonen erreichten 8 Bullen Mittelwerte von über vier, vier Bullen erreichten Mittelwerte von unter zwei degenerierten Embryonen pro Spülung. Acht Bullen wiesen im Mittel mehr als eine unbefruchtete Oozyte pro Spülung auf. Vier Bullen erreichten Mittelwerte von über sieben tauglichen Embryonen pro Spülung. Diese vier Bullen standen auch bei dem Merkmal Gesamtzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen an der Spitze der Bullenrangliste. Im Beobachtungszeitraum erreichten 14 Bullen mehr als 60 Prozent und 9 Bullen weniger als 50 Prozent taugliche Embryonen. Der höchste Prozentsatz tauglicher

Embryonen lag bei 72, 07% (Bulle 27), der niedrigste Wert bei 39,73% (Bulle 5).

Der Prozentsatz tauglicher Embryonen an der Gesamtzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen bei den einzelnen Bullen und ihre Rangfolge bei diesem Merkmal ist der Tabelle 28 zu entnehmen. Besonders festzuhalten ist die Tatsache, daß sich die Bullenrangliste zwischen den Merkmalen absolute Anzahl tauglicher Embryonen und dem Prozentsatz tauglicher Embryonen verschiebt, wie anhand der Tabellen 31 und 33 deutlich zu erkennen ist.

Die Ergebnisse wurden analysiert. Sie wurden mittels einer *Varianzanalyse* (ein- und mehrfaktoriell mit dem zusätzlichen Faktor „Besamungsform“) hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz untersucht.

Es ergaben sich deutliche Abhängigkeiten der untersuchten Merkmale von dem eingesetzten Besamungsbullen (Tabelle 26, 27).

**Tabelle 26: Einfluß des Besamungsbullen auf die Embryonengewinnung**

	<b>EG</b>	<b>Edeg.</b>	<b>Ounb.</b>	<b>Etaug.</b>
<b>Bulle</b>	<i>P= 0,145</i>	<i>P= 0,11</i>	<i>P= 0,0054</i>	<i>P= 0,041</i>

EG, Edeg., Ounb., Etaug. vergleiche Tabelle 7

**Tabelle 27: Einfluß des Besamungsbullen auf den Prozentsatz degenerierter Embryonen, unbefruchteter Oozyten und tauglicher Embryonen**

	<b>% degenerierte Embryonen</b>	<b>% taugliche Embryonen</b>	<b>% unbefruchtete Oozyten</b>
<b>Bulle</b>	<i>P= 0,0086</i>	<i>P= 0,0023</i>	<i>P= 0,0072</i>

In der *mehrfaktoriellen Varianzanalyse* übte der Faktor „Besamungsbulle“ einen gesicherten, biologischen Einfluß auf die Anzahl tauglicher Embryonen und unbefruchteter Oozyten aus. In der Analyse des Einflusses des Besamungsbullen auf den Prozentsatz tauglicher und degenerierter Embryonen sowie unbefruchteter Oozyten ergaben sich außerdem statistisch signifikante Werte für alle drei Merkmale ( $P \leq 0,05$ ). Das zwischen den Bullen hinsichtlich des Prozentsatzes tauglicher Embryonen große Unterschiede bestehen, ist schon aus der Tabelle 31 deutlich zu entnehmen.

Die Merkmale Gesamtzahl gewonnener Eizellen/Embryonen sowie Anzahl degenerierter Embryonen unterlagen in dieser Untersuchung keiner signifikanten Beeinflussung durch den Besamungsbullen.

Mittels des t-Tests wurden die Bullen untereinander auf signifikante Unterschiede bezüglich der Merkmale Prozentsatz degenerierter und tauglicher Embryonen sowie unbefruchteter Oozyten geprüft, wobei zwischen einigen Bullen signifikante Unterschiede auftraten.

Die Unterschiede bzw. die *P-Werte* sind den Tabellen 28-30 zu entnehmen.

**Tabelle 28: Signifikante Unterschiede in bezug auf das Merkmal Prozentsatz taugliche Embryonen (angegeben werden die *P- Werte*)**

Bulle	12	16	18	19	22	23	24	26	27	28	29	30
2	0,007		0,014			0,008			0,01		0,003	
3	0,021										0,041	
4	0,003		0,036				0,023		0,042		0,02	
6	0,005		0,005	0,03			0,003		0,005		0,003	
8		0,004										
10	0,026						0,028		0,037		0,016	
12		0,004			0,005	0,01		0,019				
14											0,049	
15		0,01										
16			0,003	0,02			0,002		0,003		0,002	
18					0,013			0,026		0,01		
23							0,003		0,004	0,01		
24								0,006		0,02		
25											0,007	
26									0,03		0,024	0,01

**Tabelle 29: Signifikante Unterschiede in bezug auf das Merkmal Prozent degenerierte Embryonen (angegeben sind die *P*-Werte)**

<b>Bullen</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>27</b>
3									0,02	0,02	
9	0,041								0,012	0,01	0,02
10	0,017			0,031					0,003	0,003	
12		0,02	0,021		0,014	0,004					
13											
16								0,04	0,038	0,049	
17						0,029					
18			0,05		0,039	0,011					
19						0,05					
20		0,02	0,015		0,012	0,003					0,04
21		0,02	0,012		0,012	0,003					
22	0,044					0,02	0,034		0,034	0,042	
23							0,028		0,023	0,022	
24						0,024					
27		0,04	0,038		0,027				0,027	0,02	
28						0,008			0,05		0,03
30	0,046						0,015		0,012	0,016	

**Tabelle 30: Signifikante Unterschiede in bezug auf das Merkmal Prozent unbefruchtete Oozyten (angegeben werden die *P*-Werte)**

Bullen- nummer	3	4	5	6	20	22	29
1				0,002			
2				0,0001			
3		0,033		0,0001			
4				0,005			
5				0,0001			
7				0,0001	0,03		0,032
8				0,004		0,01	
9				0,001		0,004	0,048
10				0,002		0,014	
11			0,034	0,0001		0,0056	
12				0,002		0,019	
13				0,0002			
14				0,0001		0,011	
15				0,03		0,001	0,023
16				0,035			
17				0,0007		0,018	
18				0,0001		0,004	0,011
19				0,0001		0,0026	0,038
20				0,01			
21				0,0001		0,01	
22	0,005	0,005	0,005				
23				0,001			
24				0,0001		0,001	0,02
25				0,007			
26				0,004			
27				0,001		0,008	
28				0,001			
29				0,03			
30				0,0003		0,013	

#### 4.2.3 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN NRR UND EMBRYONENGEWINNUNG

Es bestand die Frage, inwieweit die Ergebnisse der Embryogewinnung am Tag 7 post inseminationem mit den Non-Return-Raten des jeweiligen Bullen korrelieren.

Betrachtet wurden die Non-Return-Raten nach 56 (NRR 56 %) und 90 Tagen (NRR 90 %).

Der Erfolg bei der Embryonengewinnung wurde an der mittleren Eizell-/ Embryonengewinnungszahl und dem Mittel der Anzahl tauglicher Embryonen eines Besamungsbullen innerhalb des Untersuchungszeitraumes festgelegt.

Das Datenmaterial umfaßte 1294 Spülungen, aus denen jedoch nur die Spülungen der häufigsten Bullen analysiert wurden.

Als erfolgreiche Bullen im ET wurden diejenigen Vererber bezeichnet, die im Falle der Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen im Mittel mehr als 10 Eizellen/ Embryonen erzielten. Schlechte Ergebnisse waren Mittelwerte von unter 8 Eizellen/ Embryonen.

Erreichten die Bullen im Mittel mehr als 7 taugliche Embryonen bzw. einen Prozentsatz von über 60% tauglichen Embryonen, so galten sie in Bezug auf dieses Merkmal als erfolgreich – Im Gegensatz dazu galten Ergebnisse von weniger als 4 tauglichen bzw. weniger als 50% tauglichen Embryonen als schlecht.

In Tabelle 31 sind die Bullen gereiht nach dem Prozentsatz tauglicher Embryonen aufgelistet, unabhängig von der Gesamtzahl der gewonnenen Eizellen und Embryonen. Ergänzend sind in den Tabellen 32 und 33 die Bullen nach der absoluten Anzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen bzw. tauglicher Embryonen gereiht, da diese Bezugsgrößen im internationalen Schrifttum häufig verwandt werden.

**Tabelle 31: Aufstellung der Bullen mit dem Prozentsatz tauglicher Embryonen in absteigender Reihenfolge**

BULLE	% TAUGLICHE EMBRYONEN	NRR 56 %	NRR 90%
27	72,07	61,20	58,60
29	71,69	67,69	60,70
12	71,67	61,71	56,74
17	71,02	66,40	59,76
20	68,45	71,69	65,87
21	67,07	80,51	69,12
7	66,71	63,21	51,52
4	66,06	63,64	53,90
18	65,64	72,96	50,00
15	64,52	70,30	62,73
24	62,95	72,05	65,87
1	61,61	73,88	65,27
19	61,47	58,48	50,00
26	60,77	69,53	60,70
8	59,84	63,05	55,08
25	59,24	69,53	62,86
23	57,89	71,80	62,83
2	54,31	79,71	69,29
14	52,97	67,28	50,95
13	51,97	63,94	63,12
28	50,46	70,39	64,81
6	49,17	71,95	67,02
11	47,61	65,39	61,73
30	47,16	62,91	53,23
3	45,00	62,11	55,23
9	44,32	71,32	63,94
22	41,83	68,58	59,79
16	39,98	66,29	61,15
5	39,73	72,42	66,05
10	37,35	59,10	46,97

**Tabelle 32: Zusammenhang Zwischen der Gesamtzahl gewonnener Eizellen/  
Embryonen und der NRR**

BULLE	EG		ANZAHL DER SPÜLUNGEN	NRR56 %	NRR90 %
	ξ	SD			
26	14,81	9,33	15	69,53	62,86
20	12,14	10,57	29	71,69	65,87
4	12,11	6,97	18	63,64	53,90
30	11,60	5,93	19	62,91	53,23
14	11,44	6,58	18	67,28	50,95
8	11,33	7,79	18	63,05	55,08
23	10,57	8,82	38	71,80	62,83
17	10,56	7,65	11	66,40	59,76
1	10,55	7,77	20	73,88	65,27
9	10,38	7,17	20	71,32	63,94
25	10,23	4,74	18	64,92	55,56
22	9,94	8,90	18	68,58	59,79
24	9,69	6,35	52	72,05	65,87
11	9,62	5,54	27	65,39	61,73
16	9,23	6,46	19	66,29	61,15
3	9,00	6,59	22	62,11	55,23
21	8,99	8,14	77	80,51	69,12
10	8,89	6,81	17	59,10	46,97
13	8,87	9,72	23	63,94	63,12
5	8,86	8,34	44	72,42	66,05
28	8,68	7,59	35	70,39	64,81
19	8,59	7,79	39	58,48	50,00
27	8,52	5,71	36	61,20	58,60
2	8,47	4,67	19	79,71	69,29
12	8,12	6,81	17	61,71	56,74
15	8,09	7,03	39	70,03	62,73
6	7,87	8,05	21	71,95	67,02
18	7,48	6,10	85	72,96	67,37
7	6,91	5,16	23	63,21	51,52
29	6,89	4,99	19	67,69	60,70

ξ: Mittelwert, SD: Standardabweichung; EG: Anzahl gewonnene Eizellen und Embryonen

**Tabelle 33: Zusammenhang zwischen Embryonenqualität und NRR**

BULLE	E.TAUG.		TAUGLICHE EMBRYONEN %	NRR56 %	NRR90 %
	ξ	SD			
26	9,00	7,59	60,77	69,53	62,86
20	8,31	8,99	68,45	71,69	65,87
4	8,00	6,39	66,06	63,64	53,9
17	7,50	5,48	71,02	66,40	59,76
8	6,78	5,49	59,84	63,05	55,08
1	6,50	5,59	61,61	73,88	65,27
27	6,14	5,36	72,07	61,20	58,6
23	6,12	7,94	57,89	71,800	62,83
24	6,10	5,13	62,95	72,05	65,87
14	6,06	5,23	52,97	67,28	50,95
25	6,06	4,38	60,77	69,53	62,86
21	6,03	5,76	67,07	80,51	69,12
12	5,82	4,41	71,67	61,71	56,74
30	5,47	5,59	47,16	62,91	53,23
19	5,28	5,65	61,47	58,48	50,00
15	5,22	6,13	64,52	70,03	62,73
29	4,99	3,94	71,69	67,69	60,70
18	4,91	4,63	65,64	72,96	67,37
7	4,61	4,79	66,71	63,21	51,52
13	4,61	4,66	51,97	63,94	63,12
9	4,60	4,69	44,32	71,32	63,94
2	4,60	4,39	54,31	79,71	69,29
11	4,58	4,87	47,61	65,39	61,73
28	4,38	3,89	50,46	70,39	64,81
22	4,17	5,57	41,83	68,58	59,79
3	4,05	3,94	66,06	62,11	55,23
6	3,87	4,24	49,17	71,95	67,02
16	3,69	3,68	39,98	66,29	61,15
5	3,52	3,72	39,73	72,42	66,05
10	3,32	3,97	37,35	59,10	46,97

ξ: Mittelwert, , SD: Standardabweichung , E.taug.: Anzahl tauglicher Embryonen

In der *Rangkorrelation nach Spearman* konnte keine Korrelation zwischen der Embryongewinnungszahl und den NRR der einzelnen Bullen nachgewiesen werden. Es bestand auch keine Korrelation zwischen den NRR und der Anzahl tauglicher Embryonen bzw. dem Prozentsatz tauglicher Embryonen an der Gesamtzahl gewonnener Embryonen. Die Korrelationskoeffizienten sind der Tabelle 34 zu entnehmen.

**Tabelle 34: Rangkorrelationskoeffizienten für NRR 56% und NRR 90% bezüglich EG, Etaug. und % taug. Embryonen**

	<b>NRR 56 Tage %</b>	<b>NRR 90 Tage %</b>
<b>EG</b>	v= 0,02	v= 0,02
<b>Etaug</b>	v= 0,06	v= - 0,28
<b>% taugliche Embryonen</b>	v= - 0,004	v= - 0,36

v: Korrelationskoeffizient, EG und Etaug. vergleiche Tabelle 7

### 4.3 EINFLUß DER BESAMUNGSFORM

In der Untersuchungsperiode wurden drei verschiedene Besamungsformen bei den superovulierten Tieren auf der Station angewandt:

1. Eine Besamung mit nur einem Bullen; n= 21
2. Zwei Besamungen mit dem selben Bullen; n= 1294
3. Zwei Besamungen mit zwei verschiedenen Bullen; n= 276

Es sollte festgestellt werden, inwiefern die Form der Besamung eine Auswirkung auf den Erfolg der Spülungen 7 Tage post inseminationem hat. Das vorliegende Datenmaterial wurde nach den drei verschiedenen Besamungstypen in drei Gruppen aufgeteilt. Die untersuchten Merkmale waren der Prozentsatz degenerierter und tauglicher Embryonen sowie der Prozentsatz unbefruchteter Oozyten. Ergänzend wurden die Merkmale Gesamtzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen, die Anzahl degenerierter bzw. tauglicher Embryonen sowie unbefruchteter Oozyten. Auf die drei Besamungsformen entfielen für Typ 1: 186 Eizellen/ Embryonen, davon 64 degeneriert, 14 unbefruchtet und 108 tauglich. Bei Typ 2 bzw. 3 traten folgende Gesamtsummen auf: EG: 11762 bzw. 2513, Edeg.: 3894 bzw. 805, Ounb.: 867 bzw. 179 und für Etaug.: 7001 bzw. 1529. Im Mittel wurden bei den verschiedenen Formen der Besamung im Beobachtungszeitraum dieser Studie folgende Werte erreicht (Tabellen 35, 36).

**Tabelle 35: Mittelwerte der Merkmale EG und Embryonenqualität in Abhängigkeit vom Besamungsschema**

	n	EG		Edeg.		Ounb.		Etag.		%taug
		ξ	SD	ξ	SD	ξ	SD	ξ	SD	
<b>Typ 1</b>	21	8,86	5,31	3,04	2,47	0,67	1,19	5,09	4,27	57,45
<b>Typ 2</b>	1294	9,07	7,12	2,99	4,63	0,68	1,53	5,41	5,25	59,65
<b>Typ 3</b>	276	9,11	6,07	2,91	3,99	0,65	1,69	5,54	4,41	60,81

ξ: Mittelwert, SD: Standardabweichung, %taug., EG, Edeg., Ounb., Etag. laut Tabelle 7

**Tabelle 36: Prozentraten degenerierter Embryonen, unbefruchteter Oozyten und tauglicher Embryonen an EG**

Besamtyp	EG	%deg.	%unb.	%taug.
<b>Typ 1</b>	8,83	34,31	7,56	57,45
<b>Typ 2</b>	9,09	32,97	7,49	59,65
<b>Typ 3</b>	9,11	31,94	7,13	60,81

%deg: Prozent degenerierte Embryonen; %unb: Prozent unbefruchteter Oozyten; %taug: Prozent taugliche Embryonen, EG: Gesamtzahl Eizellen/ Embryonen

In der angeschlossenen *Mehrfachvarianzanalyse*, in der als Faktoren die Besamungsform (3 Stufen) und der eingesetzte Bulle (30 Stufen) gerechnet wurden, traten in Bezug auf die untersuchten Merkmale keine gesicherten, signifikanten Einflüsse hinsichtlich der Besamungsform auf. Die errechneten *P-Werte* waren alle größer als der kritische Wert von  $P=0,05$  (Tabellen 37-40).

Als Trend ist an den Mittelwerten sowie dem Prozentsatz tauglicher Embryonen eine Verbesserung bei den Doppelbesamungen zu erkennen. Das beste Ergebnis erzielte man bei der Doppelbesamung mit zwei verschiedenen Bullen. Das gilt auch für die Anzahl gewonnener Eizellen und Embryonen. Leichte Verbesserungen sind in der gleichen Richtung auch bei dem Prozentsatz degenerierter Embryonen und unbefruchteter Oozyten zu erkennen. Vor allem anhand der Prozentzahlen aus Tabelle 36 ist der Trend zu verbesserten Ergebnissen zu erkennen. Abbildung 7 zeigt die Resultate der Embryonengewinnung in Abhängigkeit vom Besamungsschema.

Tabelle 37: Anzahl gewonnener Eizellen/Embryonen in bezug zum Besamungstyp

	Typ 1	Typ 2	Typ 3
Typ1		$P= 0,77$	$P= 0,88$
Typ2			$P= 0,82$

Tabelle 38: Prozent degenerierter Embryonen in bezug zum Besamungstyp

	Typ1	Typ2	Typ3
Typ 1		$P= 0,24$	$P= 0,55$
Typ 2			$P= 0,36$

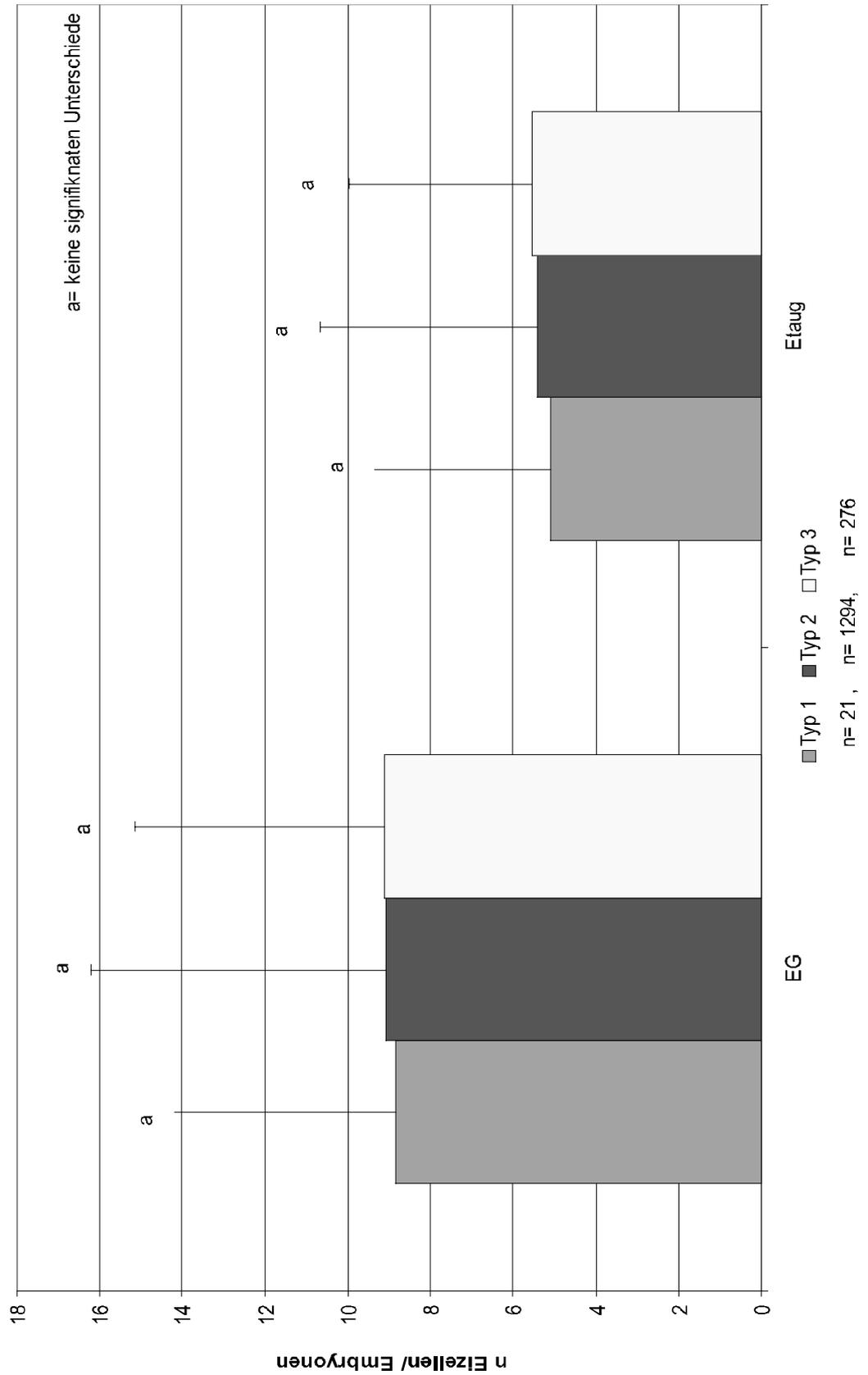
Tabelle 39: Prozent unbefruchteter Oozyten in bezug zum Besamungstyp

	Typ 1	Typ 2	Typ 3
Typ 1		$P= 0,62$	$P= 0,73$
Typ 2			$P= 0,64$

Tabelle 40: Prozent tauglicher Embryonen in bezug zum Besamungstyp

	Typ 1	Typ 2	Typ 3
Typ 1		$P= 0,55$	$P= 0,39$
Typ 2			$P= 0,32$

Abbildung 7: Einfluß des Besamungstyps auf die Merkmale Anzahl gewonnene Eizellen/ Embryonen (EG) und Anzahl taugliche Embryonen ( Etaug.)



#### 4.3.1 GIBT ES BEI DOPPELBESAMUNGEN EINE REGELMÄßIGKEIT, MIT DER SICH EINE BESAMUNG DURCHSETZT ?

Um zu analysieren, ob sich bei den Doppelbesamungen mit zwei Bullen die zeitlich frühere oder spätere Besamung durchsetzte, wurden bei den Besamungen mit zwei verschiedenen Bullen anhand der in der Zentraldatei der RPN-Verden erfaßten ET-Kälber die Nachkommen der aus den zu Besamung und folgender Spülung gehörenden Embryotransfers auf ihren genetischen Vater hin überprüft.

Aus den ET- Protokollen der Station wurde entnommen, welcher Bulle in der ersten und zweiten Besamung eingesetzt wurde. Im Vergleich der Besamungen mit den Nachkommen ließ sich erkennen, welcher Bulle, d.h. welche Besamung sich im jeweiligen Fall letztendlich durchgesetzt hatte.

Bei 162 Doppelbesamungen innerhalb des Untersuchungszeitraumes war dieser Vergleich möglich. Doppelbesamungen, aus deren zugehörigen Spülungen und Transfers noch keine Nachkommen in der Zentraldatei erfaßt waren (z.B. aufgrund einer Kyrokonservierung der Embryonen oder aber aus Transfers in 1999, bei denen noch keine Nachkommen geboren sind), konnten in der Untersuchung nicht verwendet werden.

Der Prozentsatz, mit dem sich die Besamungen in bezug zur Gesamtzahl der Doppelbesamungen durchsetzten, ist Tabelle 41 zu entnehmen.

**Tabelle 41: Durchgesetzter Anteil der frühen oder späten Besamung an den Doppelbesamungen**

<b>Doppelbesamung</b>	<b>n</b>	<b>%durchgesetzte Besamung</b>
<b>Gesamtzahl</b>	162	100
<b>Frühe Besamung</b>	75	46,29
<b>Späte Besamung</b>	66	40,71
<b>Unentschieden</b>	21	13

Zu 46,29 % setzte sich die zeitlich frühere Besamung durch, zu 40,71 % die zeitlich spätere.

Eine Aussage über die statistische Signifikanz dieses Ergebnisses wurde mittels des  $\chi^2$ - Tests getroffen.

Grundsätzlich ist bei den Besamungen von einer Verteilung von 1:1 hinsichtlich ihrer Durchsetzung auszugehen.

$\chi^2$ - Test:

- Hypothese : 75 : 66 stammt aus 1:1
- Gefundenes Verhältnis: 75 : 66
- Erwartetes Verhältnis bei 141 Besamungen: 70,5 : 70,5
- Gefunden – Erwartet: 4,5 - -4,5
- (Gefunden – Erwartet)<sup>2</sup>: 20,5 - 20,5
- $$Chi^2 = 2 \cdot \frac{(Gefunden - Erwartet)^2}{Erwartet} = 2 \cdot 0,29 = 0,58$$

Ein Wert von 0,58 gilt als statistisch nicht signifikant.

Es besteht folglich bei den dieser Rechnung zu Grunde liegenden Doppelbesamungen keine gesicherte Regelmäßigkeit, mit der sich eine der beiden Besamungen gegen die andere durchsetzte.

#### 4.4 SAISONALE EINFLÜSSE

Um die Ergebnisse der Embryonengewinnung auf der Station Georgsheil hinsichtlich einer saisonalen Beeinflussung zu untersuchen, wurden die Spülungen nach Monaten über die Jahre sortiert und anschließend statistisch analysiert.

Die untersuchten Merkmale waren die Gesamtzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen, die Anzahl degenerierter und unbefruchteter Eizellen sowie die Zahl transfertauglicher Embryonen.

Im Mittel lagen die Werte für die einzelnen Merkmale wie in Tabelle 42 ersichtlich.

**Tabelle 42: Monatsmittelwerte von EG, Edeg.; Ounb. ,Etaug. sowie% taug. über die Beobachtungsjahre sowie schlechtester und bester Monat.**

Monate	EG		Edeg.		Ounb.		Etaug.		%taug
	ξ	SD	ξ	SD	ξ	SD	ξ	SD	
ξ± SD	8,84	0,55	3,25	0,45	0,66	0,11	4,93	0,48	55,77
Minimum/ SD	8,3 (Januar)	0,55	2,63 (Sept.)	0,51	0,47 (Aug.)	0,19	4,29 (Juli)	0,62	51,69
Maximum/ SD	9,9 (März)	0,62	4,19 (Nov.)	0,22	0,87 (Dez.)	0,11	5,87 März	0,33	59,29

ξ: Mittelwert, SD: Standardabweichung; %taug., EG, Edeg., Ounb., Etaug.: siehe Tabelle 7

Die besten Ergebnisse hinsichtlich der Merkmale Anzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen und transfertauglicher Embryonen waren im Monat März zu verzeichnen. Die Monatsmittelwerte differierten insgesamt nicht weit voneinander, wie an den Minima und Maxima zu erkennen ist. Dennoch wurde eine Varianzanalyse angeschlossen, um einen potentiellen saisonalen Einfluß auf die Merkmale EG, Edeg., Ounb. und Etaug. zu überprüfen.

Die Varianzanalyse ergab jedoch keine signifikanten Einflüsse der Saison auf die untersuchten Merkmale ( $P \geq 0,05$ ). Die  $P$ -Werte sind Tabelle 43 zu entnehmen.

**Tabelle 43: Einfluß der Saison auf die Merkmale EG, Edeg.; Ounb., Etaug.**

	EG	Edeg.	Ounb.	Etaug.
Saison (Monate)	$P= 0,362$	$P= 0,203$	$P= 0,564$	$P= 0,074$

EG, Edeg., Ounb., Etaug. : siehe Tabelle 7

Das bedeutet, daß es keinen statistisch gesicherten, biologischen Einfluß der Saison (hier als die Monate eines Jahres aufgeschlüsselt) auf die untersuchten Merkmale dieser Studie gibt.

Die Spülergebnisse in der Station Georgsheil unterlagen zusammenfassend im Untersuchungszeitraum dieser Arbeit keiner saisonalen Beeinflussung.

#### 4.5 EMBRYONENGEWINNUNG ÜBER DIE JAHRE 1991-1999

Das vorliegende Datenmaterial umfaßt Embryogewinnungen auf der Station Georgsheil über einen Zeitraum von achteinhalb Jahren. Es galt zu analysieren, wie sich die untersuchten Merkmale EG, Edeg., Ounb., Etaug. sowie % taugliche Embryonen über die Jahre gesehen verhielten und ob es Tendenzen zu besseren oder schlechteren Ergebnissen im Bereich des ET auf der Station gab.

Die erreichten Mittelwerte sind der Tabelle 44 zu entnehmen.

**Tabelle 44: Mittelwerte von EG, Edeg., Ounb., Etaug. und %taugliche Embryonen der Jahre 1991-1999**

	EG		Edeg.		Ounb.		Etaug.		%taug
	ξ	SD	ξ	SD	ξ	SD	ξ	SD	
<b>1991</b>	9,3	6,56	4,04	5,24	1,0	1,9	4,15	4,46	44,62
<b>1992</b>	9,14	7,13	3,26	5,21	0,95	1,81	4,91	4,48	53,71
<b>1993</b>	9,17	7,03	3,4	5,5	0,82	1,5	4,94	4,56	53,87
<b>1994</b>	8,48	8,6	3,53	9,5	0,61	1,8	4,44	4,39	52,36
<b>1995</b>	8,69	7,6	3,55	6,2	0,72	1,66	4,4	4,72	50,63
<b>1996</b>	8,6	7,48	3,44	4,68	0,72	1,66	4,4	4,72	51,16
<b>1997</b>	8,48	6,4	2,67	4,13	0,44	1,56	5,5	5,7	64,86
<b>1998</b>	8,22	5,85	2,69	4,04	0,51	1,58	5,0	4,34	60,83
<b>1999</b>	8,24	6,3	3,17	4,18	0,32	1,35	4,72	4,054	49,15

ξ: Mittelwert, SD: Standardabweichung; %taug., EG, Edeg., Ounb., Etaug.: vergleiche Tabelle 7

Bei dem Vergleich der einzelnen Jahre in bezug auf diese vier Merkmale lassen sich folgende Trends erkennen:

1. Die Anzahl gewonnener Eizellen/Embryonen lag in den Jahren 1998 und 1999 unter den Ergebnissen der Vorjahre. Hier zeichnet sich ein Trend zu schlechteren Ergebnissen ab.
2. Die Anzahl degenerierter Embryonen pro Spülung hat sich innerhalb der achteinhalb Jahre leicht verringert
3. Die Anzahl unbefruchteter Oozyten hat sich über die Jahre deutlich verringert.
4. Die Anzahl transfertauglicher Embryonen ist in den Jahren 1997 und 1998 am höchsten gewesen , was sich auch im Prozentsatz tauglicher Embryonen dieser Jahre widerspiegelt.

In der *Varianzanalyse* wies jedoch der Faktor „Jahr“ lediglich bei dem Merkmal Ounb. einen gesicherten statistischen Einfluß auf. Die *P*-Werte sind der Tabelle 45 zu entnehmen.

**Tabelle 45: Die Merkmale EG, Edeg., Ounb. und Etaug. in Abhängigkeit der Jahre**

	<b>EG</b>	<b>Edeg.</b>	<b>Ounb.</b>	<b>Etaug.</b>
<b>Jahr</b>	<i>P</i> = 0,26	<i>P</i> = 0,12	<i>P</i> = 0,0009	<i>P</i> = 0,108

EG, Edeg., Ounb., Etaug.: vergleiche Tabelle 7

Bei dem Merkmal Ounb. lieferte auch der *Tukey-Test* signifikante Unterschiede zwischen den betrachteten Jahren 1991-93 zu 1994-96 zu 1997-99. Die Anzahl unbefruchteter Oozyten geht in diesen drei Etappen deutlich zurück und die Ergebnisse bei diesem Merkmal verbessern sich signifikant.

Bei den drei anderen betrachteten Merkmalen konnte kein signifikanter Einfluß des Faktors „Jahr“ nachgewiesen werden. Die dargestellten Trends bleiben bestehen, sie sind jedoch nicht statistisch abgesichert.

#### **4.7. EINFLUß DES BETRIEBES**

Die Spenderkühe werden im Rahmen des ET-Programmes der VOST-Georgsheil in ihren Herkunftsbetrieben nach tierärztlicher Untersuchung der hormonellen Superovulationsinduktion unterzogen. Sie werden auch auf den Herkunftsbetrieben besamt. Die Spülung am Tag 7 p.i. erfolgt dann auf der Station. Der Einfluß des Faktors „Herkunftsbetrieb“, der gegebenermaßen multifaktoriell ist (genetische Zusammensetzung der Herde, Betriebsmanagement etc.), auf den Erfolg der Spülergebnisse war ebenfalls Gegenstand dieser Untersuchung.

In die Analyse fanden die 29 Betriebe Eingang, in denen im Untersuchungszeitraum mehr als 20 Spülungen zu verzeichnen waren.

Die anderen wurden nicht berücksichtigt.

Die in Bezug auf die vier untersuchten Merkmale erreichten Mittelwerte unterschieden sich in den einzelnen Betrieben ganz erheblich. Die erzielten Mittelwerte, Minimum und Maximum sind der Tabelle 46 zu entnehmen.

**Tabelle 46: Mittelwerte; Minimum und Maximum der untersuchten Merkmale im Beobachtungszeitraum auf den Betrieben**

	<b>EG</b>	<b>Edeg.</b>	<b>Ounb.</b>	<b>E.taug.</b>	<b>%taug</b>
$\xi$ /SD	8,86.± 1,95	3,16.±1,12	0,66 ± 0,26	4,99 ± 1,291	56,32
<b>Minimum/SD</b>	5,05 ± 4,36	0,9 ± 4,42	0,27 ± 0,77	2,78 ± 2,93	55,05
<b>Maximum/SD</b>	13,26 ± 7,2	6,69 ± 6,97	1,43 ± 2,33	8,22 ± 6,23	61,99

$\xi$ : Mittelwert, SD: Standardabweichung; %taug., EG, Edeg., Ounb., Etaug.: vergleiche Tabelle 7

In fünf Betrieben wurden im Mittel mehr als 11 Eizellen/ Embryonen, in sechs Betrieben weniger als 7 pro Spülung erzielt.

In fünf Betrieben kamen im Schnitt mehr als 4 degenerierte Embryonen vor. Bei dem Merkmal Anzahl unbefruchteter Oozyten waren unter den vier schlechtesten Betrieben mit einem Mittelwert von größer als 1 zwei Betriebe die auch schon bei der Anzahl degenerierter Embryonen am schlechtesten abgeschnitten hatten.

Drei der besten Betriebe bezüglich des Merkmals Anzahl tauglicher Embryonen lagen auch bei der Gesamtzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen an der Spitze der Herkunftsbetriebe. In fünf Betrieben lag der Mittelwert unter vier tauglichen Embryonen. Alle diese Betriebe lagen auch bei der EG im Betriebsvergleich auf den unteren Rängen. In der angeschlossenen *Varianzanalyse* (zunächst ein- dann mehrfaktoriell mit den Faktoren „Hormon“ und „Kalbezahl“) ergaben sich für den Faktor „Betrieb“ ein signifikanter ( $P < 0,05$ ) bzw. hochsignifikanter ( $P < 0,001$ ) Einfluß auf die folgenden Merkmale (Tabelle 47).

**Tabelle 47: Einfluß des Betriebes auf die Merkmale EG, Edeg., Ounb. und Etaug.**

	<b>EG</b>	<b>Edeg.</b>	<b>Ounb.</b>	<b>Etaug.</b>
<b>Betrieb</b>	$P = 0,001$	$P = 0,0127$	$P = 0,601$	$P = 0,001$

EG, Edeg., Ounb. und Etaug. siehe Tabelle 7

Die Betriebe dieser Studie unterscheiden sich zusammenfassend ganz erheblich in Bezug auf die betrachteten Merkmale, die erreichten Mittelwerte im Untersuchungszeitraum differieren weit. Der Einflußfaktor „Herkunftsbetrieb“ ist von ganz entscheidender Bedeutung für den Erfolg oder Mißerfolg der Spülergebnisse nach der Superovulation. Er besitzt einen hochsignifikanten, statistisch gesicherten Einfluß auf die Merkmale Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen sowie auf die Anzahl tauglicher Embryonen.

## 5 DISKUSSION

Die Superovulation stellt zur Zeit noch den limitierenden Faktor im Embryotransfer dar, zeichnet sie sich doch durch eine erhebliche individuelle Variabilität der Ovarreaktion, unbefriedigende Befruchtungsergebnisse und zum Teil erhebliche Degenerationsraten der Embryonen aus (NIEMANN 1986). Zahlreiche wissenschaftliche Bemühungen in Vergangenheit und Gegenwart hatten zum Ziel, die Ursachen für diese hohe Variabilität der Ergebnisse zu erforschen, um die Superovulationserfolge dann verbessern und stabilisieren zu können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung potentieller Einflußfaktoren auf den Erfolg einer Superovulationsbehandlung im kommerziellen Embryotransfer zu untersuchen. Auf der Embryotransferstation Georgsheil des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter wurden im Beobachtungszeitraum von Mai 1991- April 1999 Uterusspülungen zur Embryonengewinnung nach einer Superovulationsbehandlung vorgenommen und protokolliert. Das umfangreiche Datenmaterial aus 1934 Embryotransferprotokollen der ET-Station liegt dieser Arbeit zu Grunde. Die Qualitätsbeurteilung der Embryonen erfolgte gemäß IETS-Standard. Als durch die untersuchten Faktoren potentiell beeinflusste Merkmale galten die Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen, die Anzahl unbefruchteter Oozyten, die Anzahl degenerierter und schließlich die Anzahl bzw. der Prozentsatz transfertauglicher Embryonen. An diesen Merkmalen wurde der Erfolg der Superovulation gemessen.

Untersuchte, potentiell erfolgsbeeinflussende Faktoren in dieser Arbeit waren:

Der Bulle, das Alter der Donorkuh, die Anzahl von Superovulationen in der Laktation, die Rastzeit, der Herkunftsbetrieb der Donorkuh sowie die Saison, das Jahr und das verwendete Gonadotropin.

Im Falle des verwendeten Gonadotropins wurde in dieser Arbeit vor allem auch die Eignung von ovinem FSH (Ovagen®) zur Superovulationsinduktion beim Rind analysiert. Zu diesem Zwecke wurde oFSH mit den üblicherweise beim Rind eingesetzten Präparaten FSH-P®, Folltropin® und PMSG (Intergonan®) verglichen.

Weiterhin wurde der Einfluß verschiedener Besamungsformen auf die Ergebnisse nach Superovulation untersucht. Speziell wurde die Eignung einer Doppelbesamung mit zwei verschiedenen Bullen zur Verbesserung der Rate transfertauglicher im Rahmen eines kommerziellen ET- Programmes überprüft.

Zusätzlich wurden eine mögliche Korrelation zwischen der im KB-Einsatz ermittelten NRR eines Bullen und seiner Fruchtbarkeit im ET-Programm analysiert. Eine mögliche paternale Beeinflussung des Geschlechts der Nachkommen war ebenfalls Gegenstand der Untersuchung.

## 5.1 EINFLUß DER DONORKUH

Der Einfluß der Donorkuh auf die Superovulationsergebnisse ist bedeutend, zeichnet sich doch die Fruchtbarkeitsleistung und Ansprechbarkeit auf eine Superovulationsbehandlung durch eine sehr hohe Variabilität der Ovarreaktion bei verschiedenen Tieren aus (NIEMANN und MEINECKE 1993).

Als mögliche Einflußfaktoren seitens der Donorkuh auf die Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen sowie die Embryonenqualität wurden in dieser Arbeit das Alter, die Anzahl von Superovulationen innerhalb einer Laktation und die Zeitspanne zwischen letzter Abkalbung und dem Beginn der Superovulationsinduktion (Rastzeit) untersucht.

Dabei stellte sich heraus, daß die Rastzeit (durchschnittliche Dauer:  $249 \pm 110,90$  Tage) in dieser Studie keinen Einfluß auf die untersuchten Merkmale ausübte.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen von KWEON et al. (1986). HASLER et al. (1983) dagegen ermittelten zumindest für das Merkmal % befruchtete Oozyten bei einer Rastzeit von 151- 300 Tagen signifikant bessere Ergebnisse als zu anderen Zeitpunkten, die Gesamtzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen wurde von der Rastzeit nicht beeinflusst.

Dagegen war in Studien von HAUPT (1979) und DARROW et al. (1982) bei einer Superovulationsbehandlung vor dem 100. Laktationstag die Anzahl gewonnener Embryonen tendenziell höher. HOEKSTRA (1989) kam in einer Untersuchung bei Hochleistungskühen zu der Erkenntnis, daß die Superovulationserfolge zwischen 50 – 70 Tage p.p. gut waren, sich zwischen 90 – 110 Tage p.p. verschlechterten, um sich dann wieder zu verbessern.

Die Anzahl der Gelbkörper nach einer Superovulationsbehandlung in Abhängigkeit von der Rastzeit wurde in der eigenen Arbeit nicht untersucht. PREISINGER et al. (1992) ermittelten diesbezüglich tendenziell bessere Ergebnisse vor dem 100. Laktationstag. Auch KRUIP et al. (1995) berichteten von einer Zeitspanne reduzierter Ansprechbarkeit bei Holstein-Frisian auf eine Superovulationsbehandlung um den 100. Laktationstag.

Anhand der eigenen Ergebnisse lassen sich solche Tendenzen nicht bestätigen, zumal es sich um eine Feldstudie handelt, bei der die einzelnen Zeiträume nicht gleich häufig und damit auch nicht gleichberechtigt waren. Eine Aussage über eine Zeitspanne besonders guter Ergebnisse wäre in Anlehnung an diese Ergebnisse nicht haltbar.

Die Kühe der vorliegenden Arbeit wurden in die drei Altersklassen Rinder (keine Abkalbung), Färsen (eine Abkalbung) und Kühe (zwei und mehr Abkalbungen) eingeteilt.

Die Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen ( $P= 0,0001$ ) und die Qualität der Embryonen (Anzahl degenerierter Embryonen:  $P= 0,0001$ ;

Anzahl transfertauglicher Embryonen:  $P= 0,018$ ) unterlagen einer signifikanten Beeinflussung durch das Alter der Spenderkuh.

Dabei verbesserten sich im Mittel die Ergebnisse mit steigendem Alter der Tiere (Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen:  $6,54 \pm 5,28$ ;  $7,67 \pm 6,31$ ;  $9,44 \pm 7,22$  und Anzahl transfertauglicher Embryonen:  $3,91 \pm 4,07$ ;  $4,69 \pm 4,63$ ;  $5,77 \pm 4,96$ ). Auch der Prozentsatz tauglicher Embryonen verbesserte sich in dieser Reihenfolge. Der Anteil degenerierter Embryonen an der Gesamtzahl der gewonnenen Embryonen war jedoch in der Altersklasse „Kühe“ am höchsten.

Der Einfluß des Alters auf die Gesamtzahl gewonnener Embryonen und die Embryonenqualität wurde auch von GUSTAFFSON und JANSON (1992) untersucht. Bei den Tieren handelte es sich um Färsen im Alter von 12-32 Monaten. Sowohl die Gesamtzahl gewonnener Embryonen als auch die Embryonenqualität waren bei den älteren Tieren signifikant besser. In anderen Studien erzielten Kühe im Alter von 3-10 Jahren deutlich bessere Ergebnisse als Tiere >10 Jahre (HASLER 1983, 1987). Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von DONALDSON (1984), der bei Kühen bis zu einem Alter von 10 Jahren konstante Resultate, bei Kühen >10 Jahren jedoch eine zunehmend verschlechterte Embryonenqualität bei gleichbleibenden Gewinnungszahlen beobachtete. Tiere diesen Alters sind in der eigenen Arbeit auf Grund mangelnder Häufigkeit nicht berücksichtigt worden, so daß keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob und ab welcher höheren Altersklasse eine Verschlechterung der Superovulationsergebnisse auftrat. Die Primordialfollikel sind in ihrer Gesamtzahl bereits vor der Geburt festgelegt und vermindern sich mit jedem Zyklus kontinuierlich. Nach GORDON (1996) gibt es keinen Grund zu der Annahme, daß in der reproduktionsfähigen Phase der Kuh mit zunehmendem Alter die Superovulationsantwort der Ovarien zurückgeht, solange noch genügend stimulierbare Follikel vorhanden sind. Möglicherweise ist jedoch eine Verschlechterung der Ansprechbarkeit der Ovarien auf die Superovulationsinduktion eher darin zu sehen, daß mit zunehmendem Alter häufiger Reproduktionsstörungen auftreten, die im unstimulierten Zyklus evtl. gar nicht auffallen (DESAULNIERS et al. 1995).

LERNER et al. (1986) ermittelten in ihrer Studie an 339 Holstein-Friesian Kühen ein Optimum der Merkmale Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen sowie der Embryonenqualität mit 5,6 Jahren. Auch ISOGAI et al. (1993) erzielten bei 4-5 jährigen Kühen die besten Superovulationsresultate. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da in der Altersklasse „Kühe“ diese Tiere vertreten sind. Die eigenen Ergebnisse könnten auch eine eher tierzüchterische Ursache haben. So wird mit zunehmender Kalbezahl auch indirekt eine verschärfte Selektion auf Fruchtbarkeit betrieben. Werden Rinder noch relativ unselektiert eingesetzt, so werden mit zunehmender Kalbezahl von den Landwirten nur noch die

Tiere vorgestellt, die bereits eine gute Fruchtbarkeitsleistung aufweisen - und je höher die Kalbezahl, desto weniger werden Tiere mit Fruchtbarkeitsproblemen vertreten sein. Die Selektionsschärfe nimmt folglich zu.

Als letzter potentieller Einflußfaktor seitens der Donorkuh wurde die Anzahl von Superovulationen innerhalb einer Laktation analysiert.

Im internationalen Schriftum sind konträre Resultate nach wiederholten Superovulationen beschrieben worden. Während SACHER et al. (1987) oder CHAUAN et al. (1994) annähernd konstante Ergebnisse und OIKAWA (1998) nur eine leichte Verschlechterung derselben beobachteten, ermittelten andere Autoren deutliche Verringerungen nach drei (WARFIELD et al. 1986) bzw. fünf Superovulationen (HASLER et al. 1983).

Bei der Analyse des dieser Arbeit zu Grunde liegenden Datenmaterials stellte sich eine zunehmende, signifikante Verschlechterung der Embryonenqualität mit steigender Superovulationsanzahl / Laktation heraus (erste Superovulation: Edeg:  $3,35 \pm 4,6$ ; Ounb:  $0,49 \pm 1,68$ ; Etaug:  $4,99 \pm 4,72$ ; zwei Superovulationen: Edeg:  $3,81 \pm 4,99$ ; Ounb:  $0,53 \pm 1,28$ ; Etaug:  $4,53 \pm 4,96$ ; drei und mehr Superovulationen: Edeg:  $4,40 \pm 5,07$ ; Ounb:  $0,66 \pm 6,98$ ; Etaug:  $4,14 \pm 4,88$ ).

Der Prozentsatz tauglicher Embryonen nahm mit steigender Superovulationszahl in der aktuellen Laktation kontinuierlich ab.

In Gegensatz zu den Ergebnissen von ROMANOWSKI et al. (1980) und CAMP (1989) verringerte sich die Anzahl gewonnener Eizellen und Embryonen nicht, sondern lag im Gegenteil bei der Gruppe mit drei und mehr Superovulationen über den Ergebnissen der beiden anderen Gruppen. Diese Beobachtung machten auch PREISINGER et al. (1990), sie ermittelten ebenfalls für die dritte Superovulation die besten Resultate. Auch hier mag eine unbewußte Selektion auf fruchtbare Tiere seitens der Landwirte betrieben worden sein, indem nur Tiere mit guten Ergebnissen erneut superovuliert wurden.

In der eigenen Arbeit verschlechterte sich mit zunehmender Superovulationsanzahl die Qualität der Embryonen jedoch signifikant (Anzahl degenerierter Embryonen:  $P=0,035$ , Anzahl unbefruchteter Oozyten:  $P=0,004$ ).

Dabei wies Gruppe 1 signifikant bessere Ergebnisse auf als Gruppe 2 und 3 ( $P < 0,05$ ).

Diese Resultate stimmen mit den Beobachtungen von WICHMANN (1990), DE RUIGH et al. (1995) und WOOLIAMs et al. (1995) überein, die mit zunehmender Anzahl von Superovulationen pro Laktation eine Verschlechterung der Embryonenqualität bzw. -vitalität feststellten.

WOOLIAMs et al. (1995) etwa ermittelten an Holstein-Friesian- Kühen bei konstanten Embryonengewinnungsraten eine Abnahme des Prozentsatzes tauglicher Embryonen bei einer gleichzeitig steigenden Rate unbefruchteter Oozyten.

Aus den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Einflußfaktoren seitens der Donorkuh wird die Notwendigkeit einer strengen Vorselektion der Tiere deutlich, denn nur so können dauerhaft gute Ergebnisse nach einer Superovulationsbehandlung erwartet werden.

## 5.2 EINFLUß DES GONADOTROPINS

Für die große Variabilität der Superovulationsergebnisse in Embryotransferprogrammen beim Rind ist nicht zuletzt das zur Superovulationsinduktion verwendete Gonadotropin verantwortlich. In der Regel handelt es sich bei den verwendeten Präparaten um eCG, FSH oder hMG (HAHN 1988). Sie unterscheiden sich hinsichtlich des Superovulationserfolges, gemessen an der Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen sowie der Qualität der Embryonen, zum Teil erheblich. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen dies.

Im Beobachtungszeitraum wurden auf der Station Georgsheil vier verschiedene Präparate zur Superovulationsbehandlung eingesetzt:

FSH-P®, porcines FSH (Folltropin-V®), ovines FSH (Ovagen®) und PMSG (Intergonan®) mit Anti-PMSG. Der Einfluß des verwendeten Präparates auf die Ergebnisse der Superovulation stellte sich als statistisch signifikant heraus. Die Anzahl gewonnener Eizellen und Embryonen unterlag einer hochsignifikanten Beeinflussung ( $P=0,0001$ ), die Anzahl transfertauglicher Embryonen und damit die Qualität derselben einer signifikanten Beeinflussung ( $P=0,007$ ).

Die erzielten Mittelwerte in bezug auf die untersuchten Merkmale differierten erheblich (Gesamtgewinnungszahl:  $9,69 \pm 7,37$  für FSH-P®,  $8,96 \pm 7,16$  für Folltropin-V®,  $7,38 \pm 5,67$  für Ovagen® und  $6,32 \pm 5,24$  für PMSG; Anzahl transfertauglicher Embryonen: FSH-P®:  $5,05 \pm 4,73$ ; Folltropin-V®:  $4,67 \pm 4,27$ ; Ovagen®:  $3,89 \pm 3,9$ ; PMSG:  $3,08 \pm 3,57$ ). Dabei waren FSH-P® und Folltropin-V® den beiden anderen Präparaten signifikant überlegen, unterschieden sich jedoch untereinander nicht signifikant.

Der Einsatz des Präparates FSH-P® führte allerdings im Mittel zu der höchsten Zahl degenerierter Embryonen pro Spülung ( $3,77 \pm 5,09$ ). PMSG schnitt bei diesem Vergleich mit  $2,77 \pm 4,23$  deg. Embryonen / Spülung am besten ab, signifikant besser als FSH-P® und Folltropin-V® ( $P < 0,05$ ). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von STAIGMILLER et al. (1992), die bei der Verwendung von FSH eine deutlich höhere Anzahl degenerierter Embryonen als beim Einsatz von PMSG ermittelten. Betrachtet man allerdings den Prozentsatz tauglicher Embryonen und nicht die absoluten Zahlen, so schnitten FSH-P® und Ovagen® mit 38,20% bzw. 38,90% degenerierten Embryonen besser ab als Folltropin-V® (40,00%) und PMSG (43,82%). Das relativiert die absoluten Zahlen, denn bei einer höheren Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen können

vergleichsweise mehr degenerierte Embryonen auftreten und so zeigte sich FSH-P® letztlich überlegen.

In einem Vergleich von Folltropin-V® ( LH-Gehalt: 16%) und einem FSH-Präparat mit höherem LH-Gehalt (1:1) an 90 Färsen lagen die Ovulationszahlen aber auch die Anzahl unbefruchteter Oozyten und degenerierter Embryonen nach FSH-Einsatz signifikant höher als nach Folltropin-V® (KELLY et al. 1997). Diese Ergebnisse decken sich zum Teil mit den eigenen. FSH-P® wies in dieser Studie eine, wenn auch nicht signifikant höhere Gesamtzahl an gewonnenen Eizellen und Embryonen auf als Folltropin-V®, die Anzahl unbefruchteter und degenerierter Embryonen lag jedoch bei Verwendung von FSH-P® noch über den Werten von Folltropin-V®. DETTERER et al. (1997) beobachteten im Gegensatz dazu eine leichte Überlegenheit von Folltropin-V® gegen FSH hinsichtlich der Embryonengewinnungszahl. Dieser Studie lagen ebenfalls Daten aus der ET-Station des VOST zugrunde, doch wurde mit einer erheblich kleineren Stichprobe als in der vorliegenden Arbeit gearbeitet.

Die Bedeutung des unterschiedlichen LH-Gehaltes von FSH-Präparaten für die Erfolge einer Superovulationsbehandlung war bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (ALMEIDA 1987; BOLAND 1991, 1994; HERRLER et al. 1991; MAPLETOFT et al. 1992; KELLY et al. 1997). Ein einheitliches Ergebnis konnte jedoch nicht erzielt werden.

Das optimale FSH:LH Verhältnis für die Superovulationsinduktion bei Holstein-Friesian soll bei 3:1 liegen, bei säugenden Charolaiskühen bei 0,5:1 (CHUPIN et al. 1987).

Das auf der Station Georgsheil im Untersuchungszeitraum eingesetzte FSH-P® wie einen FSH:LH- Verhältnis von 1 : 1,6 auf.

Generell wird ein hoher LH-Gehalt für verminderte Ergebnisse der Superovulationsbehandlung verantwortlich gemacht (DONALDSON und WARD 1987, GONZALEZ et al. 1990, HERRLER et al. 1991). Hohe LH-Gehalte sollen eine frühzeitige Ovulation und Luteinisierung unreifer Follikel verursachen und eine hohe Anzahl von Embryonen schlechter Qualität bedingen (CALLESEN et al. 1987, MAPLETOFT et al. 1991). Dagegen soll die Embryonengewinnungsrate nach dem Einsatz von hochgereinigten FSH-Präparaten mit niedrigem LH-Anteil verringert sein (CHUPIN et al. 1987, SCHMIDT et al. 1988). HERRLER et al. (1991) ermittelten für Präparate mit 40% LH bessere Ergebnisse als für Präparate mit 20% oder 60% LH. MAPLETOFT et al. (1992) konnten jedoch bei einem Vergleich von drei Präparaten mit unterschiedlichem LH-Gehalt (100%, 16%, 2%) nach subkutaner Applikation keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der erzielten Ergebnisse ermitteln und sahen so einen gesicherten Einfluß des Anteils an LH auf die Superovulation als nicht erwiesen an. In der eigenen Arbeit unterschieden sich FSH-P® und Folltropin-V® nicht signifikant voneinander.

Die meisten FSH-Präparate sind porcinen Ursprungs, es gibt jedoch auch ein ovines FSH- Präparat mit niedriger LH-Aktivität (HENDERSON et al. 1990). Die Eignung des ovinen FSH (Ovagen®) zur Superovulationsinduktion beim Rind im Rahmen eines kommerziellen ET-Programmes sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Dazu wurden die Ergebnisse nach einer Superovulation induziert durch Ovagen® mit den Resultaten nach FSH-P®, Folltropin-V® und Intergonan® Applikation verglichen.

Ovagen®, ovines FSH, wird beim Rind sehr selten zur Superovulationsinduktion eingesetzt und im internationalen Schrifttum sind nur wenige Veröffentlichungen vorhanden. Zudem sind die Ergebnisse nach dem Einsatz von Ovagen® kontrovers. Der Hersteller ICP empfiehlt für Ovagen® beim Rind zur Superovulationsauslösung acht intramuskuläre Injektionen im Abstand von 12 Stunden in einer gleichbleibenden Dosierung von 1,25 –2,5 ml (1ml entsprechen 0,88 mg NIADDK-oFSH-17 bzw. 17,6 mg NIH- FSH-S1). In den wenigen Referenzen im Schrifttum wird die Dosierung uneinheitlich in einer der drei möglichen Einheiten angegeben, so daß ein direkter Vergleich der Dosierungen nicht möglich ist.

Um einen besseren Vergleich der Studien zu ermöglichen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Dosierungen der Autoren in ml Ovagen® umgerechnet.

BROADBENT et al. (1996) erzielten nach dem Einsatz von Ovagen® in einer niedrigen Dosierung (10,3 ml Gesamtdosis aufgeteilt auf acht gleiche Dosen 2x tgl. i.m. über vier Tage) bei Simmentaler Färsen im Mittel 7,7 gewonnene Embryonen, davon waren 6 vital und 4,4 Embryonen von sehr guter Qualität. In höherer Dosierung (12,27 ml aufgeteilt auf acht gleiche Dosen) waren die erzielten Werte schlechter (7,7 gewonnene Embryonen, davon 3,1 Embryonen transfertauglich). In der vorliegenden Arbeit lagen die Ergebnisse leicht unter den Werten nach Applikation der niedrigen Dosierung ( $7,38 \pm 5,67$  Embryonen / Spülung, davon  $3,89 \pm 3,90$  Embryonen transfertauglich). Die Applikation erfolgte über fünf Tage in absteigender Dosierung (3,5 - 1 ml bei den Färsen), die Gesamtdosis ( 20 ml) lag deutlich über der verwendeten Menge von BROADBENT et al. (1996). ECKERY et al. (1989) setzten drei verschiedene Dosierungen ( 1,2 ml; 2,2 ml und 4,3 ml) Ovagen® zwei mal täglich über vier Tage zur Superovulationsauslösung bei 32 Kühen ein. In der niedrigsten Dosierung erzielten sie die besten Ergebnisse.

Eine zu hohe Gesamtmenge Ovagen® mag eine Ursache für schlechtere Superovulationsergebnisse sein. Denn eine Überstimulierung der Ovarien durch eine zu hohe Dosis eines Gonadotropindosis kann zur Atresie oder aber frühzeitigen Ovulation unreifer Follikel und letztendlich zu niedrigeren Befruchtungsraten und Embryonen schlechter Qualität führen (HYTTEL et al. 1988, 1991).

JASKOWSKI und ZNANIECKI (1995) behandelten 22 Kühe über vier Tage mit einer absteigenden Dosis Ovagen® (2,5 ml – 1,5 ml). Damit lag die verwendete Dosis Ovagen® niedriger als die auf der Station Georgsheil verwendete Dosierung (Rinder 2-1 ml, Färsen 3,5-1 ml; Kühe 3,5-1 ml). Pro Spülung erzielten die genannten Autoren im Mittel 5,5 Embryonen, davon waren 5 Embryonen transfertauglich. Diese sehr gute Qualität der gewonnenen Embryonen konnte in den eigenen Ergebnissen nicht bestätigt werden. In einer vergleichenden Studie von ZNANIECKI und JASKOWSKI (1997) mit Folltropin-V®, FSH-P® und Ovagen® erwies sich Ovagen® als überlegen, die Anzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen war hoch (6,82; 5,63; 7,33) und die Embryonen waren von sehr guter Qualität (Anzahl transfertauglicher Embryonen: 3,85; 2,72; 5,25). In der eigenen Arbeit wurde zwischen diesen Präparaten eine andere Rangfolge ermittelt. Dies könnte aber unter Umständen auf Dosierungsunterschiede zurückzuführen sein. Im Prozentsatz transfertauglicher Embryonen schnitt Ovagen® mit 52, 71 % in der eigenen Arbeit ebenso gut ab wie FSH-P® (52,01% taugliche Embryonen) und Folltropin-V® (52,12 % taugliche Embryonen). So erscheint Ovagen® als Präparat zur Superovulationsinduktion beim Rind nicht ungeeignet zu sein und die Ergebnisse dieser Arbeit sollten Anlaß zu weiteren Untersuchungen geben. Hierbei wären vor allem Versuche mit unterschiedlichen Dosierungen von Ovagen® interessant, um eine für das Rind unter Berücksichtigung der Rasse optimale Dosis zur Superovulationsinduktion zu ermitteln.

Mit den Angaben im internationalen Schrifttum decken sich jedoch die eigenen Ergebnisse nach einer eCG-Behandlung (ALMEIDA 1987, ALFURAJI 1989, BROADBENT et al. 1996). ECG ist auf Grund seiner nur einmaligen Applikation und den dadurch bedingten niedrigen Kosten ein häufig zur Superovulationsinduktion beim Rind verwendetes Gonadotropin (GOULDING 1996). Die Verwendung von FSH führt jedoch in der Regel zu höhere Embryonengewinnunsraten (GOULDING et al. 1991,1996). Dies trifft für alle FSH-Präparate der vorliegenden Arbeit zu. Trotz der Applikation von Anti-PMSG mit der ersten Besamung waren die Mittelwerte in bezug auf die untersuchten Merkmale signifikant schlechter als nach dem Einsatz von FSH-P® oder Folltropin-V®. Es liegt die Vermutung nahe, daß die, durch die lange Halbwertszeit von eCG bedingten, negativen Auswirkungen durch das Antiserum nicht kompensiert werden konnten. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von CALLESEN (1992) und SPRINGMANN (1992), die keine Verbesserung der Ergebnisse nach Anti-PMSG-Applikation feststellen konnten. Ein weiterer möglicher Grund für die schlechten Ergebnisse könnte ein ungünstiges FSH:LH- Verhältnis in den verwendeten Chargen gewesen sein. Das FSH:LH- Verhältnis variiert in verschiedenen Chargen ganz erheblich und führt zu sehr unterschiedlichen Ovulationsraten (MÜLLER

1990). Ursache für das unterschiedliche FSH:LH Verhältnis ist im Hormonhaushalt der tragenden Stuten zu suchen, von denen das eCG gewonnen wird, da es je nach Stadium der Trächtigkeit zum Zeitpunkt der Gewinnung variiert (MURPHY et al. 1984).

### 5.3 EINFLUß DES BULLEN

In der vorliegenden Arbeit übte der Bulle einen signifikanten Einfluß auf die Befruchtungsrates und die Qualität der gewonnenen Embryonen aus (Anzahl unbefruchteter Oozyten :  $P= 0,0054$ ; Anzahl transfertauglicher Embryonen:  $P= 0,041$ ). Bei der Analyse des Einflusses des Besamungsbullen auf den Prozentsatz transfertauglicher bzw. degenerierter Embryonen sowie unbefruchteter Oozyten erwies sich der Faktor „Bulle“ bei diesen drei Merkmalen ebenfalls als signifikant ( $P \leq 0,05$ ). Es bestand zudem innerhalb der untersuchten Bullengruppe eine erhebliche Variabilität der Ergebnisse bei den Merkmalen Anzahl und Prozentsatz transfertauglicher Embryonen, so daß von großen Fruchtbarkeitsunterschieden zwischen den eingesetzten Vatertieren auszugehen ist (siehe Tabellen 31 und 33). Diese Unterschiede stellten sich bei einigen Bullen bezüglich der Prozentsätze an tauglichen bzw. degenerierten Embryonen und unbefruchteten Oozyten als statistisch signifikant heraus (Tabellen 28-30).

Vierzehn Bullen erzielten im Beobachtungszeitraum mehr als 60%, neun Bullen weniger als 50% taugliche Embryonen. Zwischen verschiedenen Bullen sind Fruchtbarkeitsunterschiede natürlich, sie sind jedoch nach der Besamung superovulierter Kühe unter Umständen deutlicher zu erkennen (GORDON 1996).

Spermien unterschiedlicher Vatertiere unterscheiden sich ganz erheblich in ihrer Befruchtungsfähigkeit und die gezeugten Embryonen weisen paternal abhängige, unterschiedlich gute Entwicklungspotentiale auf (HILLERY et al. 1990, SHI et al. 1991, BARANDI et al. 1993). MISRA et al. (1999) untersuchten den Einfluß von fünf verschiedenen Bullen auf die Ergebnisse der Superovulation (n= 64 Spendertiere). Die Embryonenqualität wurde signifikant durch den Bullen beeinflusst (Anzahl degenerierte Embryonen:  $P=0,05$ , Anzahl unbefruchtete Oozyten:  $P=0,005$ ; Anzahl taugliche Embryonen:  $P= 0,005$ ).

Dies deckt sich mit den eigenen Ergebnisse bei Tieren der Rasse Deutsche Holstein-Friesian, bei denen eine signifikante paternale Abhängigkeit der Embryonenqualität (Prozent degenerierte Embryonen, Prozent unbefruchtete Oozyten, Prozent transfertaugliche Embryonen) nachgewiesen wurde ( $P \leq 0,05$ ). Die Gesamtzahl gewonnener Eizellen unterlag in der eigenen Arbeit keiner paternalen Beeinflussung ( $P= 0,145$ ). Auch MISRA et al. (1999) wiesen in ihren Untersuchungen keine paternale Beeinflussung dieses Merkmals nach.

Das eigene Ergebnis war insofern zu erwarten, als daß man davon ausgeht, daß der Bulle die Ovulationsanzahl nicht beeinflussen kann, sondern diese maßgeblich durch die Spenderkuh, das verwendete Gonadotropin zur Superovulationsinduktion und Umweltfaktoren wie z.B. den Herkunftsbetrieb beeinflußt werden.

Unter *In-vitro*-Bedingungen übte in einer Studie von IJAZ et al.(1989) bovines Seminalplasma einiger Bullen einen lytischen Effekt auf die Oozyten aus. Da es sich aber bei kryokonserviertem Sperma um stark verdünntes Sperma handelt, kann das Seminalplasma in der eigenen Arbeit keine Rolle spielen. Aus dieser Sicht heraus läßt sich das Ergebnis nicht erklären.

Ein weiterer Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit war ein möglicher Zusammenhang zwischen der im KB-Einsatz ermittelten NRR eines Bullen und seinem Erfolges im ET bei der Besamung superovulierter Kühe.

In der statistischen Analyse konnte keine Korrelation zwischen den NRR der eingesetzten Bullen und ihren erzielten Ergebnissen innerhalb des ET-Programmes der Station Georgsheil nachgewiesen werden.

Es bestand keine nachweisbare Korrelation zwischen der Qualität der Embryonen und den ermittelten Non-Return-Raten. Bulle 2 mit einer hohen NRR von 79,71% am Tag 56 erzielte im Mittel nur 4,60 taugliche Embryonen während Bulle 4 mit der NRR von 63, 64% am Tag 56 einen Mittelwert von 8,00 tauglichen Embryonen / Spülung erreichte. Auch der Prozentsatz tauglicher Embryonen an der Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen korrelierte in der eigenen Untersuchung nicht mit den Non-Return- Raten der untersuchten Bullen. So erzielte z.B. Bulle 5 mit einer NRR am Tag 56 von 72,42% nur 39, 35% taugliche Embryonen, Bulle 27 dagegen wies im Beobachtungszeitraum bei einer NRR am Tag 56 von 61,2% den hohen Prozentsatz von 72,07% tauglichen Embryonen auf.

Vergleichbare Resultate in Bezug auf die NRR erzielten MISRA et al.(1999), die keine Korrelation zwischen der Fruchtbarkeit eines Bullen im KB-Einsatz und seinem Erfolg in einem ET-Programm nachweisen konnten. In ihrer Studie wies der Bulle (n= 5) mit der niedrigsten NRR von 50,30% die höchste Befruchtungsrate von 93,75% und die höchste Anzahl transfertauglicher Embryonen (d 6) auf (84,4%).

LINNENBRINK (1990) konnte keinen Zusammenhang zwischen den NR-Ergebnissen und der Fruchtbarkeit eines Bullen im *IVF*-Versuch nachweisen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von MILLER et al. (1985), MILLER und HUNTER (1987) und GRADL (1988).

Es gibt jedoch auch Untersuchungen, in denen eine Korrelation zwischen der Fruchtbarkeit eines Bullen im KB-Einsatz und seiner Fruchtbarkeit in ET-

Programmen vorlag (HILLERY et al. 1990, MARQUANT LE GUIENNE et al. 1990, SHAMSUDDIN und LARSSON 1993).

Die eigenen Ergebnisse verdeutlichen in Übereinstimmung mit Autoren wie LINNENBRINK (1990) und MISRA et al. (1999), daß Bullen mit hoher NRR nicht zwangsläufig einen hohen Erfolg im ET-Einsatz garantieren und im Vorfeld eine Fruchtbarkeitsprüfung günstig wäre, um befriedigende Ergebnisse zu erzielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde schließlich auch der potentielle Einfluß des Besamungsbullen auf das Geschlechtsverhältnis seiner Nachkommen überprüft. In der Rinderzucht ist es je nach Zuchtziel von Interesse, Nachkommen des einen oder anderen Geschlechts zu produzieren (GORDON 1996). Eine Möglichkeit der Geschlechtsbeeinflussung stellt im Prinzip die Insemination mit nach X- oder Y-Chromosom getrennten Spermien dar (SEIDEL et al. 1996). Die technischen Ansätze zu dieser Trennung der Spermien sind vielgestaltig. Erwähnt seien hier z.B. die Zentrifugation, die Elektrophorese oder die Durchflußzytometrie (GORDON 1996). Bei diesen Techniken versucht man, die Spermien auf Grund ihres unterschiedlichen DNA-Gehaltes aufzutrennen. VAN MUNSTER et al. (1999) stellten Volumenunterschiede in der Kopfregion der X- bzw. Y- Chromosom tragenden Spermien fest und sahen darin für die Zukunft eine Möglichkeit der Unterscheidung der Spermien.

Ein anderer Ansatzpunkt zur Auswahl des Geschlechts der Nachkommen stellt im Embryotransfer das „Sexen“ durch Nachweis geschlechtsspezifischer DNA- Sequenzen dar (NIBART et al. 1993).

Weniger aufwendige Ansätze sind Gegenstand von Untersuchungen, die sich mit dem potentiellen Einfluß des Besamungszeitpunktes auf das Geschlecht der Nachkommen befassen (DOMINKO und FIRST 1997, GUTIERREZ-ADAN et al. 1999, RORIE et al. 1999).

Dabei konnte in einigen Untersuchungen unter *In-vitro*-Bedingungen ein signifikanter Einfluß des Inseminationsszeitpunktes auf das Nachkommengeschlecht nachgewiesen werden. Eine späte Insemination (im IVF-Versuch 8 Stunden nach Ausschleusung des Polkörperchens) führte zu einer Verschiebung (1,67:1) zu Gunsten männlicher Embryonen (GUTIERREZ-ADAN et al. 1999).

Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von DOMINKO und FIRST (1997), die ebenfalls den Reifungsgrad der Oozyte zum Zeitpunkt der IVF für das Geschlechtsverhältnis der Nachkommen verantwortlich machten. Auch sie ermittelten acht Stunden nach Ausschleusung des Polkörperchens eine Verschiebung zu Gunsten männlicher Nachkommen

Die *In-vitro* Ergebnisse sind allerdings mit *In-vivo*- Bedingungen nicht unbedingt zu vergleichen.

WEHNER et al. (1997) beobachteten nach später Insemination *in vivo* eine Verschiebung zu mehr männlichen Embryonen. RORIE et al. (1999) konnten in ihrer Studie jedoch nach 139 Besamungen von Kühen keinen signifikanten Einfluß des Besamungszeitpunktes auf das Geschlecht der Nachkommen nachweisen. Eine Klärung steht aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde der potentielle Einfluß des Besamungsbullen auf das Geschlecht der geborenen Kälber überprüft. Dabei konnte für die Bullenpopulation der Studie kein statistisch gesicherter Einfluß nachgewiesen werden. Das gefundene Ergebnis unterschied sich nicht signifikant von dem erwarteten Verhältnis männlich/ weiblich von 1:1.

Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der Untersuchung von RORIE et al. (1999), die bei 13 getesteten Bullen ebenfalls keine Einflußnahme auf das Geschlecht nachweisen konnten. Zu diesem Resultat gelangten auch JOBST und NEBEL (1998) in ihrer Auswertung von 822 Kalbungen aus 11 Herden.

In der eigenen Untersuchung zugrunde liegenden Bullenpopulation gab es jedoch einige Bullen, die im Untersuchungszeitraum deutlich mehr männliche bzw. weibliche Kälber zeugten (Bullen 14, 25 und 26 > 60% männliche Kälber; Bullen 19, 30, 28, 3, 17 mehr als 60% weibliche Kälber).

CHANDLER et al. (1998) berichteten, daß das Verhältnis von X:Y-Chromosom tragenden Spermien bei verschiedenen Bullen signifikant unterschiedlich sein kann und diese Tatsache zu einem veränderten Geschlechtsverhältnis führen kann. Dies könnte eine der möglichen Erklärungen für das beobachtete Phänomen bei den beschriebenen Bullen der vorliegenden Arbeit sein.

Für die gesamte Population der Bullen aus der eigenen Arbeit gilt dieses jedoch nicht und das erwartete Geschlechtsverhältnis von 1 : 1 (KING et al. 1991) blieb vom Bullen unbeeinflusst.

#### **5.4 EINFLUß DES BESAMUNGSTYPES**

Über die Ergebnisse der Embryonengewinnung nach verschiedenen Besamungstypen wird in der Literatur kontrovers berichtet. Nach PREISINGER et al. (1990) können unterschiedliche Besamungsanzahlen zur Variabilität der Ergebnisse beitragen.

In der eigenen Arbeit wurden drei verschiedene Besamungsschemata untersucht (einmalige Besamung mit einem Bullen ( Typ 1, n= 21), Doppelbesamung mit dem gleichen Bullen (Typ 2, n=1294), Doppelbesamung mit zwei verschiedenen Bullen (Typ 3, n=276). Vor allem eine mögliche Verbesserung der Ergebnisse der Embryonengewinnung durch die Doppelbesamung mit zwei verschiedenen Bullen sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden.

In der eigenen statistischen Analyse konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Besamungsformen festgestellt werden ( $P > 0,05$ ). Im Vergleich der Mittelwerte zeichnete sich jedoch ein Trend ab. So verbesserten sich die Ergebnisse in der Reihenfolge der Besamungsformen Typ1, Typ2, Typ 3 sowohl bei dem Merkmal Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen ( $8,83 \pm 5,31$ ;  $9,09 \pm 4,63$ ;  $9,11 \pm 6,03$ ) als auch bei dem Qualitätsmerkmal Anzahl tauglicher Embryonen ( $5,12 \pm 4,2$ ;  $5,41 \pm 5,24$ ;  $5,54 \pm 4,39$ ). Diese Tendenz zeigte sich vor allem an dem Prozentsatz tauglicher Embryonen deutlich (57,98%; 59,51%; 60,81%), der Prozentsatz unbefruchteter Oozyten und degenerierter Embryonen verringerte sich gleichzeitig in der selben Reihenfolge.

Weiterhin bestand keine statistisch gesicherte Grundlage für die Annahme, daß sich bei den Doppelbesamungen mit zwei verschiedenen Bullen überwiegend die zeitlich frühere oder spätere Besamung durchsetzte. Es ist viel mehr anzunehmen, daß unter Umständen der direkte Zeitvorteil, den ein Bulle gegenüber dem anderen hinsichtlich des optimalen Besamungszeitpunktes gehabt haben mag (DZIUK 1996), in dieser Studie nicht entscheidend war. Der optimale Besamungszeitpunkt beinhaltet jedoch auch die, bei Spermien verschiedener Tiere individuell unterschiedliche benötigte Zeit zur Kapazitation der Spermien und setzt sie ins Verhältnis zum Ovulationszeitpunkt. Weicht dieses Verhältnis für einen Bullen zu stark vom tatsächlichen Besamungszeitpunkt ab, so wird sich das Nachkommensverhältnis zu seinen Ungunsten verschieben (DZIUK 1996). Über diese Parameter war bei den Bullen der eigenen Studie jedoch nichts bekannt.

Es ist festzuhalten, daß es sich bei den Doppelbesamungen in dieser Arbeit nicht um heterosperme Insemination im engeren Sinne gehandelt hat, bei der die Spermien unterschiedlicher Bullen zum Zeitpunkt der Besamung bereits gemischt vorliegen müßten (DZIUK 1996).

Ein direkter Vergleich mit den HI-Versuchen, wie sie von Autoren wie BEATTY (1960), STEWART (1974) und REVELL (1993) beschrieben wurden, ist folglich nicht möglich.

Festzuhalten ist, daß es sich bei den von DETTERER et al. (1997) beschriebenen „Mischspermaversuchen“ nicht um echte heterosperme Insemination gehandelt hat (DETTTERER 1999, persönliche Mitteilung). Die Autoren analysierten ebenfalls den Einfluß der Besamungsform auf die Erfolge der Embryonengewinnung und nutzten hierfür auch das Datenmaterial der VOST-ET- Georgsheil, allerdings eine wesentlich kleinere Stichprobe als in der vorliegenden Untersuchung. Die von den Autoren als Mischsperma („mixed sperm“) bezeichnete Besamungsform betraf aber im Grunde ebenso eine Doppelbesamung mit zwei verschiedenen Bullen. DETTERER et al.(1997) ermittelten folglich für die Doppelbesamung mit

zwei verschiedenen Bullen (n= 174) leicht verbesserte Embryonengewinnungsergebnisse.

Über Doppelbesamungen mit zwei verschiedenen Bullen gibt es im internationalen Schrifttum kaum Angaben und Erfahrungswerte. WICHMANN (1990) konnte in ihrer Auswertung von ET-Daten aus 14 Milchviehbetrieben keine signifikante Einflußnahme der Besamungsanzahl auf die Superovulationsergebnisse feststellen, allerdings lagen die Gewinnungsraten nach zweimaliger Besamung mit zwei verschiedenen Bullen (n= 135) leicht über den Ergebnissen nach der Insemination mit nur einem Bullen.

MARTIN und DZIUK (1977) sowie WEGMANN (1990) gingen bei Schweinen von einer insgesamt gesteigerten Befruchtungsrate bei der Verwendung von Doppelbesamungen mit verschiedenen Vatertieren aus, weil die Chance steigt, unter den Probanden einen fertilen Eber zu haben. Dies gilt genauso für Bullensperma. GROOTEN (1988) sprach in diesen Fällen beim Schwein von einem Heterosiseffekt.

Die verbesserten Resultate bezüglich des Prozentsatzes tauglicher Embryonen nach der Doppelbesamung mit zwei verschiedenen Bullen in der vorliegenden Arbeit sollten Anlaß zu weiteren Untersuchungen geben, scheint doch insgesamt eine leichte Überlegenheit der Doppelbesamung mit zwei verschiedenen Bullen zu bestehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem die Besamungshäufigkeit hinsichtlich einer potentiellen Einflußnahme auf die Ergebnisse der Embryonengewinnung untersucht.

Nach NEWCOMB (1980) ist für möglichst hohe Befruchtungsraten mindestens eine zweimalige Besamung vorzunehmen. MONCADA (1979) begründete diese Notwendigkeit damit, daß nach induzierter Superovulation die Ovulationen u.U. über einen Zeitraum von bis zu 24 Stunden erfolgen können und eine zweimalige Besamung die Chance des optimalen Besamungszeitpunktes erhöht. Dieses kann anhand der eigenen Daten, die keine signifikante Verbesserung nach zweimaliger Besamung aufwiesen, nur bedingt bestätigt werden. Allerdings wurde in der Station Georgsheil der Ovulationszeitraum durch die Applikation von hCG mit der ersten Besamung eingeengt.

FREISCHMANN (1990) konnte in seiner statistischen Auswertung von Erstbesamungserfolgen in einer groß angelegten Feldstudie (196.741 einmalige Besamungen, 16.477 Doppelbesamungen) keine signifikanten Verbesserungen der NRR nach Doppelbesamungen feststellen (eine Besamung: 69,4%, Doppelbesamung: 67,8%). Der Autor empfiehlt deshalb eine zweite Besamung nur in den Fällen, in denen 24 h nach der ersten Besamung noch Brunstsymptome vorhanden sind. HUITRON CALDERON (1991) beobachtete in seiner Untersuchung an 1500 Milchkühen ebenfalls keine Beeinflussung der Konzeptionsrate durch verschiedene Besamungshäufigkeiten innerhalb einer Brunst.

Eine signifikante Verbesserung der Embryonenqualität bei Kühen nach multipler Besamung konnte KNICKEL (1991) nachweisen. Die Anzahl transfertauglicher Embryonen nach 3-4 maliger Besamung lag mit 67,4% signifikant über der nach 1-2 maliger Besamung (42%). Die Embryonen-gewinnungsrate wurde nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse der eigenen Arbeit lassen einen Trend zu verbesserten Ergebnissen nach mehrfacher Besamung und vor allem nach Doppelbesamung mit zwei verschiedenen Bullen erkennen. Sie sind statistisch nicht abgesichert, sollten jedoch Anlaß zu weiteren Untersuchungen der Mischspermabesamung, vor allem auch der HI im engeren Sinne geben. Dabei wäre es aber sinnvoll, geeignete Bullenkombinationen vorab zu testen, da es durch die Mischspermaportion nicht immer zu Verbesserungen der Befruchtungsrate kommt und man davon ausgehen muß, daß nicht jede Kombination der Ejakulate männlicher Tiere geeignet ist (BORTOLOZZO 1992). Die Eignung der Bullen für den ET sollte ebenfalls geprüft werden, da wie in dieser Arbeit erwiesen, hohe NRR nicht immer eine Eignung der Bullen für den Einsatz im ET garantieren.

Auch die Bedeutung von heterologem Seminalplasma für den Besamungserfolg sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden, konnten doch HENAULT und KILLIAN (1995) im *In-vitro-Versuch* durch die Zugabe von Seminalplasma hochfertiler Bullen zu Spermien subfertiler Bullen die Befruchtungsrate steigern.

Vor allem beim Schwein sind in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen zur Bedeutung des Seminalplasmas für die Befruchtungsrate veröffentlicht worden:

So konnten NEHRING et al. (1994) durch heterologes Seminalplasma gegenüber homologem Seminalplasma die Motilität der Spermien und den Prozentsatz motiler Spermien positiv beeinflussen. Diese Verbesserung gelang jedoch nur, wenn das zugegebene Seminalplasma aus einem originären Ejakulat mit hohen Spermienmotilitätswerten stammte. Die Berichte im Schrifttum über verbesserte Befruchtungsraten nach Seminalplasmapplikation sind jedoch kontrovers. Während RATH et al. (1989) nach einer Seminalplasmainfusion keine höheren Befruchtungsraten nachweisen konnten, erzielten WABERSKI et al. (1994) bei mit Seminalplasma vorbehandelten Sauen signifikant höhere Befruchtungsraten. Seminalplasma wird beim Schwein außerdem eine ovulationsinduzierende Wirkung zugeschrieben ( WABERSKI et al. 1997) Über derartige Versuche beim Rind ist nichts bekannt.

## 5.5 EINFLUß VON SAISON UND JAHR

Der Einfluß der Saison auf die Erfolge einer Superovulationsbehandlung wird im Schrifttum widersprüchlich diskutiert. HAHN (1990) ging von einer jahreszeitlichen Abhängigkeit der ovariellen Reaktion auf exogene Gonadotropine aus. Unter extremen Klimabedingungen, im subtropischen und tropischen Raum, bestätigte sich diese Vermutung: Bei großer Hitze und/oder großer Trockenheit war die Fruchtbarkeit bei Kühen deutlich vermindert (BADINGA et al. 1985, DROST et al. 1987, TEGEGNE et al. 1997).

Maternale Hyperthermie übte einen negativen Einfluß auf die Entwicklung und die Überlebensrate der Embryonen aus (GORDON et al. 1987, MONTY und RACOWSKY 1987).

Dabei waren laktierende Kühe, die durch die Milchproduktion bereits eine hohe metabolische Wärmeentwicklung aufweisen, empfindlicher gegenüber hohen Außentemperaturen als Rinder (THATCHER und COLLIER 1986).

In gemäßigten Klimazonen sind die Ergebnisse der Untersuchungen kontrovers. PUTNEY et al. (1988, 1989) stellten eine klimaabhängige Fertilität bei Kühen fest, Tagestemperaturen unter +1 °C oder über + 43°C beeinflussten die Superovulationserfolge negativ. Im Sommer stieg der Anteil degenerierter Embryonen an der Gesamtzahl gewonnener Embryonen signifikant an. In einer weiteren Untersuchung an akut hitzestressen Kühen wurde über eine GnRH- induzierte signifikant verminderte, präovulatorische LH-Ausschüttung berichtet (GILAD et al. 1993).

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine statistisch abgesicherte, saisonale Beeinflussung der Superovulationsergebnisse ermittelt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen von MASSEY et al. (1984), SHEA et al. (1984), WICHMANN (1990) und KINSEL et al. (1998). Die genannten Autoren konnten ebenfalls keinen gesicherten Einfluß der Saison auf die Embryonengewinnungsrate oder die Qualität der Embryonen nachweisen.

Während WICHMANN (1990) den Einfluß der Jahre als vernachlässigbar ermittelte, verschlechterten sich die Ergebnisse bei den dieser Arbeit zu grunde liegenden Superovulationsbehandlungen über die Beobachtungsjahre 1991-1996 um sich dann 1997-1998 wieder zu verbessern. Dies war zwar insgesamt nur als Trend zu erkennen, sollte jedoch Anlaß zur Ursachenforschung auf der Station sein. Zumal im deutschen und im europäischen Vergleich eine derartige Tendenz in den jährlichen A.E.T.E.-Statisiken (FEDDERSEN 1992-1994, HEYMAN 1996-1999) nicht zu erkennen war.

Möglich Ursachen wären neben reinen Managementmängeln z.B. ein verstärkter Einsatz von für den ET weniger geeigneten Besamungsbullen oder von Seiten der Donorkühe zunehmend minderfertile Linien.

## 5.6 EINFLUß DES BETRIEBES

Ein gutes Herdenmanagement und Betriebsklima beeinflussen neben anderen Einflußfaktoren den Erfolg eines ET-Programms maßgeblich (PREISINGER 1990, 1992; ROSCHLAU 1996).

CAMP (1989) untersuchte die Superovulations- und Trächtigkeitsergebnisse in 18 Milchviehbetrieben und ermittelte einen signifikanten Einfluß des Betriebes auf die Qualität der gewonnenen Embryonen. Die Embryonengewinnungszahl unterlag einer hohen, jedoch nicht signifikanten Variabilität (Mittelwerte zwischen 10,4 und 3,9 gewonnenen Embryonen / Spülung) in den Betrieben. Die Trächtigkeitsraten und der Prozentsatz lebender Kälber unterlag wiederum einer hochsignifikanten, betrieblichen Beeinflussung. Generell waren die Fruchtbarkeitsergebnisse in kleineren Betrieben (40-55 Tiere) besser als in größeren Betrieben (55-89 Tiere), was der Autor auf eine bessere Einzeltierbetreuung in kleineren Betrieben zurückführte. Die große betriebliche Beeinflussung der Superovulationsergebnisse ermittelte auch WICHMANN (1990) in ihrer Untersuchung an 14 Milchviehbetrieben (n= 793 Tiere). In dieser Studie wurden sowohl die Anzahl gewonnener und transfertauglicher Embryonen signifikant durch die Betriebe beeinflusst. So variierten die Mittelwerte von 4,7- 11 für das Merkmal gewonnene Embryonen und von 4,2- 7,9 bei der Anzahl transfertauglicher Embryonen pro Spülung.

Die geschilderten Ergebnisse decken sich mit den eigenen.

Neunundzwanzig ostfriesische Milchviehbetriebe, in denen im Beobachtungszeitraum 1934 Tiere superovuliert wurden, gingen in die Analyse ein. Die erzielten Mittelwerte pro Spülung unterlagen einer großen Variabilität zwischen den einzelnen Betrieben und reichten von  $5,05 \pm 4,36$  bis  $13,26 \pm 7,2$  für das Merkmal Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen und von  $2,79 \pm 2,93$  bis  $8,22 \pm 6,23$  für die Anzahl transfertauglicher Embryonen. Der statistische Einfluß des Betriebes auf die Embryonengewinnungsrate und die Qualität der Embryonen erwies sich in der vorliegenden Studie in beiden Fällen als hochsignifikant ( $P= 0,0001$ ).

Der Faktor „Betrieb“ ist komplex zu sehen und beinhaltet eine Zahl von Einzelkomponenten. Betriebliches Management, Brunstbeobachtung, Haltung, Fütterung, Herdengröße, -gesundheit und -fruchtbarkeitsleistung sowie die Laktationsleistung seien an dieser Stelle erwähnt.

Die genetische Herdenzusammensetzung spielt eine große Rolle bei der Fruchtbarkeit und den Ergebnissen einer Superovulationsinduktion (ROMANOWSKY et al. 1980, HAHN 1986). In Herden mit einem Erstbesamungserfolg von unter 50% lagen die Embryonengewinnungszahl/ Spülung

und die Qualität der Embryonen deutlich unter den Ergebnissen aus Herden höherer Erstbesamungserfolge. Deshalb plädieren Autoren wie McMILLAN (1999) für eine strenge Selektion auf fruchtbare Linien der Donortiere. Die gute Einzeltierbetreuung ist vor allem für die Gesundheitsüberwachung und Brunstbeobachtung von großer Bedeutung, die wiederum die Superovulationsergebnisse beeinflussen (BROADBENT 1991, McMILLAN 1999). Dabei konnten KINSELL et al. (1998) keine signifikanten Unterschiede zwischen Anbinde- und Laufstallhaltung feststellen. Ungünstige Stallverhältnisse wie z.B. eine zu hohe Besatzdichte und damit verbundene Rangordnungskämpfe und Stresssituationen verschlechterten jedoch die Erfolge der Superovulation (EDWARDS et al. 1987, MÜLLER 1990). Dabei reagieren nach HAHN et al. (1987) v.a. Hochleistungstiere durch ihre angespannte metabolische Lage empfindlich mit ihrer Fertilität auf Haltungs- oder Fütterungsmängel. Die Bedeutung der Fütterung der Tiere, die ebenfalls unter den Oberbegriff „Betrieb“ fällt, ist in den letzten Jahren Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen.

So resultierte eine kurzfristige, restriktive Fütterung in einer verbesserten Embryonenqualität (ROSCHLAU 1996, NOLAN et al. 1998). Eine Fütterung auf hohem Energieniveau hingegen führte zu einer verringerten Anzahl transfertauglicher Embryonen (GONG et al. 1999).

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wird abschließend einmal mehr die große Bedeutung des multifaktoriellen Oberbegriffes „Betrieb“ deutlich. Nur eine Optimierung der einzelnen Komponenten kann auf Dauer gute und stabile Ergebnisse einer Superovulationsbehandlung im Rahmen des ET garantieren. Für weiterführende Untersuchungen in der vorliegenden Versuchsgruppe wäre es sinnvoll, eine genaue betriebliche Analyse vorzunehmen und zum Beispiel die Fütterung, die Haltungsform und die Herdengröße zu berücksichtigen. Des weiteren könnte der Einfluß der Abstammung der Spenderkühe untersucht werden. In einer Studie von MANCIAUX et al. (1999) wurde der Einfluß des Vaters der Spenderkuh auf die Ergebnisse der Embryonengewinnung untersucht und es stellten sich dabei signifikante paternale Einflüsse auf die Gewinnungsgesamtzahl und die Qualität der gewonnenen Embryonen heraus. Eine derartige Untersuchung an dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Datenmaterial wäre interessant.

## **6 SCHLUßFOLGERUNGEN**

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit läßt sich erkennen, wie wichtig die Berücksichtigung bestimmter Faktoren im Vorfeld von ET-Programmen für gute Ergebnisse ist.

Neben einer strengen Vorselektion potentieller Donortiere auf Fruchtbarkeit und Gesundheit müssen auch die Umweltbedingungen der Tiere durch ein gutes Betriebsmanagement optimiert werden. Die Auswahl eines geeigneten Gonadotropins zur Superovulationsinduktion stellt ebenfalls eine wichtige, erfolgsbeeinflussende Strategie dar.

Schließlich sollten potentielle Besamungsbullen hinsichtlich ihrer Eignung für den ET-Einsatz überprüft werden, da von der im KB-Einsatz ermittelten NRR nicht zwangsläufig auf gute Erfolge des Bullen im ET-Einsatz geschlossen werden kann.

Gegenstand weiterer Studien sollte der Besamungstyp und hier v.a. auch die heterosperme Insemination im engeren und im weiteren Sinne sein, lieferte letztere doch tendentiell verbesserte Gewinnungsraten und eine höhere Zahl transfertauglicher Embryonen.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollten erfolgsbeeinflussende Faktoren im kommerziellen Embryotransfer beim Rind analysiert werden. Besondere Berücksichtigung fanden dabei unter anderem auch die Untersuchung der Eignung von Ovagen® im Hinblick auf die Gewinnung transfertauglicher Embryonen sowie die Doppelbesamung mit zwei verschiedenen Bullen zur potentiellen Verbesserung der Resultate der Embryogewinnung

Zu diesem Zweck wurden die auf der ET-Station Georgsheil des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter im Beobachtungszeitraum Mai 1991 – April 1999 erzielten Resultate der Embryonengewinnung bei Deutschen Holstein Friesian nach einer Superovulationsbehandlung bearbeitet. In die statistische Auswertung fanden Daten aus 1934 ET- Protokollen Eingang. Zusatzinformationen wurden der Zentraldatei der RPN-Verden entnommen.

Die Qualitätsbeurteilung der Embryonen (d7) erfolgte gemäß IETS-Standard. Der Erfolg der Superovulationsbehandlung wurde in dieser Arbeit anhand der untersuchten Merkmale Gesamtzahl gewonnener Eizellen / Embryonen, Anzahl unbefruchteter Oozyten und degenerierter Embryonen sowie Anzahl transfertauglicher Embryonen beurteilt.

Berücksichtigte potentielle Einflüsse von Seiten der Donorkuh waren deren Alter (Rind n= 337, Färse n= 257, Kuh n= 1340), die Anzahl durchlaufener Superovulationen (eine Superovulation n= 1359, zwei Superovulationen n= 282, mehr als zwei Superovulationen n= 293 ) in der Laktation, sowie die Rastzeit der Spenderkühe.

Des weiteren wurde die Bedeutung des zur Superovulationsinduktion verwendeten Gonadotropins (FSH-P® n= 470, Folltropin-V® n= 332, Ovagen® n= 85, Intergonan® und Anti- PMSG n= 110), der Einfluß des Herkunftsbetriebes (n= 30), der Saison und des Jahrs analysiert.

Paternale Einflüsse in Bezug auf die untersuchten Merkmale sowie auf das Geschlechterverhältnis der Nachkommen waren ebenfalls Gegenstand der Analyse. Dabei wurde der genetische Vater der Kälber im Falle der Besamung mit zwei verschiedenen Bullen mittels PCR durch die RPN-Verden festgestellt.

Eine mögliche Korrelation zwischen der NRR der Bullen (n= 30) im KB-Einsatz und ihrem Erfolg im Embryotransfereinsatz wurde überprüft.

Außerdem wurden drei verschiedene Besamungsschemata (Einzelbesamung mit einem Bullen n= 21, Doppelbesamung mit dem selben Bullen im Abstand von zwölf Stunden n= 1294, Doppelbesamung mit zwei verschiedenen Bullen im Abstand von zwölf Stunden n= 276) analysiert.

Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

1. Die Zeit zwischen der letzten Kalbung und der Superovulationsbehandlung (Rastzeit) der Spenderkühe beeinflusste den Erfolg der Superovulation nicht.
2. Das Alter der Donorkuh übte einen signifikanten Einfluß auf die Gesamtzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen ( $P=0,0001$ ) und die Anzahl transfertauglicher Embryonen ( $P= 0,018$ ) aus, wobei die Altersklasse „Kühe“ mit mehr als einer Abkalbung die besten Ergebnisse erzielte.
3. Mit steigender Anzahl von Superovulationen innerhalb einer Laktation erhöhte sich die Anzahl degenerierter Embryonen ( $P= 0,035$ ) und die Anzahl unbefruchteter Oozyten ( $P= 0,004$ ) signifikant, der Prozentsatz tauglicher Embryonen nahm in gleicher Reihenfolge kontinuierlich ab, bei von der Superovulationsanzahl unbeeinflussten Gesamtgewinnungszahlen
4. Das verwendete Gonadotropin zur Superovulationsbehandlung beeinflusste die Embryonengewinnungsrate ( $P= 0,0001$ ) und die Anzahl transfertauglicher Embryonen ( $P= 0,007$ ) signifikant, wobei FSH-P® (Schering-Plough-Animal-Health) und Folltropin-V® (Vetrepharm, Canada) den Präparaten Ovagen® (ICP, Neuseeland) und PMSG (Intergonan®, Intervet) signifikant überlegen waren. Bei dem Prozentsatz transfertauglicher Embryonen erwies sich Ovagen® dem FSH-P® bzw. dem Folltropin-V® als gleichwertig.
5. Die Besamungsform übte keinen statistisch gesicherten Einfluß auf die untersuchten Merkmale aus. Es bestand jedoch ein deutlicher Trend zu einer erhöhten Anzahl, eines größeren Prozentsatzes transfertauglicher Embryonen sowie zu verbesserten Gesamtgewinnungszahlen nach Doppelbesamungen mit zwei verschiedenen Bullen
6. Der eingesetzte Besamungsbulle beeinflusste die Qualität der Embryonen ( Prozent taugliche und degenerierte Embryonen sowie unbefruchtete Oozyten) signifikant ( $P \leq 0,05$ ). Dabei bestanden zwischen einzelnen Bullen diesbezüglich signifikante Unterschiede.
7. Der Erfolg eines Bullen im KB-Einsatz, repräsentiert durch seine NRR, stand in keiner Korrelation zu seinem Erfolg im ET- Einsatz.

8. Eine Beeinflussung des Geschlechterverhältnisses durch die eingesetzte Bullenpopulation bestand nicht, obwohl bei einzelnen Bullen im Beobachtungszeitraum eine deutliche Verschiebung zu Gunsten oder zu Ungunsten männlicher Nachkommen vorlag ( $> 60\%$ ,  $< 40\%$ ).
  
9. Ein Einfluß der Saison oder des Jahres auf die Superovulationsergebnisse konnte nicht nachgewiesen werden.
  
10. Der Herkunftsbetrieb der Spenderkuh beeinflusste die Merkmale Anzahl gewonnener Embryonen ( $P= 0,0001$ ) und die Anzahl transfertauglicher Embryonen ( $P= 0,0001$ ) hochsignifikant.

## 8 SUMMARY

Susanne Hupka

### **Factors influencing the success of commercial embryo transfer in German Holstein cattle**

The purpose of this study was to determine the effects of age of donor (heifer, 1<sup>st</sup> calf, 2 or more calvings), no. of superovulation, time after calving, herd, gonadotrophin (, pFSH: FSH-P, Folltropin®, oFSH: Ovagen® and PMSG: Intergonan® + Anti-PMSG), type of insemination (single bull once, single bull twice, different bulls twice), year and season on the number and quality of embryos recovered (d7) after superovulation. Especially the use of Ovagen® for superovulation in cattle and double insemination with different bulls twice in a twelve hours interval were of major interest.

Data were collected from a commercial ET-Center (VOST-Georgsheil) from March 1991 until April 1999.

Additionally, the bull-influence on the sex of the calves was investigated (following insemination with different bulls paternity was detected by PCR in the laboratory of the RPN Verden).

1934 embryo recoveries in German Holstein donors were analysed. Classification of the embryo-quality was based upon IETS-Standard.

The following results were obtained:

1. Time after calving had no effect on the number and quality of embryos recovered.
2. Age of the donor cow had a significant effect on the total number of embryos recovered ( $P= 0.0001$ ) as well as on the number of transferable embryos ( $P= 0.018$ ). Cows with two or more calvings showed the best results.
3. The number of unfertilised oocytes ( $P= 0.035$ ) and degenerated embryos ( $P= 0.004$ ) rose significantly with increasing numbers of superovulation.
4. Highly significant influences of the gonadotrophin used to induce superovulation existed on the total number ( $P= 0.0001$ ) and number of transferable embryos ( $P=0.007$ ). FSH-P® (Schering-Plough-Animal-Health) and Folltropin® (Vetrepharm, Canada) were highly superior to Ovagen® (ICP, New Zealand) and Intergonan® (Intervet). Regarding the percentage of transferable embryos, results after superovulation with Ovagen® were similar to FSH-P® and Folltropin®.
5. A tendency was observed concerning the type of insemination. Slightly better results were found following insemination with different bulls twice.

6. Field fertility of a bull (shown by his non-return-rate) was not correlated with his fertility in the ET-programme.
7. The sire influenced significant the quality of embryos recovered represented by the percent of transferable and degenerated embryos or unfertilised oocytes ( $P \leq 0.05$ ).
8. No significant influence of the investigated bull-population on the sex of calves could be found, although there were some bulls who sired significantly more male calves (over 60%)
9. Effects of season and year were negligible.
10. A highly significant effect of the herd of the donor existed on the total number ( $P= 0.0001$ ) and number of transferable embryos ( $P= 0.0001$ ).

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH.....	Adrenocortikotropes Hormon
Anti-PMSG.....	PMSG Antiserum
<b>BSA</b> .....	Bovines Serumalbumin
<b>DPBS</b> .....	Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline
DF .....	Dominanter Follikel
DM .....	Double mating
DNA.....	Desoxy-Ribonucleinsäure
<b>ET</b> .....	Embryotransfer
eCG .....	equines Choriongonadotropin
EG .....	Gesamtzahl gewonnene Eizellen/ Embryonen
Edeg. ....	Anzahl degenerierter Embryonen
Etaug. ....	Anzahl tauglicher Embryonen
E2 .....	Östradiol
<b>FAA</b> .....	Fertility-associated-antigen
FSH .....	Follikel stimulierendes Hormon
pFSH .....	porcines Follikelstimulierendes Hormon
<b>GnRH</b> .....	Gonadotrophin releasing hormone
GLM.....	General Linear Models Procedure
<b>HI</b> .....	Heterosperme Insemination
hCG .....	Humanes Choriongonadotropin
HMG .....	Humanes Menopausengonadotropin
<b>I.E.</b> .....	Internationale Einheiten
IVF .....	In-vitro-Fertilisation
<b>KB</b> .....	Künstliche Besamung
KDA .....	Kilodalton
<b>LH</b> .....	Luteinisierendes Hormon
<b>ml</b> .....	Milliliter
MG.....	Molekulargewicht
<b>NRR</b> .....	Non-Return-Rate

n..... Anzahl

p.c..... post conceptionem

PCR ..... Polymerase chain reaction

PGF2 $\alpha$  ..... Prostaglandin F2 $\alpha$

p.i..... post inseminationem

PMSG ..... Pregnant-Mare's-Serum-Gonadotrophin

oFSH ..... ovines Follikelstimulierendes Hormon

Ounb..... Anzahl unbefruchteter Oozyten

SD..... Standardabweichung

TGS ..... Tiefgefriersperma

VOST ..... Verein Ostfriesischer Stammviehzüchter

$\xi$ .....Mittelwert

## 10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Fruchtbarkeitsassoziierte Proteine im Bullenejakulat .....	24
Tabelle 2: Entwicklungsstadium der Rinderembryonen nach LINDNER u. WRIGHT (1983) .....	26
Tabelle 3: Auswahl von Ergebnissen der Superovulation nach Entfernung des DF .....	37
Tabelle 4: Die Behandlungsschemata für FSH-P® und Folltropin-V® .....	49
Tabelle 5: Die Behandlungsschemata für Ovagen® und Intergonan® .....	50
Tabelle 6: Qualitative Beschreibung und Klassifizierung der Embryonen nach IETS-Standard (ROBERTSON und NELSON 1998) .....	53
Tabelle 7: Embryonengewinnungszahl und -qualität in Abhängigkeit vom Alter der Donorkuh .....	55
Tabelle 8: Anzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen in Abhängigkeit vom Alter der Kuh .....	56
Tabelle 9: Anzahl degenerierter Embryonen in Abhängigkeit vom Alter der Kuh .....	56
Tabelle 10: Anzahl unbefruchteter Oozyten in Abhängigkeit vom Alter der Kuh .....	57
Tabelle 11: Anzahl tauglicher Embryonen in Abhängigkeit vom Alter der Kuh .....	57
Tabelle 12: Embryonengewinnungszahl und –qualität in Abhängigkeit von der Superovulationsanzahl .....	59
Tabelle 13: Anzahl gewonnener Eizellen /Embryonen in Abhängigkeit von der Superovulationsanzahl pro Laktation .....	60
Tabelle 14: Anzahl degenerierter Embryonen in Abhängigkeit von der Superovulationsanzahl pro Laktation.....	60
Tabelle 15: Anzahl unbefruchteter Oozyten in Abhängigkeit von der Superovulationsanzahl pro Laktation.....	61
Tabelle 16: Anzahl tauglicher Embryonen in Abhängigkeit von der Superovulationsanzahl pro Laktation .....	61
Tabelle 17: Erzielte Mittelwerte aus allen Spülungen bei „Kühen“ und „Färsen“ (n= 1234) im Untersuchungszeitraum bezüglich zur Rastzeit .....	63
Tabelle 18: Rangkorrelationskoeffizienten von EG, Edeg.; Ounb. und Etaug.zur Rastzeitzeit .....	64
Tabelle 19: Mittelwert der Embryonengewinnungsrate und –qualität in Abhängigkeit vom eingesetzten Präparat. ....	65
Tabelle 20: EG in Abhängigkeit vom eingesetzten Präparat .....	66
Tabelle 21: Anzahl degenerierter Embryonen im Abhängigkeit vom eingesetzten Präparat .....	66
Tabelle 22: Anzahl unbefruchteter Oozyten in Abhängigkeit vom eingesetzten Präparat .....	67
Tabelle 23: Anzahl transfertauglicher Embryonen in Abhängigkeit vom eingesetzten Präparat .....	67
Tabelle 24: Anzahl der Nachkommen und Anteil männlicher Kälber nach Embryotransfer in Bezug auf die analysierten Bullen (n= 30) im Beobachtungszeitraum .....	72
Tabelle 25: Mittelwerte der untersuchten Merkmale in Abhängigkeit zur Bullenpopulation (n= 30) .....	73
Tabelle 26: Einfluß des Besamungsbullen auf die Embryonengewinnung .....	74
Tabelle 27: Einfluß des Besamungsbullen auf den Prozentsatz degenerierter Embryonen, unbefruchteter Oozyten und tauglicher Embryonen .....	74
Tabelle 28: Signifikante Unterschiede in bezug auf das Merkmal Prozentsatz taugliche Embryonen (angegeben werden die <i>P- Werte</i> ) .....	75
Tabelle 29: Signifikante Unterschiede in bezug auf das Merkmal Prozent degenerierte Embryonen (angegeben sind die <i>P-Werte</i> ).....	76
Tabelle 30: Signifikante Unterschiede in bezug auf das Merkmal Prozent unbefruchtete Oozyten (angegeben werden die <i>P-Werte</i> ).....	77

Tabelle 31: Aufstellung der Bullen mit dem Prozentsatz tauglicher Embryonen in absteigender Reihenfolge .....	79
Tabelle 32: Zusammenhang Zwischen der Gesamtzahl gewonnener Eizellen/ Embryonen und der NRR .....	80
Tabelle 33: Zusammenhang zwischen Embryonenqualität und NRR .....	81
Tabelle 34: Rangkorrelationskoeffizienten für NRR 56% und NRR 90% bezüglich EG, Etaug. und % taug. Embryonen.....	82
Tabelle 35: Mittelwerte der Merkmale EG und Embryonenqualität in Abhängigkeit vom Besamungsschema.....	83
Tabelle 36: Prozentraten degenerierter Embryonen, unbefruchteter Oozyten und tauglicher Embryonen an EG.....	83
Tabelle 37: Anzahl gewonnener Eizellen/Embryonen in bezug zum Besamungstyp .....	84
Tabelle 38: Prozent degenerierter Embryonen in bezug zum Besamungstyp .....	84
Tabelle 39: Prozent unbefruchteter Oozyten in bezug zum Besamungstyp .....	84
Tabelle 40: Prozent tauglicher Embryonen in bezug zum Besamungstyp .....	84
Tabelle 41: Durchgesetzter Anteil der frühen oder späten Besamung an den Doppelbesamungen .....	86
Tabelle 42: Monatsmittelwerte von EG, Edeg.; Ounb. ,Etaug. sowie% taug. über die Beobachtungsjahre sowie schlechtesten und besten Monat.....	88
Tabelle 43: Einfluß der Saison auf die Merkmale EG, Edeg.; Ounb., Etaug.....	88
Tabelle 44: Mittelwerte von EG, Edeg., Ounb., Etaug.und %taugliche Embryonen der Jahre 1991-1999.....	89
Tabelle 45: Die Merkmale EG, Edeg., Ounb. und Etaug. in Abhängigkeit der Jahre.....	90
Tabelle 46: Mittelwerte; Minimum und Maximum der untersuchten Merkmale im Beobachtungszeitraum auf den Betrieben .....	91
Tabelle 47: Einfluß des Betriebes auf die Merkmale EG, Edeg.,Ounb. und Etaug.....	91

## 11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Embryonengewinnungszahl in Abhängigkeit vom Alter der Donorkuh .....	31
Abbildung 2: Die Erfassung des Datenmaterials .....	47
Abbildung 3: Einfluß des Alters der Kuh auf die Merkmale EG und Etaug. ....	58
Abbildung 4: Einfluß der Anzahl der Superovulationsanzahl pro Laktation auf die Embryonequalität.....	62
Abbildung 5: Einfluß des Gonadotropins auf die Merkmale EG und Etaug.....	69
Abbildung 6: Der Prozentsatz männlicher Nachkommen der einzelnen Bullen im Beobachtungszeitraum .....	71
Abbildung 7: Einfluß des Besamungstyps auf die Merkmale EG und Etaug.....	85

## 12 LITERATURVERZEICHNIS

ABDULJHANOV, FH.

Data on the effect on inseminating ewes with mixed semen  
Animal.Breed.1951, 19, S.485

ADAMS GP.

Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implications on  
synchronizing and superstimulation

Theriogenology 1994, 41, S.19-24

ADAMS GP.; KOT, K.; SMITH, CA.; GINTHER, OJ

Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers

Anim.Reprod.Sci 1993, 30, S.259-271

ADAMS GP.; RL. MATTERI; KASTELIC JP.; KO, JC.; GINTHER, OJ.

Association between surges of follicle stimulating hormone and the  
emergences of follicular waves in heifers

J.Reprod.Fert:1992, 94, S.177-188

AHMAD, N .; BEAN, SW.; BUTLER, RW; DEEVER, DR; RUBY, DT;

ELDER, D. FORTUNE, JE.; TOWNSON, DH.;

SCHREIBER, DT; INSKEEP, EK.

Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and  
associated hormonal profiles in dairy cows and heifers

J.Anim.Sci.1996, 74, S.1943-1952

ALFURAIJI, MM.

The use of monoclonal antibody to pregnant mares serum gonadotrophin in  
superovulation of cattle

PhD.Thesis 1989, Aberdeen

ALMEIDA, AP.

Superovulation in cattle: A combined treatment using Syncromate B with either  
PMSG or FSH

Theriogenology 1987, 27, S.203

ANON.

ADR-EMPFEHLUNG NR.7.1.

Bonn , 10.04.1991

ARMSTRONG, DT.

Recent advances in superovulation of cattle

Theriogenology 1993, 39, S.7-24

ASSEY, R.J.; HYTTEL.P; GREVE, T.; PURWANTARA, B.

Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles

Mol.Reprod.Develop.1994, 37, S.335-344

- ASSUMPCAO, M.E.O.A.; MADUEIRA, EH.; ARRUDA, RP.;  
CELEGHINI, ECC., GUSMOES, PPG.; CANDINI, PH.; JA. VISINTIA  
Influence of the dominant follicle on the superovulatory response in Nelore  
heifers  
Theriogenology 1997, 47, S.165
- BADINGA, L.; COLLIER, RJ.; THATCHER, WW.; WILCOX CJ.  
Effects of climate and management factors on conception rate in dairy cattle in  
subtropical environments  
J.Dairy Sci. : 1985, 68, S.78-85
- BADINGA, L.; DRIANCOURT, MA; SAVIO, JD; WOLFENSON, D.,  
DROST, M.; DE LA SOTA, RC. THATCHER, W. (1992)  
Endocrine and ovarian response associated with the first wave dominant  
follicle in cattle  
Biol.Reprod.1992, 47, S.871-883
- BALLACHEY, BE.; EVENSON, D.; SAACKE, RG.  
The sperm chromatin structure assay: Relationship between alternate tests of  
semen quality and heterospermic performance of bulls  
J.Androl. 1988, 9; S.109-115
- BARANDI, Z.; SOLTÍ, L.; VARGA, ZS.; MACHATY, Z.; VAJTA, G.  
Comparison of in vitro fertilizing ability of sperm from endangered Hungarian  
Grey bulls  
Anim.Reprod.Sci. 1993, 31, S.13-19
- BARNES, FL.; EYESTONE, WH.  
Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos  
Theriogenology 1989, 38, S.277-296
- BARTMANN, CP.  
Untersuchungen zur Verbesserung der Superovulationsergebnisse beim Rind  
durch Entfernung des dominanten Follikels mit Hilfe der Sonographie  
Diss. TiHo Hannover 1992
- BEATTY, RA.  
A pilot experiment with heterospermic insemination in the rabbit  
J.Genetics 1957, 55, S.325-347
- BEATTY, RA.  
Fertility of mixed semen from different rabbits  
J.Reprod.Fert. 1960, 1, S.52-60
- BEATTY, RA.; BENNETT, GH.; HALL, JG.; HANCOCK, JL.; DL STEWART  
An experiment with heterospermic insemination in cattle  
J.Reprod.Fert. 1969, 19, S.491-502
- BEATTY, RA.; STEWART, DL.; SPOONER, RL.; JL. HANCOCK  
Evaluation by the heterospermic insemination technique of the differential  
effect of freezing at  $-196\text{ C}^\circ$ . on fertility of individual bull semen  
Reprod.Fert.1976, Juli, S.377-379

BELLIN, ME.; HAWKINS, HE.; RL. AX

Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid  
J.Anim.Sci. 1994, 72, S.2441-2448

BELLIN, ME.; HAWKINS, HE.; OYARZO, J.; VANDERBOOM, R.J.; RL. AX

Monoclonal antibody detection of a heparin-binding protein on bull sperm that corresponds to fertility  
J.Anim.Sci. 1996, 74, S.173-182

BELLIN, ME.; HAWKINS, HE.; OYARZO, J.; ZHANG, HM.; SMITH, GR.; FORREST, DW.; SPROTT, LR.; RL. AX

Fertility associated antigen (FAA) on bull sperm indicates fertility potential  
J.Anim.Sci.1998, 76, S.1211-1223

BERGER, T.

Proportion of males with lower fertility spermatozoa estimated from heterospermic insemination  
Theriogenology.1995, 43, S.769-775

BERGFELT, DR.; LIGHTFOOT, KC.; GP.ADAMS

Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in cyclic heifers  
Theriogenology 1994, 41, S.161

BETTERIDGE, KJ.

Superovulation

Embryo transfer in farm animals- a review of techniques and applications  
Agriculture Canada 1977, Nr.16, S.156-166

BETTERIDGE, KJ.

Methods of assessing the viability of embryos

Embryo transfer in farm animals – a review of techniques and applications  
Agriculture Canada 1978, Nr.17, S.210-215

BO, GA.; ADAMS, GP.; PIERSON, RA., MAPLETOFT, RJ.

Exogenous control of follicular wave emergence in cattle  
Theriogenology 1995, 43, S.31-40

BO, GA.; PIERSSON, RA.; MAPLETOFT, RJ.

The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Synchronate- B implants  
Theriogenology 1991, 36, S.169-183

BO, GA.; TRIBULO, H.; CACCIA, M.; TRIBULO, R.

Superovulatory response of beef heifers treated with estradiol benzoate, progesterone and CIDR-B vaginal device  
Theriogenology 1998, 49, S.375

BOLAND, MP.; CROSBY, TF.; GORDON, I.

Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG  
Theriogenology 1978, 10, S.175-180

- BOLAND, MP.; GOULDING, D. & ROCHE, JF.  
Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle  
Theriogenology 1991, 35, S.5-17
- BOLAND, MP.; KELLY, P.; RAMSBOTTOM, G.; CROSBY, TF.; JF. ROCHE  
Factors affecting superovulation in cattle and sheep  
In: Progress in embryo technology and genetic engineering in cattle and sheep  
breeding  
Proc.1<sup>st</sup> Int.Europ.Conf.Krakow, Poland 1994, S.103-110
- BOLTON, VN.; HAWAES, SM.; TAYLOR, CT; PARSONS, JH.  
Development of spare human preimplantation embryos in vitro: An analysis of  
the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to  
the blastocyst  
J.In Vitro Fertil.and Embryo Transfer 1989, 6, S.30
- BORTOLOZZO, FP.  
Besamung mit flüssigkonserviertem Mischsperma beim Schwein unter  
Berücksichtigung von Ovulationszeitpunkt und Spermaalter  
Diss.TiHo-Hannover 1992
- BOUE, F. u. SULLIVAN, R.  
Cases of human infertility are associated with the absence of P34H, an  
epididymal sperm antigen  
Biol.Reprod.1996, 54, S.1018-1024
- BREUEL, KF.; BAKER, RD.; BUTCHER, RL.; TOWNSEND, EC.;  
INSKEEP, EK.; DAILEY, RA.; LERNER, SP.  
Effects of breed, age of donor and dosage of FSH on the superovulatory  
response of beef cows  
Theriogenology 1991, 36, 241-255
- BROADBENT, PJ.; STEWART, M.; DOLMAN, DF.  
Recipient management and embryo transfer  
Theriogenology 1991, 35, S.125-139
- BROADBENT, PJ.;TREGASKES, LD.; DOLMAN, DF. u. SMITH, AK.  
The effect of varying dose and pattern of administration of ovine FSH on the  
responsal to superovulation in performance tested, juvenile Simmental heifers  
Anim.Sci. 1996, 62, S.181-186
- BUNGARTZ, L.  
Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung des dominanten Follikels für  
die Superovulationsantwort beim Rind mittels ultrasonographischer Methoden  
Diss.TiHo-Hannover 1993
- BUNGARTZ, L. u. NIEMANN, H.  
Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows  
suitable for superovulation by a single ultrasound examination  
J.Reprod.Fertil.1994, 101, S.583-591
- BURKE, JM.; HAMPTON, JH.; STAPLES, CR.; THATCHER, WW.  
Body condition influences maintenance of persistent first wave dominant  
follicle in dairy cattle  
Theriogenology 1998, 48, S.751-760

CALDER, M.; RAJAMAHENDRAN, R.  
Follicular growth , ovulation and embryo recovery in dairy cows given FSH at the beginning or middle of the estrous cycle  
Theriogenology 1992, 38, S.1163-1174

CALLAGHAN, BD. u. KING, GJ.  
Determination of the fertilization rate of A.I.sires  
Theriogenology 1980, 14, S.403-409

CALLESEN, H.; BAK, A. u. T.GREVE  
Use of PMSG antiserum in superovulated cattle?  
Theriogenology 1992, 38, S.959-968

CALLESEN, H.; GREVE, T., HYTTEL, P.  
Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle  
Theriogenology 1986, 25, S.71-86

CALLESEN, H.; T.GREVE u. HYTTEL, P.  
Premature ovulation in cattle  
Theriogenology 1987, 28, S.155-166

CAMP, H.  
Untersuchungen über Einflußfaktoren auf den Embryotransfer beim Rind  
Diss. TiHo Hannover 1989

CAMPBELL, RC. u. JAFFE, WP.  
The motility of mixed semen  
J.Agric.Science 1958, 50, S.64-65

CANCEL, AM.; CHAPMAN, DA.; KILLIAN, GJ.  
Osteopontin is the 55-kilodalton fertility associated protein in Holstein bulls seminal plasma  
Biol.Reprod. 1997, 57, S 1293-1301

CARBONNEAU, G.; TWAGIRAMUNGU, H.; MARIN, N.; BRISSON, C.; DUROCHER, J.; BOUSQUET, D.  
Factors affecting the sex ratio of in vitro and in vivo produced bovine embryos  
Theriogenology 1999, 51, S.396

CHANDLER, JE.; STEINHOLT-CHENEVERT, HC.; ADKINSON, RW.; MOSER, EB.  
Sex ratio variation between ejaculates within sire evaluated by PCR, calving and farrowing records  
J.Dairy.Sci.1998, 81, S.1855-1867

CHANDRA, R.; SANWAL, PC.; MAJUNDAR, AC.; AUSARI, MR.  
Superovulation in dairy cows: Effect of GnRH treatment.  
Theriogenology 1997, 47, S.167

CHAUAN, FS.; SARVAIYA, NP. u. METHA, VM.  
Factors affecting superovulatory response and embryo yield in Jersey x Krankej cows  
Ind.J.Anim.Reprod.1994, 15(1), S.1-5

CHUPIN, D.; COGNIE, J.; COMBARNOUS, Y.;  
PROCUREUR, R.; SAUMANDE, J.  
Effect of purified LH and FSH on ovulation in the cow and ewe  
In: Roche u. Callaghan (Hrsg.): Follicular growth and ovulation in farm animals  
Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston 1987, S.63-72

COLE, LC. u. DAVIS, CL.  
The effect of alcohol on the male germ cells, studied by means of double  
matings  
Science 1914, 39, S.476

COUROT, MG.; COLAS, G.  
The role of the male in embryonic mortality (cattle and sheep)  
Embryonic Mortality in Farm Animals 1986  
Martinus Nijhoff, Dordrecht S.195-203

CUPP, AS.; SHUMP, TT.; KOJIMA, N.; WERTH, LA.; WOLFE, MW.;  
KINDER, JE.  
Effect of day of estrous cycle on pattern of LH secretion in the bovine female  
J.Anim.Sci.1990, 68 Suppl.1, S.442 abstr

CURRY, PT. u. ATHERTON, RW.  
Seminal vesicles: Development, secretory products and fertility  
Archives of Andrology 1990, 25, S.107-113

DALEY, CA. ; MACFARLANE, MS.; SAKURAI, H. ; ADAMS, TE.  
Effect of stress-like concentrations of cortisol on follicular development and the  
preovulatory surge of LH in sheep  
J.Reprod.Fertil. 1999, 117, S.11-16

DALTON, J.; NADIR, S.; DEGELAS, S.; BARNE, J.; SAACKE, RG.  
Effect of cream added to the inseminate on accessory sperm number in cattle  
J.Anim.Sci. 1994, 72 Suppl.1, S.172

DARROW, MD.; LINDNER, GM.; GOEMANN, G.  
Superovulation and fertility in lactating and dry dairy cows  
Theriogenology 1982; 17, S.84(Abstr.)

DAVIS, AP.; GRAHAM, DK.; FOOTE, RH.  
Homospermic versus heterospermic insemination of zona-free hamster eggs  
to assess fertility of fluorochrome-labelled acrosome-reacted bull spermatozoa  
Gamete Research 1987(a), 17, S.343-354

DAVIS, AP.; GRAHAM, DK.; FOOTE, RH.  
In vitro heterospermic insemination of zona-free hamster eggs by  
fluorochrome labeled bull sperm: A fertility test  
J.Dairy Sci. 1987(b), 69, S.147

DE JARNETTE, JM.; SAACKE, RG.; BARNE, J.; VOGLER, CJ.  
Accessory sperm: Their importance to fertility and embryonic quality and  
attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle  
J.Anim.Sci. 1992, 70, S.484-491

- DE RUIGH, L.; PEARSON, RE. u. VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, JA.  
Are "permanent donor cows" permanent donor cows?  
Proc.11<sup>th</sup> meeting of the A.E.T.E, Hannover 1995, S.158  
Edition Fondation Marcel Merieux
- DEN DAAS, JH.; DE JONG, G.; LANSBERGEN, LM.; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, AM.  
The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency in individual dairy bulls  
J.Dairy sci.1998, 81(6), S.1714-1723
- DEN DAAS, N.  
Laboratory assesment of semen characteristics  
Anim.Reprod.Sci. 1992, 28, S.87-94
- DEN DAAS, N.  
Prediction of bovine male fertility  
PhD.Thesis Wageningen 1997, ISBN: 90-5485-757-9
- DESAULNIERS, DM.; LUSSIER, JG.; GOFF, AK.; BOUSQUET, D. u. GUILBAULT, L.  
Follicular development and reproductive endocrinology during a synchronized estrous cycle in heifers and mature cows displaying contrasting superovulation responses  
Domestic Animals.Endocrinology 1995, 12, S.117-131
- DETTNERER, J.; SCHMIDT, T.; HARLIZIUS, B.  
Factors influencing the variability in superovulation results in German Holstein cattle  
Theriogenology 1997, 47, S.169-172.
- DEWESBURY, DA.  
Sperm competition in muroid rodents  
Academic Press, New York 1984, S.547-571
- DIELEMAN, SJ. ; BEVERS, MM.  
Folliculogenesis and oocyte maturation in superovulated cattle  
Mol.Reprod.Develop. 1993; 36, S.271-273
- DIELEMAN, SJ.; BEVERS, MM.; P.VOS; DE LOOS, F.  
PMSG/Anti-PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment?  
Theriogenology 1993, 39, S.25-41
- DOMINKO, T. u. NL. FIRST  
Relationship between the maturational stage of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos  
Theriogenology 1997, 47, S.1041-1050
- DONALDSON, LE u. PERRY, B.  
Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows  
Theriogenology 1983, 20, S.163-168
- DONALDSON, LE.  
The day of the estrus cycle that FSH is started and superovulation in cattle  
Theriogenology 1984, 22, S.97-99

- DONALDSON, LE. u. WARD, DN.  
LH effects on superovulation and fertilization rates  
Theriogenology 1987, 27, S.225
- DOTT, HM. u. A.WALTON  
Motility and survival of spermatozoa in mixed semen from different bulls  
J.Agric.Sci. 1958, 50, S.267-272
- DRAIN COURT, MA.  
Follicular dynamics in sheep and cattle  
Theriogenology 1991, 35, S.55-79
- DROST, M.; AMBROSE, JD.  
Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida  
Theriogenology 1999, 52, S.1161-1167
- DROST, M. u. THATCHER, WW.  
Heat stress in dairy cows: Its effect on reproduction  
Vet.Clin. North Am.Food Anim. Pract. 1987, 3, S.609-618
- DU MESNIL DU BUISSON, F.; RENARD, JP.; LEVASSEUR, MC.  
Factors influencing the quality of ova and embryos  
Embryotransfer in Farm Animals  
Agriculture Canada 1977
- DUFOUR, JJ; ADELAKOUN, V.; MATTON, P.  
Limited multiple ovulation in heifers fed high plane of nutrition before PMSG stimulation and steroid hormone concentrations in single, twin and multiple ovulators  
Theriogenology 1981; 15, S.433-439
- DZIUK, PJ.  
Double mating of rabbits to determine capacitation time  
J.Reprod.Fert. 1965, 10, S.389
- DZIUK, PJ.  
Estimation of optimum time for insemination of gilts and ewes by double-mating at certain times relative to ovulation  
J.Reprod.Fert. 1970, 22, S.277-282
- DZIUK, PJ.  
Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination  
Anim.Reprod.Sci. 1996, 43, S.65-88
- ECHTERNKAMP, SE.  
Relationships between LH and cortisol in actually stressed cows  
Theriogenology 1984, 22, S.305-311
- ECERY, DC.; WILTBANK, JN.; POWELL, K.  
Superovulating beef cattle with purified oFSH  
Proc.West.Sect.American.Soc.Anim.Sci. 1989; 40; S.296-298

EDE, P.; FLORIN, B.; KHODJA, S.; PONSART, C.; HUMBLLOT, P.  
Effect of the puncture of the largest follicle on embryo yield after superovulation in dairy cattle  
Proc.15<sup>th</sup> meeting A.E.T.E., Lyon 1999, S.148 abstr  
Edition Fondation Marcel Merieux

EDWARDS, IM.; RUHE, CH.; GRIFFIN, JF.; WOLFE, DF.; MARPLE, DN.; CUMMING, KA.; PICKETT, JF.  
Effect of stress on ovarian function in superovulated Herford heifers  
Theriogenology 1987, 28, S.291-299

EID, LN. u. PARRISH, JJ.  
Duration of the G2-Phase and onset of M-phase during the first cell-cycle of the bovine embryo is dependent on bull fertility  
Theriogenology 1995, 43, S.205

EID, LN.; LORTON, SP. u. PARRISH, JJ.  
Paternal influence on S-Phase in the first cell cycle of the bovine embryo  
Biol.Reprod.1994, 51, S.1232-1237

ELDSEN, RP.,GE.SEIDEL JR. u. NELSON, LD.  
Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotropin  
Theriogenology 1978, 9, S.17-26

ELLIOT, FI.  
Heterospermic trials at ABS  
5<sup>th</sup> Techn. Conf. on A.I. and Reprod. of the NAAB 1974, S.65

ENGELBRECHTEN, M.v.; WASSMUTH, R.; DZAPO, V.; REUTER, H.  
Die Einkreuzung der Belgischen Landrasse in die Deutsche Landrasse unter besonderer Berücksichtigung des Wurfhalbgeschwistevergleiches  
Züchtungskunde 1973, 45, S.224-233

EYESTONE, WH.; NL. FIRST  
Variation in bovine embryo development in vitro due to bulls  
Theriogenology 1989, 31, S.191

FEDDERSEN, E.  
Bovine embryo transfer in Germany 1991  
8<sup>th</sup> meeting of the A.E.T.E. in Lyon, 11-12 September 1992  
Edition Fondation Marcel Merieux

FEDDERSEN E.  
Bovine embryo transfer in Germany 1992  
9<sup>th</sup> meeting of the A.E.T.E. in Lyon, 11-12 September 1993  
Edition Fondation Marcel Merieux

FEDDERSEN, E..  
Bovine embryo transfer in Germany 1993  
10<sup>th</sup> meeting of the A.E.T.E. in Hannover, 8-9 September 1994  
Edition Fondation Marcel Merieux

FEDDERSEN, E.  
Bovine embryo transfer in Germany 1994  
11<sup>th</sup> meeting of the A.E.T.E. in Hannover, 8-9 September 1995

Edition Fondation Marcel Merieux

FORTUNE, JE.; SIROIS, J.; TURZILO, AM.; LAVOIR, M.  
Follicle selection in domestic ruminants  
J.Reprod.Fertil.1991, Suppl.43, S.187-198

FORTUNE, JE.; SIROIS, AM.; LAVOIR, M.  
Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility?  
Anim.Reprod.Sci. 1993, 33, 111-125

FRAPPEL, JP. u. WILLIAMS, G.  
A study of heterospermic inesemination in cattle  
Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Congress on Animal Reproduction  
1956, Section 1, S.65-67

FREISCHMANN, K.  
Double insemination is better: It improves the conception rate of cows with prolonged estrous or delayed ovulation  
Tierzüchter 1990, 42, 346-347

GARCIA, C.; BERROCAL, F.; ANDUGAR, J.; SANCHEZ, R.; GARCIA, P.; SAIZ, F.; MARTIN, S.  
Fertility results between ORT groups using mixed boar semen  
3<sup>rd</sup> Int.Congr.Pig Reprod., Nottingham 1989

GERENA, RL.; IRAKURA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, DA.; KILLIAN, GJ.  
Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase  
Biol.Reprod. 1998, 58, S.826-833

GIBBS, HL.; WEATHERSHEAD, PJ.; BOAG, PT.; WHITHE, PN.; TABAK, LM.; HOYSAK, DJ.  
Realized reproductive succes of polygynous red-winged blackbirds revealed by DNA markers  
Science 1990, 250, S.1394-1396

GILAD , E., MEIDAN, R.;BERMAN, A.; GRUBER, Y.; WOLFENSON, D.  
Effect of heat stress on tonic and GnRH induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows  
J.Reprod. Fert.1993, 99, S.315-321

GINTHER, OJ.; KASTELIC, JP.; KNOPF, L.  
Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers  
Theriogenology1989, 32, S.787-795

GONG, JG.; ARMSTRONG, DG.; BAXTER, G.; GARNSWORTHY, PC.; WEBB, R.  
The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers  
J.Reprod.Fert. 1999, Abstract Nr.23, S.22

GONZALEZ, A.; LUSSIER, JG.; CARRUTHERS, TD.;  
MURPHY, BD.; MAPLETOFT, RJ.  
Superovulation of beef heifers with Folltropin: A new preparation containing  
reduced LH activity  
Theriogenology 1990, 33, S.519-529

GORDON, I.  
Embryo quality considerations  
Laboratory production of cattle embryos; CAB International 1994

GORDON, I.  
Controlled reproduction in cattle & buffaloes  
CAB International 1996; ISBN 0851991149

GORDON, I.; BOLAND, MP.; CGOVERN, H.; LYNN, G.  
Effect of season on superovulation responses and embryo quality in Holstein  
cattle in Saudi Arabia  
Theriogenology 1987, 27, 231 abstr.

GÖRLACH, A.  
Embryotransfer beim Rind  
Enke-Verlag 1997

GOULDING, D.; WILLIAMS, DH.; ROCHE, JF u. BOLAND, MP.  
Superovulation in heifers using either PMSG or FSH during the mid luteal  
stage of the estrous cycle  
Theriogenology 1991, 36, S.949-958

GOULDING, D.; WILLIAMS, DH.; ROCHE, JF. u. BOLAND, MP.  
Factors affecting superovulation in heifers treated with PMSG  
Theriogenology 1996, 45, S.765-773

GRADELA, A.; MATOS, S.; LANZA, JA.; DERAGON, L., BARBOSA, JC.;  
ESPER, CR.  
A dominant follicle does not affect the superovulatory response in Nelore cattle  
but decrease the rate of embryonic viability  
Proc.15<sup>th</sup> meeting A.E.T.E Lyon 1999, S.160 abstr.

GRADL, E.  
In vitro Produktion von Rinderembryonen  
Diss.Univ.München, Tierärztliche Fakultät 1988

GRASSO, F.; GUILBAULT, LA.; ROY, G.; LUSSIER, JG.  
Ultrasonographical determination of ovarian follicular development in  
superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of estrous cycle  
Theriogenology 1989, 31, S.1209-1219

GRAY, BW.; CARTEE, RE.; STRINGFELLOW, DA.; RIDELL, MG.; RIDELL,  
KP.; WRIGHT, JC.  
The effects of FSH-priming and dominant follicular regression on the  
superovulatory response of cattle  
Theriogenology 1991, 35, S.207

GRAY, BW.; CARTEE, RE.; STRINGFELLOW, DA.; RIDELL, MG.;  
WRIGHT, JC.

The effect of FSH-priming and dominant follicular regression on the superovulatory response of cattle

Theriogenology 1992, 37, S.631-639

GREVE, T.; BAK, A.; SCHMIDT, M.

Superovulation of dairy cattle: Effect of PMSG-Antiserum treatment

Theriogenology 1988, 29, S.252

GROOTEN, H.

Einsatz von Mischsperma in der Mastferkelerzeugung

Tierzüchter.1988, 40, S.344-345

GUILBAULT, LA. ; GRASSO, F.; LUSSIERS, J.; ROUILLIER, P.; MATTON, P.  
Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle

J.Reprod.Fertil 1991, 91, S.81-89

GUILBAULT, LA.; ROUILLIER, P.; MATTON, P.; GLENCROSS, RG.; BEARD, AJ.; KNIGHT, P.

Relationship between the level of atresia and inhibin contents in morphologically dominant follicles during their growing and regressing phase of development in cattle

Biol.Reprod.1993, 48, S.268-276

GUSTAFSSON, H. u. L. JANSON

The influence of age and some other factors on the superovulation response in heifers

Proc.12<sup>th</sup> Int.Cong.Anim.Reprod.1992, S.217-219

GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARULO, S.; GRANADOS, J.; GARDE, J.; PEREZ-GUZMAN, M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.

Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte

Theriogenology 1999, 51, S.397

HAHN, J.

Superovulation, Embryotransfer und Teilung von Embryonen

Züchtungskunde 1988, 60, 174-184

HAHN, J.

Embryotransfer beim Rind- derzeitiger Stand und Ausblick

Dtsch.-Tierärztl.Wochenschrift 1990, 97, S.258-263

HAHN, J.; HAHN, R.; BAUMGÄRTNER, G.; LOTTHAMMER, KH.; LORRMANN, W.; SCHNEIDER, U.; TRAUB, J.; ZODER, HF.

Untersuchungen zur Verbesserung der Auswahl der Spender-und Empfängertiere im Rahmen der Eiübertragung beim Rind

Zuchthygiene 1977,12, S.68-76

HAHN, J.; HAHN, R.u. GÖRLACH; A.

Über die Entwicklung und Beurteilung von Rinderembryonen, gewonnen aus superovulierten Tieren

Dtsch.Tierärztl.Wochenschr. 1983, 90, S.420-424

HAHN, J.; MICHAELIS, M.; ROSELIUS, R.; SCHNEIDER, U.  
Untersuchungen über die Eignung von Spenderkühen für den ET  
Rinderproduktion 1987, 83, S.8-9

HAHN, J.; ROMANOWSKI, W.; ROSELIUS, R.; SCHNEIDER, U.  
Embryotransfer beim Rind am Beispiel des Zuchtgebietes Hannover  
Kali-Briefe (Büntehof) 1980, 15, S.263-276

HAMMIT, DG; MARTIN, PA; CALLANAN, T.  
Correlatiion between heterospermic fertility and assays of porcine semen  
quality before and after cyropreservation  
Theriogenology 1989, 32, S.385-399

HAMMOND, J.  
The fertilization of rabbit ova in relation to time  
J.Experimental Biology. 1934, 2, S.140-161

HASLER, JF; BROOKE, GP; MCAULEY, A.  
The relationship between age and response to superovulation in Holstein  
cows  
Theriogenology 1981, 15, 109, abstr.

HASLER, JF.; MCCAULEY, A.; SCHERMERHÓRN, E.; FOOTE, RF.  
Superovulatory response of Holstein cows  
Theriogenology 1983, 19, S.83-99

HASLER, JF.; MCCAULEY, D.; LATHROP, F. u. RH. FOOTE  
Effect of donor embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large  
scale bovine ET-programme  
Theriogenology 1987, 27, S.139-168

HAUPT, P.  
Untersuchungen über die Abhängigkeit des Superovulationserfolges bei frisch  
laktierenden Kühen und ihre Fruchtbarkeit nach der Eigewinnung  
Diss.TiHo-Hannover 1979

HENAULT, MA u. KILLIAN, GJ  
Effect of sperm preparation and bull fertility on *in vitro* penetration of zona-free  
bovine oocytes  
Theriogenology 1995, 43, S.739-749

HENAULT, MA.; KILLIAN, GJ.; KAVANAUGH, JF.; GRIEL, LC.  
Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability  
of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes  
Biol.Reprod.1995, 52, S.390-397

HENAULT; MA u. KILLIAN, GJ.  
Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability  
of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine  
oocytes  
Reprod.Fert. Nov.1996, 108, S.199-204

HENDERSON, KM.; WEAVER, A.; WARDS, RL.; LUN, S.; McNATTY, KP:  
Comparison of commercial gonadotrophins using Bioassays  
Proc.of the New Zealand soc.of Anim.Prod.1990, 50, S.161-165

HERRLER, A.  
Untersuchungen zur Auswahl von Spendertieren im Rahmen des  
Embryotransfers mit einem Milchprogesteronschnelltest und zur Auslösung  
der Superovulation mit definierten FSH-LH Präparaten  
Diss.TiHo Hannover 1989

HERRLER, A.; ELSAESSER, F.; PARVIZI, N.; NIEMANN, H.  
Superovulation of dairy cows with purified FSH supplement with defined  
amounts of LH  
Theriogenology 1991, 35, S.633-643

HESS, EA.; LUDWICK, T.; RICHARD, H.; ELY, F.  
Some of the effects of heterospermic processing on semen quality and bovine  
fertility  
Fert.Steril.1958, 9, S.238-242

HESS, EA.; LUDWICK, T.; RICHARD, H.; FORDYCE, E.  
Some of the influences of mixed ejaculates upon bovine fertility  
J.Dairy Sci. 1954, 37, S.649-650

HEYDORN, KP. u. F.HOBEIN  
Verwendung von Mischsperma in der künstlichen Besamung beim Schwein  
Der Tierzüchter 1977, 12, S.521-522

HEYDORN, KP.; MEYER, JN.  
Untersuchungen über Ebermischsperma als Fertilitätstest für Besamungseber  
Zuchthygiene 1977, 12, S.160-164

HEYDORN, KP.; MEYER, NJ.; BRUNS, E.; PAUFLER, S.  
Unerwartete Befruchtungsergebnisse nach Schweinebesamung mit Disperma  
Dtsch.Tierärztliche Wochenschrift 1977, 84, S.253-270

HEYDORN, KP.; PAUFLER, S.  
Besamungsergebnisse nach Mischspermaeinsatz beim Schwein  
Dtsch.Tierärztliche Wochenschrift 1976, 83, S.449-451

HEYMAN; Y.  
Overall bovine embryo transfer in Europe 1995  
12<sup>th</sup> meeting of the A.E.T.E. in Lyon, 13-14 September 1996  
Edition Fondation Marcel Merieux

HEYMAN; Y.  
Overall bovine embryo transfer in Europe 1997  
14<sup>th</sup> meeting of the A.E.T.E. in Venedig, 11-12 September 1998  
Edition Fondation Marcel Merieux

HILL, BR.; LÁRRIVE, R.; VIGNEUALT, A.; PAQUIN, JR.; PICARD, L.;  
DERY, M.; BRASSARD, P.; LANDRY, R.; HOUDE, P.; CLOUTIER, J.  
A retrospective study of the influence of a single sire on embryo transfer  
results  
Theriogenology 200, 53, S.310

HILLERY, FL.; PARRISH, JJ.; FIRST, NL.

Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro  
Theriogenology 1990, 33, S.249

HILLERY-WEINHOLD, F.

Sire influence on bovine in vitro fertilization and development  
Univ.of Wosconsin, M.S. Thesis 1991

HOEKSTRA, RAH.

A study of the success rate of the first insemination  
Stud.Report, Vet.Med.Centr.of Oosterwolde, the Netherlands 1989

HOPPE, PC.

Genetic influences on mouse sperm capacitation in vivo and in vitro  
Gamete res. 1980, 3, S.343-349

HUCK, UW. ; QUINN, PP.; LISK, RD.

Determinants of mating success in the golden hamster,  
IV.Sperm competition.Behav.Eval.Socio.Biol. 1985, 17, S.239-252

HUCK, UW.; TONIAS, BA.; LISK, RD.

The effectiveness of competitive male inseminations in golden hamsters  
depends on an interaction of mating order, time delay between males, and the  
time of mating relative to ovulation  
Anim.Behav.1989, 37, S.674-680

HUHTINEN, M.; RAINO, V.; AALTO, J.; BREDBACKA, P.; MAKI-TANILA, A.

Increased ovarian response in the absence of a dominant follicle in  
superovulated ewes  
Theriogenology 1992, 37, S.457-463

HUITRON-CALDERON, A.

The relationship between signs of estrous, the number of services and fertility  
in dairy cows  
Vet.Mexico 1991, 22(1), S.95

HUMBLOT, P.; NEGRAO, S.; NIBART, M.

Effects of high energy supply and metabolic status on superovulatory  
response and embryo production in dairy heifers  
Theriogenology 1998, 49, S.378

HUNTER, RH.; VAJTA, G.; HYTTEL, P.

Long-term stability of the bovine block to polyspermy  
J.Exp.Zool.1998, 280 (2), S.182-188

HYTTEL, P.; CALLESSEN, H.; GREVE, T.

Ultrastructure of in vivo fertilization in superovulated cattle  
J.Reprod.Fert. 1988, 82, S.1-13

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T.

Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle  
Theriogenology 1997, 47, S.23-32

- IJAZ, A.; HUNTER, G.; AYOUB, M.  
Lysis of oocytes by bovine sperm and seminal plasma  
J.Dairy Sci.1989, 72, S.3273-3279
- IRELAND, JJ. u. ROCHE, JF.  
Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle  
In: Follicular growth and ovulation rate in Farm Animals  
Dordrecht:Martinus Nijhoff,1987, S.1-18
- ISOGAI, T.; SHIMORAI, I. u. KIMURA, K.  
Factors affecting embryo production following repeated superovulation treatment in Holstein cows  
J:Reprod.Develop. 1993, 39(1), S.79-84
- JABLONKA, A.; FRICKE, PM.; REDMER, DA.; REYNOLDS, LP.  
Effects of FSH on size, number and labeling index of follicles in ewes  
J.Anim.Sci.1991, 69 Suppl.1, S.438
- JASKOWSKI, JM. u. ZNANIECKI, R.  
Results of superovulation in cows after treatment with Ovagen  
Zycie weterinaryjne 1995, 70:8, 268-269, 8 ref.
- JOBST, SM u. NEBEL, RL.  
Does timing of insemination effect gender of the resultant calf?  
J.Dairy Sci. 1998, 81(Suppl.), S.244 abstr.
- KALINOWSKA, R.; WILLEKE, H.  
Einfluss der Insemination von Ebermischsperma auf die Fruchtbarkeits-  
ergebnisse bei Sauen  
Archiv für Tierzucht.1997, 40
- KANDELL, RL.; BELLIN, ME.; HAWKINS, HE.; AX, RL.  
Bull fertility was related to distributions of heparin- binding proteins in sperm  
membranes and seminal plasma.  
J. Androl. 1992, 13, Supplement 1,S. 30
- KANITZ,W.; SCHNEIDER, F.; BECKER, F.  
LH-secretions and follicular development after implantation of a GnRH-depot  
Reprod.Dom.Anim 1993, Suppl.2; 69
- KASTELIC, JP.; BERGFELDT, DR.; GINTHER, OJ.  
Effect of day of PGF2 alpha treatment on selection and development of the  
ovulatory follicle in heifers  
Anim.Reprod.Sci.1990, 23, S.169-180
- KELLY, P. ; DUFFY, P.; ROCHE, JF.; BOLAND, MP.  
Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on  
follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns  
Anim.Reprod.Sci. 1997, 46, S.1-14
- KENNEDY, LG; BOLAND, MP; GORDON, I:  
The effect of embryo quality at freezing on subsequent developmnet of thawed  
cow embryos  
Theriogenology 1983, 19, S.823-832

- KILLIAN, GJ.; CHAPMAN, DA.; ROGOWSKI, LA.  
Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma  
Biol.Reprod. 1993, 49, S.1202-1207
- KING, KK.; SEIDEL, GE.; ELDBEN, RP.  
Bovine embryo transfer pregnancies: Abortion rates and characteristic of calves  
J.Anim.Sci.1985, 61, S.747-757
- KING, WA.; SUPPLIZI, AV.; DIOP, H. u. BOUSQUET, D.  
Chromosomal analysis of embryos produced by artificially inseminated cattle  
Gen.Sel.Evolution 1995, 65, S.189-194
- KING, WA.; YADAV, BR.; XU, KP.; PICARD, L.; SIRARD, MA.; VARINI-SUPPLIZI, A.; BETTERIDGE, KJ.  
The sex ratios of bovine embryos produced in vivo and in vitro  
Theriogenology 1991, 36, S.779-788
- KINSEL, ML.; ETHERINGTON, WG.  
Factors affecting reproductive performance in Ontario dairy herds  
Theriogenology 1998, 49, S.1221-1238
- KNICKEL, UR.  
Untersuchungen über den Einfluß der Besamungshäufigkeit auf die Embryonenqualität und Beurteilung der Fruchtbarkeit bei Spendertieren nach der Embryonengewinnung  
Diss. TiHo Hannover 1991
- KNOBLAUCH, H.  
Status und Perspektiven in der Besamung des Rindes  
Monatsheft Veterinärmedizin Jul.1971
- KO, JCH.; KASTELIC, J.; DEL CAMPO, M.; OJ. GINTHER  
Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers  
J.Reprod.Fert. 1991, 91, S.511-519
- KOHRAN, H.; TWAGIRAMUNGO, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J.; GUILBAULT, LA.  
Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle  
Theriogenology 1998, 49, S.1175-1186
- KRUIP, T.; VAN BEEK, H.; DE WIT, A. u. POSTMA, A.  
Quality of bovine oocytes in dairy cows post partum: Consequences for embryo production in vivo and in vitro  
Proc.11<sup>th</sup> meeting of the EETA, Hannover 1995, S.113-119
- KUSHNER, KH.  
Izvestia Akad Nauk SSSR  
Ser.Biol. 1954, 1, S.32

KUZAN, FB.

Evaluation of embryos prior to freezing  
Bovine Embryo Transfer- Short course proceedings  
Animal reproduction and Biotechnology 1990; Laboratory Colorado State  
University  
Fort Collins, CO

KWEON, OK.; KANAGAWA, H.; TAKAHASHI, Y.; YAMASHINA, H.; EIKE, N.;  
IWAZUMI, Y.; AOYAGI, Y.; ONO, H.

Factors affecting superovulatory response in cattle  
Jap.J.Vet.Sci.1986, 48, S.495-503

LANGE, W.

Präkonzeptionelle Geschlechtsbeeinflussung: Neue Möglichkeiten und  
Aussichten  
18.Tierärztliche Fortbildungstagung am 20.05.1993

LAURIA, A. ; OLIVA, O.; GENAZZANI, A.; CREMONESI, F.; GANDOLFI, F.;  
BARBETTI, M.

Superovulation of dairy and beef cows using porcine FSH with defined LH  
content  
Theriogenology 1983, 20, S.675-683

LECHNIAK, D.

Growth hormone gene polymorphism and reproductive performance of AI-bulls  
Theriogenology, 52, S.1145-1152

LEFIEVRE, L.; BOUSQUET, D.; BRINDLE, Y.; MARIN, N.; SULLIVAN, R.  
Characterization of a bull epididymal sperm protein involved in fertilization  
Biol.reprod.1996, 54, Suppl.1:abstract 54

LEIBFRIED-RUTTLEDGE, ML.; CRITSER, E.; PARRISH, JJ.; FIRST, NL.

In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes  
Theriogenology 1989, 31, S.61-74

LERNER, SP.; THAGNE, WV., BAKER, R.; HENSCHEN, T.; MEREDITH, S.;  
INSKEEP, E.; DAILEY, RA.; LEWIS, PE.; BUTCHER, RL.

Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows  
J.Anim.Sci.1986, 63, S. 176-183

LEVIS, DG.

Heterospermic insemination in swine  
Dissertation- Abstracts-international 1976, 37, S.1499-1500

LINDNER, GM. u. WRIGHT, RW, jr.

Bovine embryos morphology and evaluation  
Theriogenology 1983, 20, S.407-411

LINDSEY, BR.; LOONEY, C.; FUNK, DJ.; FABER, DC.; GUE, LS.;  
KRAMER, AJ.

The effect of apparent dominant follicle removal (DFR) prior to FSH treatment  
on superstimulated response in problem donors  
Theriogenology 1994, 41, S.238

LINNENBRINK, B.

Untersuchungen zur Feststellung des Befruchtungsvermögens von Besamungsbullen durch in vitro Befruchtungsversuche mit Rindereizellen  
Diss.Tierärztl.Hochschule Hannover 1990, S.121 ff.

LONERGAN, P.

The application of in vitro fertilization techniques to the prediction of bull fertility  
Reprod.Dom.Anim. 1994, 29, S.12-21

LOUMAYE, E.

The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing-hormone agonists during ovarian hyperstimulation for IVF and ET  
Huma.Reprod. 1990; 5; S.357-376

LUCY, MC; SAVIO, JD.; BADINGE, L.; DE LA SOTA, RL.; THATCHER, WW.

Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle  
J.Anim.Sci. 1992, 70, S.3615-3626

LUCY, MC.; STAPLES, CR.; BECK, J.; HEAD, HH.; DE LA SOTA, R.; THATCHER, WW.

Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin-like growth factor in lactating cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period  
Reprod.Nutr.Dev.1992, 32, S.331-341

LUCY, MC.; STAPLES, CR.; MICHEL, FM.; THATCHER, WW.

Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows  
J.Dairy Sci.1991, 74, S.473-482

LUNSTRA, DD.

Effect of single sire and multiple sire natural mating on pregnancy rate of beef cattle  
Beef-Research-Progress-Report, US-Meat-Animal-Research-Center 1985, 2, 44-45

LUNSTRA, DD.; LASTER, DB:

Influence of single sire and multiple sire natural mating on pregnancy rate of beef heifers  
Theriogenology 1982, 18, S.373-382

MACPHERSON, JW.

Semen placement effects on fertility in bovines  
J.Dairy Sci..May 1968; S.56-59

MANCIAUX, L.; PONSART, C.; GRISOUARD, D.; HUMBLLOT, P.

Paternal influence on embryo yield following superovulation in the Montbelliard breed  
Proc.15<sup>th</sup> meeting of the A.E.T.E.; Lyon, September 1999, S.200 abstr.

MAPLETOFT, R.J. ; BO, GA. u. MURPHY, BD.

The effect of biological activity of gonadotrophins on superovulation in the cow  
Proc. 9<sup>th</sup> Congr.of Anim.Reprod. 1991, 1, S.74-92

MAPLETOFT, R.J.; MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.;  
BURNLEY, C.

The effect of estradiol preparation on follicular wave emergence and superovulatory response in norgestomet-implanted cattle  
Theriogenology 1999, 51, S.411 abstr.

MAPLETOFT, R.J.; NASSER, L.; BO, G.; DEL CAMPO, M.

The effect of LH content in a porcine pituitary extract on superovulatory response to a single subcutaneous injection in beef heifers  
Proc.12<sup>th</sup> int.Cong.Anim.Reprod.1992, S.237-239

MARCUCIO, R.S.; HOPWOOD, R.M.; IGNOTZ, G.G.; CURRIE, W.B.

Translation of zygotically-derived mRNA in a cell cycle specific manner in 2-cell cattle embryos  
J.Reprod.Fert. 1995, 15, S.18 (abstr.)

MARQUANT LE GUIENNE, B.

In vitro fertilization as a tool to evaluate fertility in the bovine  
12<sup>th</sup> I.C.A.R. 1992, The Hague, Kong.Ber.2; S.662-664

MARQUANT LE GUIENNE, B.; GUYADER, C.; HUMBLLOT, P.; GERARD, O.;  
THIBIER, M.

In vitro testing of bull fertility by in vitro fertilization and embryonic development rates  
Proc.6<sup>th</sup> European ET Assoc.1990, S.172

MARSHALL, C.E.; AMANN, R.P.; EVENSON, D.; BALLACHEY, B.E.; FOOTE, R.H.; HOUGH, S.; MILLER, D.J.; AX, R.L.; SAACKE, R.G.

The relationship of semen quality and fertility: A heterospermic study  
Proc.10<sup>th</sup> NAAB Tech.Conf.Artificial Insemination and Reproduction 1988  
S.35-37

MARTIN, P.A.; DZIUK, P.J.

Assessment of relative fertility of males (cockerels and boars) by competitive Mating  
Reprod.Fert.1977, 49, S.323-329

MARTIN, P.A.; REIMERS, T.J.; LODGE, J.R.; DZIUK, P.J.

The effect of ratio numbers of spermatozoa mixed from two males on proportion of offspring  
J.Reprod.Fert.1974, 39, S.251-258

MASSEY, J.M. u. ODEN, A.J.

No seasonal effect on embryo donor performance in the south west region of the USA  
Theriogenology 1984, 21, S.196

MCCAULEY, A.; ZHANG, H.; BELLIN, M.E.; AX, R.L.

Purification and characterization of fertility-associated-antigen in bovine seminal fluid  
Mol.Reprod.Dev. 1999, 54(2), S.145-153

MCMILLAN, WH.u. DONNISON, MJ.  
Understanding maternal contribution to fertility in recipient cattle; development of herds with contrasting pregnancy rates  
Anim.Reprod. Sci. 1999, 57, S.127-140

MILLER, DJ.; BEHNKE, EJ. u. AG.HUNTER  
In vitro fertilization of bovine oocytes to predict bull non-return rates  
J.Dairy Sci.1985, Suppl.1, S.1973 abstr.

MILLER, DJ u. HUNTER, AG.  
Individual variations for in vitro fertilization success in dairy bulls  
J.Dairy Sci.1987, 70, S.2150-2153

MISRA, AK.; MUTHA RAO, M.; KASIRAY, R.; RANGA REDDY, S. u.  
PANT, HC.  
Bull-specific effect on fertilization rate and viable embryo recovery in the superovulated buffalo  
Theriogenology 1999, 52, S.701-707

MITCHELL, BR.; MARTINEZ, DM.; MAPLETOFT, RJ.  
A comparison of estradiol 17-beta and GnRH in synchronizing follicle wave emergence on superovulatory response in Holstein cows  
Theriogenology 1998, 49, S.380

MONCADA ANGEL, AH.  
Endoskopische Untersuchungen beim Rind mit besonderer Berücksichtigung der Superovulation  
Diss.TiHo. Hannover 1979

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J.  
Superovulatory response of cattle  
Theriogenology 1983, 19, S.55-81

MONTY, DE. u. RACOWSKY, C.  
In vitro evaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows  
Theriogenology 1987, 28, S.451-465

MOOR, RM.; KRUIP, TAM.; GREEN, T.  
Intraovarian control of folliculogenesis- Limits to superovulation?  
Theriogenology 1984, 21, S.103-116

MÜLLER, A.  
Untersuchungen zum Einfluß einer ACTH-induzierten Glukokortikoidfreisetzung auf Hormonverläufe und Ovarreaktion bei superovulierten Färsen  
Diss. TiHo Hannover 1990

MÜLLER, C.  
Untersuchungen zur Feststellung der Eignung von Spenderkühen für den Embryotransfer  
Diss.TiHo Hannover 1988

MÜLLER, R.  
Untersuchungen von Einflußfaktoren auf die Embryonenqualität und Versuch zur chromosomalen Geschlechtsbestimmung an Rinderembryonen  
Diss.TiHo Hannover 1989

- MUNKITRICK, R.; NEBEL, RL.; SAACKE; RG  
Effect of microencapsulation on accessory sperm in the zona pellucida  
J.Dairy.Sci. 1992, 75, S.725-731
- MURPHY, BD.; MAPLETOFT, RJ.; MANNS, J.; HUMPHREY, WD.  
Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response  
Theriogenology 1984, 21, S.117-125
- MUSIALEK, G.  
Reproductive competition among males of different strains in the mouse  
Gen.Pol.1969, 10, S.180-183
- NADIR, S.; SAACKE, RG.; BARNE, J.; MULLINS, J.; DEGELS, S.  
Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility and embryo quality in artificially inseminated cattle  
J.Anim.Sci. 1993, 71, S.199-204
- NAKAJIMA, A.; HIRAZUMI, S.; ONODERA, K.; SUZUKI, H.; KUDO, Y.;  
DOMEKI, I.  
The use of bovine Anti-PMSG serum in beef cattle after PMSG-superovulation  
J.Vet.Med.Sci. 1992, 54, S.95-98
- NEHRING, H.; WICKE, I.; STÄHR, B.  
Beeinflussung des Motilitätsverhaltens von Eberspermien durch heterologes Seminalplasma  
Reprod.Dom.Anim. 1994, 29, 182
- NELSON, LD; PICKETT, BW; SEIDEL, GE JR.:  
Effect of heterospermic insemination in cattle  
Anim. Sci. 1975, 40, S.1224-1229
- NEWCOMB, R.  
Investigations of factors affecting superovulation and nonsurgical embryo recovery from lactating British Friesian cows  
Vet.Rec.1980, 106, S.48-52
- NIBART, M.; THUARD, J. ESPOSITO, L.; HERPE; P.; MARREC, C;;  
LEBRUN, D.; ROHOU, A.;  
Bovine embryo sexing and modelization in an attempt to produce female calves by embryo transfer  
Proc.of. the 9<sup>th</sup> meet.A.E.T.E. 1993, Lyon ; S.216
- NIEMANN, H.  
Die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Entwicklungsfähigkeit früher Embryonalstadien von Kanninchen und Rind mit dem FDA- und DAPI-Test  
Diss.TiHo.Hannover 1980
- NIEMANN, H.  
Möglichkeiten und Grenzen des Embryotransfers bei landwirtschaftlichen Nutztieren  
Tierärztl.Umschau 1986, 41, S.625-633

- NIEMANN, H.  
Embryotransfer und assoziierte Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren.  
Handlexikon der tierärztlichen Praxis 1991, Ergänzungsband 187; S.216m-y
- NIEMANN, H. u. MEINECKE, B.  
Embryotransfer bei landwirtschaftlichen Nutztieren  
In:Niemann,H. und B.Meinecke (Hrsg.): Embryotransfer und assoziierte Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren  
Verlag Encke, Stuttgart 1993, S.6-37
- NOLAN, R.; O'CALLAGHAN, D.; DUBY, R.; LONERGAN, P.; BOLAND, MP.  
The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers  
Theriogenology 1998, 50, S.1263-1274
- OGHODA, OK.; NIWA, K.; YUHUARA, M.; TAKAHASHI, S.; KANOYA, K.  
Variations in penetration rates in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after A.I. using frozen semen from different bulls  
Theriogenology 1998, 29, S.1375-1381
- OIKAWA,T.; NUMABE, T.; KIKUCKI, T.; WATANABE, G.; TAYA, K.  
Repeated induction program of superovulation in cattle throughout one year using a progesterone device and porcine pFSH  
Theriogenology 1998, 49, S.382
- O'REILLY, PJ, GRAVES, CN.; DZIUK, PJ  
Heterospermic insemination of rabbit semen as a means of evaluating techniques of semen handling  
J.Reprod.Fert. 1972, 29, 49-56
- OTOI, T.; KOYAMA, K.; YAMAMOTOT, Y.; TACHIKAWA, S.  
Superovulatory response in beef cows following removal of the largest ovarian follicle  
Vet. Rec. 1999, 11, S.402
- PARENT, S.; LEFIEVRE, L.; BRINDLE, Y.; SULLIVAN, R.  
Bull fertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen  
Mol. Reprod. Develop. 1999, 52, S.57-65
- PARRISH, JJ ; FOOTE, RH  
Fertility differences among male rabbits determined by heterospermic insemination of fluorochrome-labeled spermatozoa  
Biolog.Reprod.1985, 46, S.217-225
- PARRISH, JJ.; EID, L.  
In vitro fertilization and ist relationship to bull fertility  
Proc.15<sup>th</sup> Tech. Conf. Artif. Insm. And Reprod. 1994; NAAB, Columbia, S.68-73
- PARRISH, JJ.; KIM, CI.; BAE, I.  
Current concepts of cell-cycle regulation and ist relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development  
Theriogenology 1992, 38, S.277-296

PETR, J.; MIKA, J.; ILEK, J.  
The effect of PMSG priming on subsequent superovulatory response in dairy cows  
Theriogenology 1990, 33; S.1151-1155

PFEIFFER, A.; u. HERZ, A.  
Endocrine actions of opioids  
Horm.metabol.Res. 1984, 16, S.386-397

PIERSON, RA. u. GINTHER, OJ.  
Follicular populations during the estrous cycle in heifers:Time of selection of the ovulatory follicle  
Anim.Reprod.Sci. 1988, 16, S.81-95

PREISINGER, R.  
Environmental and genetic factors affecting the variability in superovulatory response  
43<sup>rd</sup> Annual meeting of A.E.T.E, Madrid 1992, S.13-17

PREISINGER, R.; WICHMANN, U.; HAHN, J.; KALM, E.  
Superovulation: Kann man die Ergebnisse verbessern?  
Tierzüchter 1990, 42, S.534-535

PUTNEY, D; DROST, M. u. THATCHER, W.  
Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cows following ET or AI  
Theriogenology 1989, 31, S.765-778

PUTNEY, DJ.; THATCHER, WW.; DROST, M.; WRIGHT, JM.;  
DE LORENZO, MA.  
Influence of environmental temperature on reproductive performance of bovine embryo donors and recipients in the south west region of the United States  
Theriogenology 1988, 30, S.905-922

QIU , B.; HALES, BF.; ROBAIRE, B.  
Effects of chronic low-dose cyclophosphamide exposure on the nuclei of rat spermatozoa  
Biol.Reprod. 1995, 52, S.33-40

RADNABAZARON, BD.  
Selective fertilization in cows of beef breeds  
Anim.Breed.Abstr. 1951, 19, S.468

RAJAMAHENDRAN, R. u. CALDER, MD.  
Superovulatory responses in dairy cows following ovulation of the dominant follicle of the first wave  
Theriogenology 1993, 40, S.99-109

RAJAMAHENDRAN, R.; CANSEO, RS.; DENBOW, CJ.; GWAZDAUKAS, F.;  
VINSON, WE.  
Effect of low dose of FSH given at the beginning of the estrous cycle and subsequent superovulatory response in holstein cows.  
Theriogenology 1987, 28, S.59-65

RATH, D.; WEITZE, KF.; PENA ALFARO, CE.; ANDRADE MOURA, JC.  
Effects of seminal plasma on the number of accessory sperm cells and fertilization in gilts  
Zuchthygiene 1989, 24, 123-127

REED, HC.; MARCHEST, MG.; JONES, D.  
Pig AI/ natural service „within herd“ fertility investigation  
10<sup>th</sup> Intern.Congr. on. Anim.Reprod. and AI.; 1984, S.379

RENARD, J.P.; MENEZO, Y.  
Attempts to predict the viability of cattle embryos produced by superovulation  
Control of reproduction in the cow  
Martinus, Nijhoff; the Hague, Boston, London 1977

RENARD, JP.; PHILLIPON, A.; MENEZO, Y.  
In vitro uptake of glucose by bovine blastocysts  
J.Reprod.Fertil. 1980, 58, S.161-164

REVELL, SG.  
Heterospermic insemination of cattle using three bulls of the same breed  
Vet.Rec.1993, 133, S.20

ROBERTS, E. u. CARROLL, W.  
A study of hybrid vigor in a cross between Poland China and Duroc Jersey swine  
J. Agrc.Res.1939, 59, S.847-854

ROBERTSON, I. u. NELSON, RE:  
Certification and identification of the embryo  
In: Manual of the International Embryo Transfer Society, 3.Aufl.  
Stringfellow, DA. Und Seidel, SM.(Hrsg.), 1998, IETS, Illinois, S.103-116

ROBL, JM. u. DZIUK, PJ.  
Influence of the concentration of sperm on the percentage of eggs fertilized for three strains of mice  
Gamete Res.1984, 10, S.415-422

ROBL, JM. u. DZIUK, PJ.  
Penetration of mouse eggs at various intervals after insemination as influenced by concentration of sperm and strain of male  
J.Exp.Zool.1987, 242, S.181-187

ROBL, JM. u. DZIUK, PJ.  
Comparison of heterospermic and homospermic inseminations as measures of male fertility  
J.Exp.Zool. 1988, 245, S.97-101

ROMANOWSKY, W.; ROSELIUS, R., HAHN, J.  
Neue Erkenntnisse bei der Auswahl von Hochleistungskühen als Spendertiere für den ET  
Zuchthygiene 1980, 15, S.82-83

RORIE, RW.; LESTER, TD.; LINDSEY, BR. U. R McNEW, RW.  
Effect of timing of artificial insemination on gender ratio in beef cattle  
Theriogenology 1999 , Nr.52, S.1035-1041

ROSCHLAU, K.; ROSELIUS, R.; UNICKI, P.; MICHAELIS, U.; STREHL, R.;  
DEXNE, U.; ROSCHLAU, D.; RINK, N.  
Effektivität von Embryotransferprogrammen: Einfluß der Faktoren  
„Besamungsbulle“ sowie „aufgefundene Eizellen und Embryonen“  
Arch.Tierz., Dummerstorf 1996, 39, S.497-502

RUIGH, L. u. MULLAART, E.  
Removal of dominant follicle of heifers prior to superovulation  
Proc.15<sup>th</sup> meeting EETA 1999, Lyon, S.226 abstr.

SAACKE, RG.; DALTON, J.; NADIR, S.; NEBEL, RL.  
Spermatozoal characteristics important to sperm transport, fertilization and  
early embryonic development  
Gametes- development and function; Sereno Symposia 1998, S.320-335

SAACKE, R.; MARSHALL, CE; VINSON, W.; O'CONNOR, M.; MULLIN, J.;  
CHANDLER, J.; R.AMANN R.WALLACE; H.KELLGREEN ( a)  
Semen quality and heterospermic insemination in cattle  
9<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and artificial insemination,  
Chicago, Febr. 1980, Abstract.

SAACKE, RG.; MARSHALL, CE.; VINSON, W.; O'CONNOR, M.;  
CHANDLER, J.; WALLACE, R.; VINCEL, WN.; KELLGREEN, H. (b).  
Semen quality and heterospermic insemination in cattle  
8<sup>th</sup> Techn.Conf. on A.I. and Reprod. 1980, S.71-78

SAACKE, R. ; NADIR, S.; DALTON, J.; BARNE,J.; NEBEL, RL.  
Involvement of the bull and artificial insemination in fertility and embryo quality  
Ars Veterinaria 1995, Nr.11

SAACKE, R.; NEBEL, RL.; NADIR, S.  
Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo  
quality in ruminants  
Theriogenology 1994, 41, S.45-50

SAACKE,R. ; VINSON,W.; O'CONNOR, M.; CHANDLER, J.; MULLIN, J.;  
AMANN, R.; MARSHALL, CE.; KELLGREEN, H. ( c)  
The relationship of semen quality and fertility- a heterospermic study  
Proceedings of the 8<sup>th</sup> technical conference on artificial insemination and  
reproduction, 1980

SACHER, B. u. H.NIEMANN  
Kontinuierliche FSH-Applikation zur Superovulationsauslösung bei Rind und  
Schaf  
Zuchthygiene 1987, 22, S.108

SACHS, L.  
Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden  
9. Auflage, Springer-Verlag 1999

SADOWSKI, T. u. ROGERS, BJ  
Two-dimensional electrophoretic patterns of seminal plasma proteins of fertile and infertile men  
Biol.Reprod. 1985, 32, Supplement 1, S. 102

SALAMONE, DF.; BROGLIATTI, G.; ADAMS, GP.; MAPLETOFT, RJ.  
Effect of superstimulatory treatment on developmental competence of oocytes from calves during their first year  
Theriogenology 1998, 49, S.383

SAUMANDE, J.; CHUPIN, D.; MARIANA, J.; ORTAVANT, R.; MAULEON, P.  
Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation  
In: Control of reproduction in the cow 1978;  
Verlag Martinus Nijhoff, The Hague 195-224

SAVIO, JD.; BOLAND, MP.; HYNES, N.; MATTIACCI, MR.; ROCHE, JF.  
Will the first dominant follicle of the estrous cycle of heifers ovulate following luteolysis on day 7?  
Theriogenology 1990, 33, S.677-687

SAVIO, JD.; KEENAN, L.; BOLAND, MP.; ROCHE, JF.  
Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers  
J.Reprod.fertil.1988, 83, S.663-671

SCHILLING, E.  
Ergebnisse von Superovulationsbehandlungen- Variabilität und deren Ursachen  
Dtsch.tierärztl.Wochenschrift 1982, 89, S.88-92

SCHILLING, E.; D.SMIDT  
Beurteilung und Lebensfähigkeit früher Embryonalstadien beim Rind  
Zuchthygiene 1979, 14, S.86

SCHMIDT, M.; GREVE, T. u. CALLENSSEN, H.  
Superovulation of cattle with FSh containing standardized LH amount  
Proc 11<sup>th</sup> Int.Cong.Anim.Reprod.& A.I. 1988, 2, S.191

SCHNEIDER, HJ.; CASTLEBERRY, RS.; GRIFFIN, JC.  
Commercial aspects of bovine Embryo Transfer  
Theriogenology 1980, 13, S.73-85

SEIDEL, G.E. JR., ELSDEN, R.P.  
Embryo transfer in Dairy Cattle  
Hoard's dairyman 1989, ISBN 0932147062

SEIDEL, GE.; SEIDEL, SM.; BOWEN, RA.  
Bovine embryo transfer procedures  
Colorado State University Experiment station in cooperation with Animal Reproduction Laboratory  
General Series 975, 1978

SEIDEL,GE.JR.; JOHNSON, LA.; ALLEN, CA., WELCH, GR.; HOLLAND, MB.; BRINK, Z.; CATELL, MP.  
Artificial insemination with X- and Y-bearing bovine sperm  
Theriogenology 1996, 45, S.309

SEIDL, W. ; HEYDORN, KP.  
Gegenseitige Beeinflussung der Komponenten von Ebermischsperma.  
Morphologische Aspekte.  
Zentralblatt für Veterinärmedizin 1978, 25, S.41-47

SETCHELL, BP.; OCCHIO, MJ.; HALL, M.; COURIE, MS.; TUCKER, MJ.;  
ZUPP, JL.  
Is embryonic mortality increased in normal female rats mated to subfertile  
males?  
J.Reprod.Fertil. 1988, 83, S.567-574

SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B.  
In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from  
different donors  
Reprod.Dom.Anim.1993, 28, S.77-84

SHARMA, OP. ; HAYS, RL.  
Heterospermic insemination and its effect on the offspring in rats  
Reprod.Fert.Dec.1975 , 45, S.533-535

SHEA, BF.  
Evaluation of the bovine embryo  
Theriogenology 1981, 15, S.31-37

SHEA, BF.; JANZEN, RE.; McDERMAND, DP.  
Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer  
procedures in Alberta over a nine year period  
Theriogenology 1984, 21, S.186

SHI, DS.; LU, KH.; GORDON, I.  
Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent  
development in vitro  
Theriogenology 1990, 33, S.324

SHI, DS.; LU, KH.; GORDON, I. u. POLGE, C.  
Variation in cleavage and embryonic development of bovine oocytes in vitro  
fertilized with different bull ejaculates  
Theriogenology 1991, 35, S.271abstr.

SIROIS, J.; FORTUNE, JE.  
Ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers monitored by  
real-time ultrasonography  
Biol.Reprod.1988; 39, S.308-317

SIROIS, J.; FORTUNE, JE.  
Lengthening of the bovine estrous cycle with low levels of exogenous  
progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance  
Endocrinology 1990, 127, S.916-925

SLEE, J.  
Some results of multiple mating and superovulation in sheep  
J.Agric.Sci. 1964, 63, S.403-408

SMITH, LC.; OLIVERA-ANGEL, M.; GROOME, NP.; BHATIA, B.; PRICE, CA.  
Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large follicle in cattle

J.Reprod.Fert.1996, 106, S.193-199

SOEDE, NM.; WETZELS, CC.; ZONDAG, W.; HAZELEGER, W.; KEMP, B.  
Effects of a second insemination after ovulation on fertilization rate and accessory sperm count in sows

J.Reprod.Fert. 1995, 105, S.135-140

SPRINGMANN, KH.; VOSS, HJ.; ZEROBINI, K., DOEBELI, M.; WOLTZ, W.  
Effect of PMSG-antiserum on ovulatory response and ovarian hormone levels of heifers superovulated with PMSG following synchronization with progesterones or a prostaglandin

Proc.12<sup>th</sup> Int.Cong.Anim.Reprod., 1, S.269-271

STAIGMILLER, RB. u. ENGLAND, BG.

Folliculogenesis in the bovine

Theriogenology 1982, 17, S.42-52

STAIGMILLER, RP.; BELLOWS, RA.; ANDERSON, GB.; SEIDEL, GE.;  
FOOTE, W.; MENINO, A.; WRIGHT, W.

Superovulation in cattle with equine pituitary extract and pFSH

Theriogenology 1992, 37, 1091-1099

STEWART, DL; SPOONER, RL.; BENNETT, G.; BEATTY, RA.; HANCOCK, J.

A second experiment with heterospermic insemination in cattle

Reprod.Fert. 1974, 36, S.107-116

SUGANO, M. u. SHINOGI, T.

Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single i.m. injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone

Anim.Reprod.Sci.1999, 55, S.175-181

SUMPTION, LJ.

Multiple sire mating in swine: Evidence of natural selection for mating efficiency

J.Agric. Sci.1961, 56, S.31-37

TAYLOR, C.u. RAJAMAHENDRAN, R.

Follicular dynamics and corpus luteum function in pregnant and non-pregnant dairy cows

J.Dairy Sci.1991, 74, S.115-123

THATCHER, WW. u. COLLIER, RJ.

Effects of climate on bovine reproduction

In: Moorow, D.A. (ed), Current Therapy in Theriogenology 1986, S.301-309

TONHATI, H.; LOBO, RB.; OLIVEIRA, HN.

Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows

Theriogenology 1999, 51, S.1151-1156

TEGEGNE, A.

The effect of superovulatory response on embryo recovery and quality in Boran and Boran x Friesian crossbred cows

Theriogenology 1997, 47, S.180

VAN MUNSTER, EB.; STAP, J.; HOEBE, RA.; TE MEERMAN, GJ.; ATEN, JA.  
Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-  
bearing spermatozoa: Potentials and limitations  
Theriogenology 1999, 52, S.1281-1293

VANKAN, DM. u. FADDY, MJ.  
Estimations of the efficacy and reliability of paternity assignments from D.N.A.  
microsatellite analysis of multiple-sire matings  
Anim.Genet.1999, 30(5), S.355-361

VARISANGA, MD.; SUMANTRI, C.; MURAKAMI, M.; FAHRUDIN, M.;  
SUZUKI, T.  
Morphological classification on the ovaries in relation to the subsequent oocyte  
quality for IVF-produced bovine embryos  
Theriogenology, 49, S.1015-1023

VIVANCO, HW.; GREANEY, K.; VARELA, H.  
Explaining the variability in superovulation responses and yield of transferable  
embryos in sheep embryo transfers  
Theriogenology 1994, 41, S.329

WABERSKI, D.; CLAASSEN, R.; HAHN, T.; JUNGBLUT, PW.; PARYIZI, N.;  
KALLWEIT, E.; WEITZE, KF.  
LH profile and advancement of ovulation after transcervical infusion of seminal  
plasma at different stages of estrous in gilts  
j.Reprod.Fert. 1997, 109, S.29-34

WABERSKI, D.; RABELER, J.; PETZOLDT, R.; WEITZ, KF.  
Einfluß von Seminalplasma auf Befruchtungsergebnisse beim Schwein in  
Abhängigkeit vom Intervall Besamung-Ovulation  
Reprod.Dom.Anim.1994, 29, 214

WARFIELD, SJ.; GE. SEIDEL u. ELDTSEN, RP.  
A comparison of two FSH regimes for superovulating cows and heifers  
Theriogenology 1986, 29, S.323

WEGMAN, S.  
Kryokonservierung von Ebersperma: Zusammenhänge zwischen Kryok-  
onservierung und Anpassungszeit von Glycerin sowie Einfluß von  
Mischsperma  
Diss.TiHo-Hannover 1990

WEHNER, GR; WOOD, C.; TEAGUE, A; BARKER, D.; HUBERT, H.  
Efficiency of the ovatec unit for estrus detection and calf sex control in beef  
cows  
Anim.Reprod.Sci. 1997, 46, S.27-34

WICHMANN, U.  
Erhebungen über umweltbedingte und genetische Einflüsse auf die Eignung  
von Spenderkühen im Rahmen des Embryotransfers  
Diss.TiHo Hannover 1990

WILMUT, I.; HUNTER, R.

Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in estrous  
Reprod.Nutr.Dev. 1984, 24, S.461

WILSON, JW.; JONES, AL.; MILLER, DR.

Influence of a dominant follicle on the superovulatory response  
Theriogenology 1990, 33, S.249

WOOLLIAMS, A.; LUO, Z.; VILLANUEVA, B.;

WADDINGTON, D.; BROADBENT, PJ.; MCKELVEY, W.; ROBINSON, J.

Analysis of factors affecting superovulatory responses in ruminants  
J.Agric.Sci. 1995, 124, S.61-70

WRIGHT, JM.

Non surgical embryo transfer in cattle: Embryo-recipient interactions  
Theriogenology 1981, 15, S.43-56

YADAV, MC.; WALTON, J.; LESLIE, KE.

Plasma concentration of LH and progesterone during superovulation of dairy  
cows using follicle stimulating hormone or PMSG  
Theriogenology 1986; 26, S.523-540

ZNANIECKI, R. u. JASKOWSKI, JM.

Factors affecting efficiency of superovulation and embryo collection in dairy  
cows

Medycynia Weterynaryjna 1997, 53:8; 454-457; 27 ref.

## ***Danksagung***

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich Frau PD. Dr. S. Meinecke-Tillmann für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, für den persönlichen Einsatz und die stets freundliche Unterstützung herzlich danken.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Dr. Jan Detterer von der Embryotransferstation des VOST- Georgsheil für sein Bemühen um das Entstehen dieser Arbeit und seine immer freundliche und zuverlässige Unterstützung.

Dem VOST- Georgsheil und seinen Mitarbeitern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, möchte ich ebenfalls danken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Biometrie der TiHo Hannover danke ich für die Beratung und ihre große Hilfsbereitschaft in statistischen Fragen.

Meinen Geschwistern danke ich für ihre Geduld mit mir beim Fertigstellen dieser Arbeit am PC.

Vera Schneider danke ich für das tapfere Korrekturlesen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei all den, nicht einzeln erwähnten Menschen bedanken, die mir mit Rat und Tat und vor allem moralischer Unterstützung in dieser Zeit zur Seite standen. Was nicht immer einfach war.

Teile dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht in:

S. HUPKA, S. MEINECKE-TILLMANN; J. DETTERER, B. MEINECKE  
Factors influencing the success of commercial ET in German Holstein cattle  
Reprod.Dom.Anim. 2000, Nr.35, S. 45 abstr.

