

# Próba uzyskania i wczesnego rozpoznawania ciąży bliźniaczej u jałówek po indukowanych owulacjach mnogich

ANDRZEJ MAX

Katedra Rozrodu Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Max A.

## Pregnancies in heifers after induced poly-ovulation

Summary

The aim of the research was to induce poly-ovulation in 28 heifers using 500-800 U.I. of PMSG immediately after ultrasound-guided puncture of follicles > 4 mm. Twenty five heifers were inseminated under field conditions following the detection of oestrus. 4 heifers had not ovulated. In 14 (50%) of the animals poly-ovulation was observed and in 13 of them AI was carried out, 7 (54%) were diagnosed as pregnant. Subsequently, three of these heifers lost their embryos. Finally, eight animals calved. Two of them (25%) delivered twins. At the early stage (19-21 days post AI) ultrasonographic detection of pregnancy was not successful. Pregnancy or non-pregnancy was impossible to detect due to the existence of nonechogenic fields in the uterus. Multiple versus single pregnancy could be distinguish as early as 28-42 days post AI with confirmation at 52-69 days post AI. Amongst the 200 calvings of the heifers in the experimental herd only one pair of twins (0.5%) was noted over the last four years. It appears that the combination of follicle puncture and stimulation with subliminal doses of PMSG could be used for inducing twin pregnancies, but the results do not allow to put this procedure into practice because of low fertility and low rate of calving.

**Keywords:** cattle, poly-ovulation, twinning, ultrasonography

Bydło należy do zwierząt jedнопłodowych, jednak ciąży mnogie, a przede wszystkim bliźniacze, bywają u tego gatunku donoszone, a urodzone z nich potomstwo jest zdolne do dalszego życia i rozwoju. Najczęściej ciąża bliźniacza jest skutkiem podwójnej owulacji. Sporadycznie u ssaków w pęcherzyku może znajdować się więcej niż 1 oocyt. Istnieje też możliwość spontanicznego podziału zapłodnionej komórki jajowej lub zarodka i rozwój bliźniąt monogenetycznych. Częstotliwość występowania ciąży podwójnej jest zróżnicowana w zależności od rasy, czynników środowiskowych, osobniczych i wynosi najczęściej kilka procent (20). W niektórych populacjach była rysuje się tendencja do wzrostu odsetka porodów bliźniaczych, częściowo przy udziale czynników genetycznych (16). Niedawno pojawił się pogląd, że wysoka mleczność usposabia do podwójnej owulacji i ciąży (9). Pomimo niekorzystnych zjawisk związanych z porodami bliźniaczymi, od wielu dziesięcioleci aż do czasów obecnych trwają poszukiwania metod zwiększenia plenności bydła, w tym przez zwiększenie liczby ciąż mnogich. Wdrożenie wczesnej ich diagnostyki może pozwolić na uniknięcie wielu problemów za

pomocą postępowania profilaktycznego, odpowiedniej pielęgnacji i opieki weterynaryjnej podczas ciąży i porodu (10, 25). Precyzyjne rozpoznanie ciąży bliźniaczej za pomocą badania klinicznego jest trudne. Nowe możliwości w tym zakresie daje ultrasonografia pozwalająca na odróżnienie ciąży pojedynczej od mnogiej podczas badania krów pomiędzy 49 a 55 (4, 15) lub między 50 a 80 dniem (6). Badania USG w kierunku ciąży przeprowadzone głowicą 3,5 MHz u krów po 4 tygodniach od inseminacji, wykazały u zwierząt 2-letnich 100% trafność diagnozy, z jej obniżeniem się wraz z wiekiem od 94,1% u krów 3-letnich do 40% u 7-letnich. Badanie po 5 tygodniach wykazało w tych wszystkich grupach wiekowych 100% dokładność, którą u zwierząt w wieku 8 lat i starszych osiągnięto dopiero po 6 tygodniach od unasiwienia. Stwierdzono też bezbłędnie obecność ciąż bliźniaczych w 7 tygodniu (13). W badaniach sondą doprostopniczą jałówek między 50 a 80 dniem uzyskano 96% trafność diagnozy ciąży pojedynczej i 90% ciąży bliźniaczej (6). Autorzy uważają ten termin za właściwy dla ustalania liczby płodów. U 10% (8/80) jałówek nie było możliwe wykonanie badania USG, nie we wszystkich

też przypadkach było możliwe policzenie płodów. Technika ultrasonograficzna była też wykorzystywana do bezpośrednich manipulacji na jajnikach, w tym do punkcji pęcherzyków jajnikowych, a przez to likwidacji wpływu pęcherzyka dominującego w procedurach stymulacji egzogennymi gonadotropinami (18, 21).

Celem pracy była indukcja polio-wulacji za pomocą skojarzonej metody punkcji pęcherzyków jajnikowych oraz stymulacji niskimi dawkami PMSG i uzyskanie ciąży bliźniaczych oraz rozpoznanie możliwości wczesnej ultrasonograficznej diagnostyki ciąży.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono w fermie bydła RZD Goździe. Wykorzystano 28 jałówek rasy holsztyńsko-fryzyskiej i jej krzyżówek, przeznaczonych do rozrodu, z obecnymi na jajnikach ciałkami żółtymi stwierdzonymi badaniem klinicznym i ultrasonograficznym. Po premedykacji 2% ksylazyną (Rompun-Bayer, Rometar-Społa) za pomocą punkcji pod kontrolą USG usuwano płyn pęcherzykowy z pęcherzyków o średnicy > 4 mm (dzień 0). Stosowano pompę podciśnienia Cook KMAR-5100 (wartość podciśnienia 50-75 mm Hg). W tym samym dniu podawano domięśniowo PMSG (Serogonadotropin-Biowet, Folligon-Intervet) w dawkach 500-800 j.m. W dniu 2 jałówki otrzymały jednorazowo PGF $2\alpha$  (Gabbrostim-Veterm, Bioestrophan-Biowet). W rui postymulacyjnej (obserwacja rui prowadzona przez pracowników fermy) 25 jałówek poddano unasieleniu przez miejscowego inseminatora przy użyciu nasienia mrożonego. W dniach 8-11 po unasieleniu przeprowadzano badanie ultrasonograficzne jajników, oceniając i licząc struktury jajnikowe, w tym ciała żółte jako wskaźnik przebytej owulacji. Badanie kliniczne i ultrasonograficzne (ultrasonograf Aloka z głowicą liniową 5 MHz) w kierunku ciąży przeprowadzono: I – w dniach 28-42 po unasieleniu, II – w dniach 52-69 po unasieleniu u jałówek uznanych za cielne w I badaniu). U 17 jałówek przeprowadzono dodatkowo wcześniejsze badanie ultrasonograficzne w dniach 19-21 po unasieleniu w celu ewentualnego zaobserwowania wczesnych objawów ciąży.

### Wyniki i omówienie

Spośród 25 jałówek, które poddano unasieleniu w rui postymulacyjnej, u 4 zwierząt nie doszło do owulacji. Polio-wulacja wystąpiła u 13 unasielonych jałówek (tab. 1). W I i II badaniu na ciążę stwierdzono 7 (54%) cielnym. U 2 z nich wystąpiły następnie objawy rui i kolejne przeprowadzone badania wykazały brak ciąży. Pięć (38%) zwierząt zostało ostatecznie uznane za cielne po jednorazowym unasieleniu w rui

Tab. 1. Wyniki jednorazowego unasielenia jałówek z indukowaną owulacją mnogą (n = 13)

L-p.	Liczba ciałek żółtych	Badanie na ciążę		Uwagi
		I	II	
1	3	nc		następnie zacielona
2	5	nc		następnie zacielona
3	5	c	c (2?)	następnie nc; sprzedana
4	2	c (1)	c (1)	wycielona (1)
5	8	nc		następnie zacielona
6	6	c (2-3)	c	następnie nc; sprzedana
7	5	c (2-3)	c (3)	następnie nc; sprzedana
8	6	c (2)	c (2)	wycielona (2)
9	6	nc		poprzednio unasielona 2×; sprzedana
10	2	c (1)	c (1)	wycielona (1)
11	2	nc		następnie unasielona 3×; nc; sprzedana
12	2	nc		poprzednio unasielona 3×; sprzedana
13	2	c (2)	c	wycielona (2)

Objaśnienia: c – cielna (liczba płodów), nc – niecielna

postymulacyjnej, u 3 (60%) spośród nich stwierdzono ciążę mnogą; z czego u jednej jałówki po 4 miesiącach od II badania zdiagnozowano brak ciąży. Z 8 unasielonych jałówek z pojedynczą owulacją, zacieliła się 1 (12,5%). Wśród inseminowanych jałówek 17 unasielono po raz pierwszy; 7 (41%) spośród nich zacieliło się.

Rozpoznanie ciąży bliźniaczej u bydła pozwala na wyselekcjonowanie zwierząt w celu zapewnienia im odpowiedniego żywienia i kontroli porodu (4). Day i wsp. (5) wskazują na niską czułość (49,3%) palpacyjnej diagnostyki ciąży bliźniaczej, przy jednocześnie wysokiej swoistości (99,4%) badania klinicznego. Podjęta w badaniach własnych próba wczesnej (w dniach 19-21 po unasieleniu) ultrasonograficznej diagnostyki ciąży nie powiodła się. Wczesna diagnoza ciąży za pomocą USG, od 16-18 dnia przy użyciu głowicy 7,5-5 MHz, bazuje na wykryciu delikatnych nieechogenicznych linii szerokości 1,5-2,0 mm w świetle macicy, powiększających się następnie do nieechogenicznych obszarów pęcherza płodowego. Te wczesne objawy ciąży mogą być jednak nie zauważone, jak też pomyłone z normalnie występującym w niewielkich ilościach płynem wewnątrzmacicznym (11, 17). Znajduje to potwierdzenie w badaniach własnych. Z uwagi na brak możliwości wczesnego rozpoznania ciąży przy użyciu ultrasonografu Aloka z głowicą 5 MHz, postanowiono część jałówek poddać badaniu za pomocą aparatu Pie Medical z głowicą o zmiennej czę-



stotliwości 5/7,5 MHz. Obecność płynu w macicy w 20-21 dniu po unasienieniu obserwowano u 3 zwierząt, które przejawiały w tym czasie objawy rui oraz u jednej jałówki z obecnym ciałkiem żółtym, którą następnie uznano za cielną; u pozostałych 3 jałówek z ciałkami żółtymi nie stwierdzono obecności płynu; 2 z nich okazały się cielnymi w badaniu 34-35 dnia po unasienieniu. We wczesnym badaniu USG (w dniach 19-21), na podstawie obecności w macicy nieechogenicznych obszarów dochodzących nawet do 13-15 mm szerokości lub też ich braku, nie udało się stwierdzić ani wykluczyć ciąży. U 3 jałówek badanych w 29 dniu po unasienieniu stwierdzono obecność płynu w macicy, bez widocznych zarodków; palpacyjnie stwierdzono u nich słabo wyrażone objawy mogące sugerować ciążę: asymetria rogów, rozszerzenie w obrębie 1 rogu, cieńsza ściana macicy w miejscu rozszerzenia; 2 uznano za cielne, co potwierdziło badanie późniejsze, 1 zaś za prawdopodobnie cielną, co wykluczono badaniem późniejszym. Każdorazowo płyn był widoczny zarówno przy użyciu sondy o częstotliwości 5 MHz, jak i 7,5 MHz. Izaik i wsp. (14), badając krowy w 27 dniu ciąży głowicą 5 MHz, obserwowali u 90% zwierząt uznanych później za cielne tylko pęcherze płodowe, bez widocznych zarodków.

Davis i Haibel (4) za najwłaściwszy termin badania w kierunku ciąży mnogiej uważają dni 49-55 po unasienieniu. W badaniach własnych odróżniano ciążę mnogą od pojedynczych najwcześniej między 28 a 42 dniem po unasienieniu, z powtórным badaniem w dniach 52-69.

Według Buscha i wsp. (3) po egzogennej stymulacji hormonalnej mającej na celu otrzymanie ciąży bliźniaczych, korzystne jest uzyskanie 2-4 owulacji. Autorem tym udało się osiągnąć taki wynik u 54% krow po zastosowaniu 1000 lub 1500 j.m. PMSG podzielonych na 2 dawki co 24 h i luteolizie za pomocą PGF $2\alpha$ ; zwierzęta, które otrzymały łączną dawkę 1000 j.m. PMSG w tym doświadczeniu nie przekroczyły liczby 4 owulacji. We wcześniejszych badaniach własnych (22) po zastosowaniu takiej samej dawki – 1000 j.m. PMSG, lecz podanej jednorazowo, na 20 zwierząt u 10 wystąpiły ponad 4 owulacje, u 6 zaś było 0-1 owulacji, tylko u 4 (20%) jałówek zanotowano 2-4 ciałek żółtych. Także w obecnych badaniach, u zwierząt stymulowanych podprogowymi dawkami PMSG (500-800 j.m.) po uprzedniej punkcji pęcherzyków, tylko u 21% jałówek owulowały 2-3 pęcherzyki, u pozostałych zwierząt z polioowulacją (25%) owulowało 5-8 pęcherzyków. Zaobserwowano, że osiągnięcie wysokiego odsetka zwierząt z owulacjami mnogimi powoduje jednocześnie wzrost bezwzględnej liczby owulacji u poszczególnych zwierząt. Zmniejszenie dawki gonadotropiny w celu ograniczenia bezwzględnej liczby owulacji wiąże się jednocześnie ze zmniejszeniem się odsetka zwierząt reagujących polioowulacją.

Niska zapłodnialność u zwierząt doświadczalnych mogłaby sugerować negatywny wpływ zastosowanej

procedury, w tym manipulacji w obrębie pochwy i macicy, a także punkcji jajników. W poszukiwaniu przyczyn należałoby też uwzględnić nieadekwatność terminu unasieniania do czasu owulacji (1, 2, 29). Kolejną przyczyną niskiej płodności może być obumieralność zarodkowa, np. w przypadku ciąży mnogich na tle zbyt małej przestrzeni wewnątrz macicy. Poprawie tych stosunków miałyby służyć zwiększona migracja zarodków (do 18 dnia po zapłodnieniu) przy ciążyach bliźniaczych w porównaniu z pojedynczymi (23). Mogłoby to tłumaczyć częstsze porody bliźniacze u krow niż u jałówek, na co zwracają też uwagę Schmidt i wsp. (28). Roberts i wsp. (27) sugerują jeszcze inną przyczynę wczesnego obumierania zarodków po owulacjach mnogich zarówno u zwierząt naturalnie wielopłodowych, jak też jednopłodowych poddanych superstymulacji. Jest nią mianowicie zapładnianie poszczególnych komórek jajowych w różnym terminie, co prowadzi do zróżnicowanego wieku zarodków, z których część (opóźnionych w rozwoju) po zejściu z jajowodu do jamy macicy natrafia na niewłaściwe, a nawet toksyczne dla siebie środowisko, gdyż skład wydzieliny macicznej zmienia się bardzo szybko, synchronicznie z rozwojem ciąży.

Spośród 38 jałówek z tego gospodarstwa nie poddanych punkcji i stymulacji PMSG inseminowanych po raz pierwszy w tym samym okresie, co zwierzęta doświadczalne, zacieliło się po pierwszym unasienieniu 21 (55,3%). Ta niewysoka skuteczność inseminacji porównywalna do 41% w grupie zwierząt doświadczalnych ( $p > 0,05$ ) mogłaby z kolei sugerować istnienie przyczyn zewnętrznych, niezależnie od zastosowanej procedury.

Day i wsp. (5) wskazują na zwiększone (2,8 razy) ryzyko obumieralności płodów bliźniaczych w porównaniu z pojedynczymi i wysoką śmiertelność okołoporodową. Natomiast Sreenan i Diskin (30) po przeniesieniu zarodków krowom unasienionym 7 dni wcześniej, nie wykazali, by rozwój 2 zarodków w jednym lub dwóch rogach macicy wpływał na straty ciąży w ogóle lub bliźniąt. W badaniach nad pozyskaniem ciąży mnogich u 15 jałówek zdiagnozowano w 45 dniu: ciążę 1-płodową u 9 zwierząt, 2-płodową u 5 i 4-płodową u 1. Z nich urodziło się 7 pojedynczych i 4 pary bliźniąt. Spośród ciąży mnogich stracie uległy 1 para bliźniąt i czworaczki (24). Wildt i wsp. (31) uzyskali w doświadczeniu od 9 krow z prowokowaną mnogą owulacją 1 parę bliźniąt. Reichenbach i wsp. (26) otrzymywali ciążę bliźniaczą drogą przenoszenia zarodków. Spośród 9 ciąży podwójnych otrzymanych po wszczępieniu 2 zarodków do 1 rogu, 1 została donoszona, 8 zaś uległo poronieniu. Ogółem uzyskali 10 par bliźniąt na ponad 80 urodzonych cieląt. Wydaje się, że ciążę bliźniaczą stanowią fizjologiczną granicę plenności współczesnych ras bydła. Jak podają Holland i Odde (12), trojaczkę stwierdzano u bydła mięsnego raz na 107 000 porodów, zaś czworaczki 1/750 000. Pięcioraczek nie wykazano u ras mięsnych, natomiast u

mlecznych ocenia się ich występowanie na 1/60 000 000 porodów. Liczniejszych porodów nie opisano. Echternkamp (7) po stymulacji 283 krów za pomocą FSH-P uzyskał 138 (48,8%) cielnych (diagnoza ciąży za pomocą USG w 45-60 dniu po kryciu), przy czym stwierdzono ciąży pojedyncze: 52, bliźniacze: 29, trojacze: 17 i czworaczki: 2. Uzyskano urodzenia pojedyncze: 47, bliźniacze: 22, trojacze: 9, czworaczki: 7 i pięcioraczki: 1. Wraz ze wzrostem liczebności owulacji ponad 2, wzrastała częstotliwość obumieralności zarodków i poronień. Autor wskazuje też na możliwość utraty całej ciąży mnogiej. Scholz i Busch (29) stymulowali ciąży bliźniacze za pomocą PMSG (1300 j.m. podane w 2 dawkach) i stwierdzili między 3-7 a 20-23 dniem spadek odsetka zwierząt cielnych z 73,3 na 38,9, zaś odsetka ciąży mnogich z 40 na 19. W badaniach własnych stwierdzono 3 przypadki całkowitej utraty ciąży uznanej wcześniej u 2 jałówek za mnogą i u 1 za przypuszczalnie mnogą. Może tu zachodzić, przynajmniej częściowo, domniemanie, że były to ciąży wielopłodowe, gdyż towarzyszyła im obecność 4-6 ciałek żółtych. Pozostałe jałowki w liczbie 8 wycieliły się, z czego 2 (25%) urodziły bliźnięta.

U jałówek notuje się występowanie spontanicznych porodów bliźniaczych na poziomie około 1% (8, 19). W stadzie, w którym przeprowadzano badania własne, na przestrzeni 4 poprzednich lat zanotowano u krów na 510 wycieleń 15 bliźniaczych, co stanowi 2,9%, a u jałówek na 200 porodów 1 bliźniaczy, co stanowi 0,5%. Wydaje się zatem możliwe zwiększenie odsetka wycieleń podwójnych u bydła za pomocą postępowania biotechnologicznego. Do indukowania ciąży bliźniaczych możliwe jest wykorzystanie metody łączącej punkcję pęcherzyków jajnikowych ze stymulacją podprogowymi dawkami PMSG, jednak uzyskane wyniki nie upoważniają do wdrożenia zastosowanej procedury z uwagi na niską płodność i małą liczbę wycieleń.

## Piśmiennictwo

- Adams G. P., Nasser L. F., Bo G. A., Del Campo M. R., Mapletoft R. J.: Superovulatory response of ovarian follicles of wave 1 wersus wave 2 in heifers. *Theriogenology* 1994, 42, 1103-1113.
- Bousquet D., Milovanov C., Bell J. C., Durocher J., Smith L. C.: Nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes aspirated from large follicles in superovulated heifers. *Theriogenology* 1995, 43, 172-172.
- Busch W., Belka W., Grajcarek K., Scholz G.: Untersuchungen zur Induktion von Polyovulation beim Rind mit dem Ziel der Erzeugung von Zwillingsschwangerschaften. *Mh. Vet.-Med.* 1987, 42, 812-818.
- Davis M. E., Haibel G. K.: Use of real-time ultrasound to identify multiple fetuses in beef cattle. *Theriogenology* 1993, 40, 373-382.
- Day J. D., Weaver L. D., Franti C. E.: Twin pregnancy diagnosis in Holstein cows: Discriminatory powers and accuracy of diagnosis by transrectal palpation and outcome of twin pregnancies. *Can. Vet. J.* 1995, 36, 93-97.
- Dobson H., Rowan T. G., Kippax I. S., Humblot P.: Assessment of fetal number, and fetal and placental viability throughout pregnancy in cattle. *Theriogenology*, 1993, 40, 411-425.
- Echternkamp S. E.: Fetal development in cattle with multiple ovulations. *J. Anim. Sci.* 1992, 70, 2309-2321.
- Eddy R. G., Davies O., David C.: An economic assessment of twin births in British dairy herds. *Vet. Rec.* 1991, 129, 526-529.
- Fricke P. M., Wiltbank M. C.: Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology* 1999, 52, 1133-1143.
- Gregory K. E., Echternkamp S. E., Dickerson G. E., Cundiff L. V., Koch R. M., Van Vleck L. D.: Twinning in cattle: III. Effects of twinning on dystocia, reproductive traits, calf survival, calf growth and cow productivity. *J. Anim. Sci.* 1990, 68, 3133-3144.
- Griffin P. G., Ginther O. J.: Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. *J. Anim. Sci.* 1992, 70, 953-972.
- Holland M. D., Odde K. G.: Factors affecting calf birth weight: a review. *Theriogenology* 1992, 38, 769-798.
- Hughes E. A., Davies D. A. R.: Practical use of ultrasound in early pregnancy in cattle. *Vet. Rec.* 1989, 124, 456-458.
- Izaikae Y., Suzuki O., Shimada K., Takenouchi N., Takahashi M.: Observation by ultrasonography of embryonic loss following the transfer of two or three embryos in beef cows. *Theriogenology* 1991, 36, 939-947.
- Kadokawa H., Minezawa M., Takahashi H., Sasaki O., Kariya T.: Analysis of the occurrence of twinning among single female calves born from multiple embryo transfer. *Theriogenology* 1993, 39, 239-239.
- Karlens A., Ruane J., Klemetsdal G., Heringstad B.: Twinning rate in Norwegian cattle: frequency, (co)variance components, and genetic trends. *J. Anim. Sci.* 2000, 78, 15-20.
- Kastelic J. P., Bergfeldt D. R., Ginther O. J.: Ultrasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology* 1991, 35, 569-581.
- Kim I. H., Choi S. H., Yeon S. B., Park G. H., Lee D. W., Ryu I. S., Lee C. S., Son D. S.: Removal of the dominant follicle prior to superstimulation promotes follicular growth and ovulation in holstein cows. *Theriogenology*, 2000, 53, 498-498.
- Kuźma R., Kuźma K.: Występowanie wycieleń mnogich u krów mlecznych w warunkach naturalnych i ich wpływ na poród, okres poporodowy i płodność. *Przeg. Hod.* 1994, 62, 1-5.
- Max A.: Ciąża bliźniacza u bydła. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 85-88.
- Max A.: *Medycyna Wet.*: Wpływ punkcji pęcherzyków jajnikowych na folikulogenezę u krów niestymulowanych i stymulowanych progową dawką PMSG. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 798-803.
- Max A., Jurka P., Witkowski M., Ptaszyńska M., Boryczko Z., Romanowicz-Barcikowska K.: Próba wywołania ograniczonej poliowulacji u jałówek. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 221-223.
- Mc Millan W. H., Peterson A. J.: Evidence for a high frequency of embryo migration in cattle after uni-lateral twin embryo transfer. *Theriogenology* 1995, 43, 278-278.
- Morris D. G., Mc Dermott M. G., Diskin M. G., Morrison C. A., Swift P. J., Sreenan J. M.: Effect of immunization against synthetic peptide sequences of bovine inhibin  $\alpha$ -subunit on ovulation rate and twin-calving rate in heifers. *J. Reprod. Fert.* 1993, 97, 255-261.
- Nakanishi Y., Watanabe S., Aakagi S.: Effects of twin calving on post-partum adrenal function and reproductive performance in cows. *Theriogenology* 2000, 53, 313-313.
- Reichenbach H.-D., Liebrich J., Berg U., Brem G.: Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1992, 95, 363-370.
- Roberts R. M., Schalue-Francis T., Francis H., Keisler D.: Maternal recognition of pregnancy and embryo loss. *Theriogenology* 1990, 33, 175-183.
- Schmidt M., Greve T., Avery B., Beckers J. F., Sulon J., Hansen H. B.: Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 1996, 46, 527-539.
- Scholz G., Busch W.: Versuche zur hormonellen Induktion von Zwillingsschwangerschaften beim Rind. *Mh. Vet.-Med.* 1988, 43, 568-571.
- Sreenan J. M., Diskin M. G.: Effect of unilateral or bilateral twin embryo distribution on twinning and embryo survival rate in the cow. *J. Reprod. Fert.* 1989, 87, 657-664.
- Wildt D. E., Woddy H. D., Dukelow W. R.: Induction of multiple ovulation in the cow with single injections of FSH and HCG. *J. Reprod. Fert.* 1975, 44, 583-586.