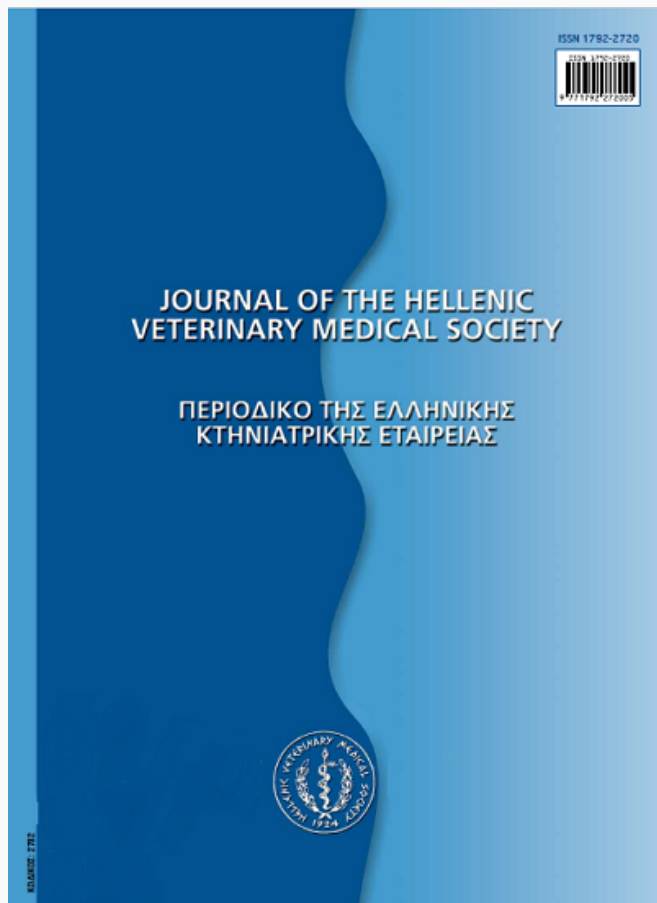


Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 53, No 3 (2002)



Induction of multiple ovulation in rabbits using PMSG and hCG

A. SARATSI (Α. ΣΑΡΑΤΣΗ), Th. TSILIGIANNI (Θ. ΤΣΙΛΙΓΙΑΝΝΗ), U. BESENFELDER, A. ANASTASIADIS (Α. ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΔΗΣ), E. VAINAS (Ε. ΒΑΪΝΑΣ), G. BREM

doi: [10.12681/jhvms.15377](https://doi.org/10.12681/jhvms.15377)

Copyright © 2018, A SARATSI, Th. TSILIGIANNI, U BESENFELDER, A ANASTASIADIS, E VAINAS, G BREM



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

To cite this article:

SARATSI (Α. ΣΑΡΑΤΣΗ) A., TSILIGIANNI (Θ. ΤΣΙΛΙΓΙΑΝΝΗ) T., BESENFELDER, U., ANASTASIADIS (Α. ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΔΗΣ) A., VAINAS (Ε. ΒΑΪΝΑΣ) E., & BREM, G. (2018). Induction of multiple ovulation in rabbits using PMSG and hCG. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 53(3), 228-236.
<https://doi.org/10.12681/jhvms.15377>

Πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας στα κουνέλια με χορήγηση PMSG και hCG

A. Σαράτσιν¹, Θ. Τσιλιγιάννη¹, Besenfelder U.²,
A. Αναστασιάδης³, E. Βαϊνάς³ και Brem G.²

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Στην εργασία αυτή διερευνήθηκε η δυνατότητα αποτελεσματικής εφαρμογής μιας απλοποιημένης μεθόδου πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας (ΠΩ) και συλλογής ωαρίων - ζυγωτών - εμβρύων (Ω-Z-E) κουνελιών και έγινε συσχέτιση του αριθμού και της ποιότητάς τους με το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 35 θηλυκά κουνέλια φυλής New Zealand και 5 αρσενικά φυλής California. Η πρόκληση ΠΩ έγινε με μία ενδομυϊκή έγχυση 20 IU PMSG /Kg ΣΒ. Η Τεχνητή Σπερματέγχυση (ΤΣ) πραγματοποιήθηκε 3 ημέρες αργότερα ταυτόχρονα με μία ενδοφλέβια έγχυση 120 IU hCG / ζώο. Τα θηλυκά κουνέλια θανατώθηκαν 19 h μετά την ΤΣ και τα Ω-Z-E συλλέχθηκαν με έκπλυση των ωαγωγών. Το 54,29 % των θηλυκών κουνελιών εκδήλωσαν ΠΩ (ομάδα Α), το 40,00 % δεν είχαν την αναμενόμενη (< 10 ωχρά σωμάτια) αντίδραση (ομάδα Β) και το 5,71 % δεν είχαν καμία αντίδραση (ομάδα Γ). Ο μέσος αριθμός των Ω-Z-E που συλλέχθηκαν από τα θηλυκά κουνέλια της ομάδας Α ήταν $18,53 \pm 10,77$ και από εκείνα της ομάδας Β ήταν $6,69 \pm 5,49$ ($P < 0,05$). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε διαφορά ανάλογα με το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου μεταξύ των ζώων κάθε ομάδας. Δεν παρατηρήθηκε σχέση μεταξύ του χρώματος του βλεννογόνου των χειλέων του αιδοίου και του ποσοστού των ζώων που εκδήλωσαν ΠΩ και εκείνων που δεν είχαν την αναμενόμενη αντίδραση. Στα κουνέλια της ομάδας Α, το μεγαλύτερο ποσοστό ($P < 0,05$) Ω-Z-E συλλέχθηκε από αυτά με κόκκινο χρώμα του βλεννογόνου των χειλέων του αιδοίου (96,20%) και το μικρότερο από εκείνα με ιώδες (66,08%). Ωστόσο, τα ποσοστά των κατάλληλων για περαιτέρω χειρισμούς ζυγωτών - εμβρύων (Z-E) δε διέφεραν με βάση το χρώμα του αιδοίου και κυμάνθηκαν από 65,71% έως 72,67%. Στα κουνέλια της ομάδας Β, τα ποσοστά των Ω-Z-E δε διέφεραν με βάση το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου και κυμάνθηκαν από 84,00 % - 96,43 %· διέφεραν όμως σημαντικά ($P < 0,05$) τα ποσοστά των κατάλληλων Z-E, τα οποία κυμάνθηκαν από 33,30 % στα κουνέλια με ροδαλό χρώμα αιδοίου μέχρι 84,38 % σε εκείνα με ιώδες. Συμπεραίνεται ότι η μέθοδος αυτή έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα και επιπλέον είναι δυνατή η επιλογή των ζώων δωτών με βάση το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου.

Λέξεις ευρετηρίασης: Κουνέλια, πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία, PMSG

Induction of multiple ovulation in rabbits using PMSG and hCG

Saratsi A.¹, Tsiligianni Th.¹, Besenfelder U.²,
Anastasiadis A.³, Vainas E.³ and Brem G.²

ABSTRACT. In the present study, the feasibility of the effective use of a simplified method for multiple ovulation and for the collection of oocytes-zygotes-embryos (O-Z-E) was investigated. The relationship between the number and quality of O-Z-E and the color of the mucosa of the vulva was also studied. Thirty five New Zealand does and 5 California bucks were used. Does were given one dose of 20 IU/Kg BW of PMSG i.m. Artificial insemination (AI) and administration of a dose of 120 IU/animal of hCG i.v. were carried out 3 days later. Does were sacrificed 19h after AI and the O-Z-E were collected by flushing of the oviducts. 54,24% of the does presented multiple ovulation (Group A), 40,00% did not present the expected (< 10 corpora lutea) reaction (group B) and 5,71% presented no reaction at all to hormone administration. The mean values of O-Z-E collected was $18,53 \pm 10,77$ in group A and $6,69 \pm 5,49$ in group B ($P < 0,05$). However, the mean values of O-Z-E in each group were similar in does presenting different color of the mucosa of the vulva. The color of the mucosa of the vulva was not related to multiple ovulation rates in both groups. In group A, the highest ($P < 0,05$) percentage of O-Z-E was collected from does presenting red color of the mucosa of the vulva (96,20%) and the lowest from does presenting purple color (66,08%). However, the color of the mucosa of the vulva did not affect the percentage of zygotes-embryos (Z-E) that were appropriate for use and ranged from 65,71 to 72,67%. In group B, the color of the mucosa of the vulva did not affect the percentage of O-Z-E, that ranged from 84,00 to 96,43%. However, the percentage of Z-E that were appropriate for further use (a Z-E) was significantly different ($P < 0,05$) and ranged from 33,30% in does presenting rosy color to 84,38% in does presenting purple color of the mucosa of the vulva. We conclude that, the results of this method are satisfactory and the color of the mucosa of the vulva may be used as a factor in the selection of donors.

Key words: rabbits, does, multiple ovulation, PMSG

¹ Κλινική Μαιευτικής και Τεχνητής Σπερματέγχυσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Α.Π.Θ.

² Institute of Animal Breeding and Genetics, University of Animal Science, Vienna, Austria

³ ΕΘΙΑΓΕ Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης

¹ Clinic of Obstetrics and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotelian University of Thessaloniki

² Institute of Animal Breeding and Genetics, University of Animal Science, Vienna, Austria

³ NAGREF Veterinary Research Institute, Thessaloniki

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συνεχώς αυξανόμενη προτίμηση από τους καταναλωτές στα λευκά κρέατα συνέβαλε στη δημιουργία βιομηχανικής μορφής κονικλοτροφικών επιχειρήσεων. Επιπλέον, το κουνέλι αποτελεί σε πολλές περιπτώσεις το πειραματόζωο επιλογής, επειδή είναι ζώο πολυοιστρικό και πολυδυμώτοκο, έχει μικρό μεσοδιάστημα μεταξύ των τοκετών και χαμηλό κόστος εκτροφής. Όσον αφορά την έρευνα στον τομέα της βιολογίας αναπαραγωγής και της βιοτεχνολογίας, η ανάπτυξη νέων τεχνικών, όπως η λαπαροσκοπική μεταφορά εμβρύων και η γενετική μηχανική, έχει προσδώσει σημαντικό ρόλο στο κουνέλι ως πειραματόζωο (Lieble 1996).

Βασική προϋπόθεση για την επιτυχή εξέλιξη των προγραμμάτων αυτών είναι η ανάπτυξη και η τυποποίηση ενός αποτελεσματικού σχήματος πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας (ΠΩ). Με τον τρόπο αυτό, καθίσταται δυνατή η σταθερή παραγωγή μεγάλου αριθμού κατάλληλων για περαιτέρω χρησιμοποίηση ωαρίων - ζυγωτών - εμβρύων (Ω-Z-E).

Η ωοθυλακιορρηξία στο κουνέλι προκαλείται μέσω της οχείας, η οποία διεγείρει την έκκριση ενός κύματος της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH). Διαπιστώθηκε ότι η ωοθυλακιορρηξία συμβαίνει 10-12 ώρες μετά την καταγραφή της μέγιστης τιμής LH. Για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας στο κουνέλι έχουν χρησιμοποιηθεί η ανθρώπιος χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) και η LH (Hagen 1974, Boussit 1989, Σφαιρόπουλος 1991).

Η ανταπόκριση των ωοθηκών στην αγωγή πρόκλησης ΠΩ αποτελεί το σημαντικότερο μη ελεγχόμενο παράγοντα, ο οποίος επηρεάζει την παραγωγή του επιθυμητού αριθμού κατάλληλων Ω-Z-E. Υπάρχει μεγάλη ατομική παραλλακτικότητα σε ό,τι αφορά στην αντίδραση των ωοθηκών στην αγωγή πρόκλησης ΠΩ. Η παραλλακτικότητα αυτή οφείλεται σε ενδοκρινολογικούς παράγοντες, όπως τα επίπεδα των ορμονών που ελέγχουν τον οιστρικό κύκλο και σε ατομικούς παράγοντες, όπως η γενετική προδιάθεση, η θρεπτική κατάσταση, το σωματικό βάρος, η ηλικία, η φυλή κ.α. Στο κουνέλι, ιδιαίτερη σημασία δίνεται στην επίδραση που ασκούν οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (θερμοκρασία, υγρασία) και κυρίως οι παράγοντες που προκαλούν καταπόνηση (Schraner 1993, Liebl 1996).

Η πρόκληση ΠΩ στο κουνέλι επιτυγχάνεται με εξωγενή χορήγηση γοναδοτρόπων ορμονών, χοριακής (ορογοναδοτροπίνη έγκυας φοράδας - PMSG), ή υποφυσιακής προέλευσης (χοίρεια ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη - p FSH), σε συνδυασμό με hCG ή LH. Μεγάλη σημασία έχει η χορηγούμενη ποσότητα FSH και PMSG. Η PMSG χορηγείται σε 1 έως 3 δόσεις που κυμαίνεται από 50 ως 120 IU ανά ζώο. Η FSH χορηγείται συνήθως σε 6 ως 8 δόσεις με μεσοδιάστημα 12 ωρών που περιέχουν 0,155-0,5 mg ανά δόση ανά ζώο (Maurer et al 1968a, Maurer et al 1968 b, Fischer 1987, Besenfelder 1990, Carney and Foote 1990, Illera et al 1990, Schmidt et al 1992, Yang et al 1992, Besenfelder et al 1993, Chrenek et al 1998, Kauffman et al 1998).

INTRODUCTION

Rabbits are widely used as laboratory animals because of their favorable reproductive characteristics and their low breeding cost. As far as the research on biology of reproduction and biotechnology is concerned, the development of new techniques, such as laparoscopic embryo transfer and genetic engineering has given a new important role to the rabbit mode (Liebl 1996). The successful realization of experiments in such fields presupposes the creation and standardization of an effective protocol on the induction of multiple ovulation, so as to establish the maximum production of ovas, zygotes and embryos appropriate for further use.

Ovulation in rabbits does not occur spontaneously. It is induced after mating by the secretion of an LH wave. It has been reported that ovulation occurs 10-12 hours after the recorded LH maximum. In order to induce ovulation in does hCG and LH have been used (Hagen 1974, Boussit 1989, Sferopoulos 1991).

The ovarian response to the treatment for induction of multiple ovulation is the most important uncontrollable factor affecting the production of the desired number of ovas-zygotes-embryos (O-Z-E). There is a great individual range when the ovarian response is concerned, which is caused by the fluctuating hormonal levels that control the estrous cycle and/or by other factors, such as genetic predisposition, nutritional condition, body weight, age, race etc. Environmental factors, like fluctuation of temperature and/or relative humidity and especially agents causing stress, are of great importance because of the sensitivity of rabbits to every stressing environmental change (Schraner 1993, Liebl 1996).

Multiple ovulation in does is induced with an administration of a follicular stimulating hormone (FSH or PMSG) in combination with a luteinizing hormone. The dose of the follicular stimulating hormone is of great importance. PMSG is administrated in 1 to 3 doses that range from 50 to 120 IU per animal, while FSH is injected in 6 to 8 doses of 0,155-0,5 mg per animal, every 12 hours ζώο (Maurer et al 1968a, Maurer et al 1968 b, Fischer 1987, Besenfelder 1990, Carney and Foote 1990, Illera et al 1990, Schmidt et al 1992, Yang et al 1992, Besenfelder et al 1993, Chrenek et al 1998, Kauffman et al 1998).

A repeated administration of FSH and hCG may cause various problems, such as an increased number of haemorrhagic and cystic follicles and a profound decrease of the number of ovulating follicles, as well as disorders in the capacitation of spermatozoa and chromosomal abnormalities (Bedford 1970, Wettemann 1970).

The color of the mucosa of the vulva is commonly used by rabbit breeders as sign for the selection of does for mating or insemination. Purple color of the mucosa of the vulva is thought to be a characteristic of estrous. However, the highest pregnancy rates have been recorded from does that presented red color of the mucosa of the vulva by the

Η επαναλαμβανόμενη χορήγηση της FSH και της hCG είναι δυνατόν να προκαλέσει διάφορα προβλήματα στα κουνέλια. Ενδεικτικά αναφέρεται ο αυξημένος αριθμός αιμορραγικών και κυστικών ωοθυλακίων και η σημαντική μείωση του αριθμού των ωοθυλακιορρηξιών, οι διαταραχές στην ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων, καθώς και χρωματοσωματικές ανωμαλίες κατά την ολοκλήρωση της 1ης μειωτικής διαίρεσης (Bedford 1970, Wettemann 1970).

Το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου χρησιμοποιείται από τους κωνικλοτρόφους για την επιλογή των ζώων στα οποία θα γίνει οχεία. Το συμφορημένο αιδοίο, ιώδους χρώματος, θεωρείται χαρακτηριστικό της εκδήλωσης οίστρου. Ωστόσο, τα υψηλότερα ποσοστά κνοφορίας παρατηρήθηκαν όταν η ΤΣ έγινε σε κουνέλια με κόκκινο χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου (Theau-Clement and Roustan 1991).

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η τυποποίηση ενός απλοποιημένου σχήματος πρόκλησης ΠΩ και συλλογής του μεγαλύτερου δυνατού αριθμού Ω-Z-E. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια να προσδιορισθεί ποια ζώα είναι κατάλληλότερα για δότες με βάση το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου κατά τη μέρα έναρξης της ορμονικής αγωγής. Χρησιμοποιήθηκε ένα απλοποιημένο σχήμα ορμονικής αγωγής, το οποίο περιελάμβανε μια ενδομυϊκή έγχυση PMSG και μια ενδοφλέβια έγχυση hCG. Επίσης, διερευνήθηκε η σχέση του χρώματος του βλεννογόνου των χειλέων του αιδοίου κατά τη μέρα έναρξης της ορμονικής αγωγής με την ανταπόκριση των ωοθηκών στην αγωγή πρόκλησης ΠΩ και με τον αριθμό και την ποιότητα των Z-E που συλλέχθηκαν.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματόζωα

Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 40 κουνέλια. Από αυτά, τα 35 ήταν θηλυκά, φυλής New Zealand, ηλικίας 5 μηνών και βάρους 3,5 - 4 Kg, και τα 5 αρσενικά, φυλής California, ηλικίας 1 - 1,5 ετών και βάρους 5-5,5 Kg. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά και η γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος των κουνελιών είχαν προηγουμένως ελεγχθεί *in vivo* και *in vitro*. Όλα τα κουνέλια σταβλίζονταν σε ατομικά υπερυψωμένα συρμάτινα κλουβιά. Συγκεκριμένη ποσότητα τροφής, που περιελάμβανε συμπυκνωμένη ζωοτροφή σε μορφή συμπίκτων (pellets) και σανό μηδικής, χορηγούνταν μία φορά την ημέρα. Το νερό παρέχονταν από αυτόματες ποτίστρες. Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε με τη βοήθεια τεχνητού φωτισμού σε αναλογία 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι. Η θερμοκρασία περιβάλλοντος κυμαινόταν από 20-25 °C και η υγρασία από 55-65 %.

Συγχρονισμός οίστρου και πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας

Σε όλα τα θηλυκά κουνέλια έγινε μία ενδομυϊκή έγχυση PMSG (80 IU/ζώο, Intergonan®, Intervet, Ολλανδία) 96 h πριν από την ΤΣ και καταγράφηκε το χρώμα του

time of artificial insemination (Theau-Clement 1991).

The aim of the present study was to standardize a simple scheme for the induction of multiple ovulation and the collection of the maximum possible number of O-Z-E. Furthermore, we tried to determine the optimal time for the beginning of hormonal treatment on donor animals using as an indicator the color of the mucosa of the vulva. We used a simplified hormonal treatment scheme, which consisted of an intramuscular injection of PMSG and an intravenous one of hCG. We also investigated the relationship between the color of the mucosa of the vulva on the first day of hormonal treatment and the ovarian response to the treatment as well as the number and quality of the collected Z-E.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Thirty-five New Zealand White nulliparous does and five California bucks of proven fertility were used. The females were five months old and weighed 3,5-4 kg and the males were 1-1,5 years old and weighed 5-5,5 kg. All animals were reared in individual elevated wire cages in rooms with controlled light (16:8h L:N). They received a commercial diet (pellets) according to their reproductive condition and alfalfa hay *ad libitum*. Room temperature ranged from 20 to 25°C and relative humidity from 55 to 60%.

Synchronization of estrous and induction of multiple ovulation

All does were induced to estrous synchronously with intramuscular application of PMSG (80 IU, Intergonan®-Intervet, Holland) 96 h before AI. At the same time the color of the mucosa of the vulva was recorded. To induce ovulation, does were injected intravenously with 180 IU of hCG (Chorulon®-Intervet, Holland) at the time of insemination.

Semen collection and artificial insemination

Semen was collected with an artificial vagina. After semen collection, any gel was removed and sperm concentration and motility were recorded. Inseminations were performed with a dose of 0,5 ml of TRIS-glucose-citrate diluted semen, containing 15×10^6 spermatozoa.

Embryo collection and evaluation

Embryos were collected 19 hours after insemination. Does were sacrificed and their ovaries and genital track were removed. The oviducts were prepared and rinsed with PBS medium, which contained 10% inactivated fetal calf serum. A 20 ml syringe and a special metallic needle were used for this purpose. A reverse stereoscope (20-400x) was used for the detection and quality evaluation of zygotes. Furthermore, the number of corpora lutea on every ovary was recorded. The presence of >10 corpora lutea per doe was considered the awaited reaction to the treatment for the induction of multiple ovulation.

βλεννογόνου των χειλέων του αιδοίου. Δεκαεννέα ώρες πριν από τη συλλογή των εμβρύων χορηγήθηκε ενδοφλέβια hCG (180 IU/ζώο, Chorulon®, Intervet, Ολλανδία) και ταυτόχρονα έγινε Τεχνητή Σπερματέγχυση (ΤΣ).

Σπερματοληψία - ΤΣ

Το σπέρμα συλλέχθηκε με τη χρησιμοποίηση τεχνητού κόλπου για κουνέλια και την παρουσία ενός θηλυκού κουνελιού σε οίστρο. Αμέσως μετά τη λήψη του σπέρματος, έγινε η εκτίμηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του. Ακολούθως το σπέρμα των 5 αρσενικών κουνελιών αναμείχθηκε και αραιώθηκε με αραιωτικό που περιείχε ως βασική ουσία TRIS-glucose-citrate. Η γονιμοποίηση των θηλυκών κουνελιών έγινε με μια ενδοκολπική ΤΣ, μετά από κατάλληλη συγκράτηση των ζώων (Εικόνα 1). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί καθετήρες (μήκος 28 cm, διάμετρος 0,6 cm). Σε κάθε θηλυκό κουνέλι έγινε έγχυση περίπου 0,5 ml αραιωμένου σπέρματος που περιείχε 15×10^6 προοδευτικά κινούμενα σπερματοζώαρια.

Συλλογή - εκτίμηση της ποιότητας των εμβρύων

Η συλλογή των Ω-Z-E έγινε 19 ώρες μετά την ΤΣ. Οι δότριες θυσιάστηκαν και τους αφαιρέθηκαν οι ωοθήκες και ο γεννητικός σωλήνας. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν οι ωαγωγοί και τα Ω-Z-E συλλέχθηκαν μετά από έκπλυση των ωαγωγών με υπόστρωμα PBS που περιείχε 10% αδρανολοποιημένο ορό εμβρύου μόσχου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μία σύριγγα των 20 ml με ειδική ατραπευτική μεταλλική βελόνα. Η εντόπιση και η εκτίμηση της ποιότητας των Ω-Z-E έγινε με παρατήρηση (20-400x) σε ανάστροφο στερεομικροσκόπιο (Εικόνα 2). Παράλληλα, καταμετρήθηκαν τα ωχρά σωμάτια που υπήρχαν σε κάθε ωοθήκη. Θεωρήθηκε ως αναμενόμενη αντίδραση στην αγωγή πρόκλησης ΠΩ η παρουσία >10 ωχρών σωμάτων ανά ζώο.

Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μέθοδοι: Το z.05 χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο για τη σύγκριση μεταξύ των ποσοστών. Η ανάλυση διακύμανσης προς μια κατεύθυνση (one way ANOVA) και η δοκιμή Duncan χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των μέσων όρων των παραμέτρων που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε $\bar{x} \pm SD$. Για τον έλεγχο της ομοιογένειας των διακυμάνσεων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή του Leven (Leven test).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον πίνακα 1 φαίνονται τα ποσοστά των θηλυκών κουνελιών, τα οποία αντέδρασαν (>10 ωχρά σωμάτια) στην αγωγή πρόκλησης ΠΩ (ομάδα Α), των κουνελιών που δεν παρουσίασαν την αναμενόμενη (<10 ωχρά σωμάτια) αντίδραση (ομάδα Β) και εκείνων που δεν εκδήλωσαν καμία αντίδραση (ομάδα Γ), καθώς και τα αντίστοιχα ποσοστά των κουνελιών από τα οποία συλλέχθηκαν Z-E κατάλληλα για περαιτέρω χρησιμοποίηση, ανάλογα με το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου. Από τα



Εικόνα 1. Συγκράτηση θηλυκού κουνελιού με σκοπό τη διενέργεια ΤΣ.

Figure 1. The way to hold does in order to carry out AI.



Εικόνα 2. Εκτίμηση της ποιότητας των Ω-Z-E. α. αγονιμοποιητο ωάριο, β. ζυγωτό, γ. έμβρυο στο στάδιο των δύο βλαστομεριδίων.

Figure 2. Evaluation of the quality of O-Z-E. α. non-fertilized ova, β. zygote, γ. embryo in the stage of blastomere.

Statistical analysis

Comparisons among percentages were performed by z.05 criterion. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare mean values of CL, OZE and pZE among does presenting different color of the mucosa of the vulva. Comparisons between means were performed by Duncan's new multiple range test. Distribution was normalized with the proper transformations, when needed. The results were expressed as mean $\pm$ SD. All analysis were performed using the statistic software program SPSS.

Πίνακας 1. Κατανομή κουνελιών ανάλογα με την αντίδραση των ωοθηκών στην αγωγή πρόκλησης ΠΩ και το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου

Table 1. Distribution of rabbits in relation to the reaction of the ovaries in multiple ovulation treatment and the color of the mucosa of the vulva

	Χρώμα βλεννογόνου αιδοίου Color of the mucosa of vulva				Σύνολο Total n (%)
	Ωχρό Pale n (%)	Ροδαλό Rose n (%)	Κόκκινο Red n (%)	Ιώδες Purple n (%)	
Αριθμός κουνελιών Number of does	2 (5,71)	9 (25,72)	13 (37,14)	11 (31,43)	35 (100)
Αντίδραση ωοθηκών Ovarian reaction	Συνολικός αριθμός κουνελιών που έδωσαν κατάλληλα έμβρυα Total number of does that produced a Z-E				
Ομάδα Α – Group A					
Συνολικός αριθμός κουνελιών Total number of does	0 0	6(66,67) 5(83,33)	7(53,85) 6(85,71)	6(54,55) 6(100)	19(54,29) 17(89,47)
Ομάδα Β – Group B					
Συνολικός αριθμός κουνελιών Total number of does	2(100) 2(100)	2(22,22) 1(50,00)	6(46,15) 5(83,33)	4(36,36) 4(100)	14(40,00) 12(85,71)
Ομάδα Γ – Group C					
Συνολικός αριθμός κουνελιών Total number of does	0	1(11,11)	0	1(9,09)	2(5,71)

35 θηλυκά κουνέλια τα 19 (54,29%) αντέδρασαν στην αγωγή πρόκλησης ΠΩ, τα 14 (40,00%) δεν παρουσίασαν την αναμενόμενη αντίδραση και τα 2 (5,71%) δεν παρουσίασαν καμία αντίδραση. Δύο κουνέλια (5,71%) είχαν ωχρό χρώμα αιδοίου κατά τη μέρα έναρξης της ορμονικής αγωγής, 9 (25,72%) ροδαλό, 13 (37,14%) κόκκινο και τα υπόλοιπα 11 (31,43%) ιώδες. Τα 2 κουνέλια (100%) με ωχρό χρώμα αιδοίου έδωσαν κατάλληλα Z-E, χωρίς όμως να έχουν την αναμενόμενη αντίδραση στην αγωγή πρόκλησης ΠΩ και δεν συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων λόγω του μικρού αριθμού ζώων. Πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία εκδήλωσαν τα 6 (66,67%) από τα 9 κουνέλια με ροδαλό, τα 7 (53,85%) από τα 13 με κόκκινο και τα 6 (54,55%) από τα 11 με ιώδες χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου. Δύο κουνέλια, ένα με ροδαλό και ένα με ιώδες χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου, δεν παρουσίασαν καμία αντίδραση στην αγωγή πρόκλησης ΠΩ. Στην ομάδα Α κατάλληλα Z-E έδωσαν τα 5 (83,33%) κουνέλια με ροδαλό, τα 6 (85,71%) με κόκκινο και τα 11 (100%) με ιώδες χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου. Στην ομάδα Β, κατάλληλα Z-E έδωσαν το 1(50,00%) κουνέλι με ροδαλό, τα 5 (83,33%) με κόκκινο και τα 4 (100%) με ιώδες χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά μεταξύ των ζώων της ίδιας ομάδας.

Στον πίνακα 2 φαίνεται ο μέσος αριθμός $\pm$ SD των ωχρών σωματίων που καταμετρήθηκαν σε κάθε ωοθήκη, καθώς και ο μέσος αριθμός των Ω-Z-E που συλλέχθηκαν από κάθε ωαγωγό και των κατάλληλων Z-E συνολικά, ανάλογα με το χρώμα του αιδοίου, στα κουνέλια των ομά-

RESULTS

Does are divided in three groups according to their response to the treatment for multiple ovulation: Group A, the ones that responded (>10 CL), group B, the does that did not show the expected response (<10 CL), and group C, the ones that showed no response at all. Nineteen out of thirty five does (54,29%) belong to group A, fourteen animals to group B (40,00%) and two does (5,71%) to group C. On the first day of hormonal treatment, 2 does presented pale color of the mucosa of the vulva (5,71%), 9 rose (25,72%), 13 red (37,14%) and 11 (31,43%) purple color of vulva (Table 1). The two animals with pale color of the mucosa of the vulva produced Z-E appropriate for further use but did not respond to the treatment for multiple ovulation. Thus, they were not included in the statistical analysis because of their small number. Multiple ovulation has been recorded from 6 (66,67) out of 9 does with rose, 7 (53,85%) out of 13 with red and 6 (54,55%) out of 11 with purple color of vulva. Two does, one with rose and the other one with pale color have shown no response to the treatment. In group A, Z-E appropriate for further use were obtained from 5 does with rose color (83,33%), 6 with red (85,71%) and 11 with purple color of the mucosa of the vulva (100%). In group B, Z-E appropriate for further used were obtained from 1 doe with rose (50,00%), 5 does with red (83,33%) and 4 with purple color of the mucosa of the vulva (100%). There was no significant difference among percentages of the same group.

The mean values $\pm$ SD of corpora lutea recorded on

Πίνακας 2. Μέσες τιμές ($x \pm SD$) ωχρών σωματίων και Ω-Z-E ανάλογα με το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου, σε κουνέλια των ομάδων Α και Β

Table 2. Mean values ($x \pm SD$) of corpora lutea and O-Z-E in relation to the color of the mucosa of vulva of rabbits in groups A and B

Χρώμα βλεννογόνου Color of the mucosa	Αριθ. ζώων n	Αριστερή Ωοθήκη Left ovary /ΩΣ - CL x±SD	Δεξιά Ωοθήκη Right ovary /ΩΣ - CL x±SD	Αριστερός Ωαγωγός Left oviduct /Ω-Z-E – O-Z-E x±SD	Δεξιός Ωαγωγός Right oviduct /Ω-Z-E – O-Z-E x±SD	Συνολικά - Total Z-E x±SD
Ομάδα Α – Group A						
Ροδαλό – Rose	6	12,17±5,95	14,67±4,55	10,67±4,23	12,67±5,85	15,33±9,87
Κόκκινο - Red	7	18,29±6,10	15,57±4,65	16,14±6,82	16,29±6,52	21,57±13,36
Ιώδες – Purple	6	20,33±10,15	17,50±10,37	12,37±3,97	12,17±4,71	18,17±8,95
Σύνολο – Total	19	17,00±7,94*	15,89±6,65*	13,37±5,51*	13,84±5,80*	18,53±10,77*
Ομάδα Β – Group B						
Ωχρό – Pale	2	4,5±0,71	5,00±1,41	9,00±4,24	4,5±0,71	13,50±3,54
Ροδαλό – Rose	3	5,00±5,00	3,33±2,89	3,67±3,67	3,33±2,89	2,33±4,04
Κόκκινο – Red	6	6,00±3,35	7,33±2,34	4,83±0,75	6,83±3,06	7,67±5,72
Ιώδες – Purple	5	3,00±1,87	3,40±2,19	2,20±1,64	3,40±2,70	5,40±4,45
Σύνολο - Total	16	4,69±3,11*	5,06±2,82*	4,31±3,11*	4,81±2,99*	6,69±5,49*

* Μέσοι όροι στην ίδια στήλη κάθε παραμέτρου διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($P<0,05$)

* Mean values in the same column differ significantly

δων Α και Β. Συνολικά συλλέχθηκαν 6,69±5,49 Z-E από κάθε κουνέλι. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις μέσες τιμές, τόσο των ωχρών σωματίων, όσο και των Z-E που συλλέχθηκαν σε σχέση με το χρώμα του αιδοίου μεταξύ των ζώων της ίδιας ομάδας. Ωστόσο, υπήρχε σημαντική διαφορά ($P<0,05$) μεταξύ των ομάδων Α και Β σε όλες τις μέσες τιμές που αναγράφονται στον πίνακα 2, ανεξάρτητα από το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου.

Στον πίνακα 3 καταγράφονται ο συνολικός αριθμός και τα ποσοστά των Ω-Z-E, τα οποία συλλέχθηκαν σε σχέση με τα ωχρά σωματίδια που καταμετρήθηκαν στις ωοθήκες, καθώς και ο συνολικός αριθμός και τα ποσοστά των κατάλληλων Z-E ανάλογα με το χρώμα του αιδοίου, στα κουνέλια των ομάδων Α και Β. Στην ομάδα Α συνολικά συλλέχθηκαν 517 Ω-Z-E (82,72 %), από τα οποία τα 352 (68,09%) Z-E ήταν κατάλληλα. Σε ό,τι αφορά στο χρώμα του αιδοίου, το μεγαλύτερο ($P<0,05$) ποσοστό Ω-Z-E συλλέχθηκε από τα κουνέλια με κόκκινο χρώμα αιδοίου (96,20%) και το μικρότερο ($P<0,05$) από αυτά με ιώδες (66,08%). Τα ποσοστά των κατάλληλων Z-E κυμαίνονταν από 66,52% έως 72,67% και δεν παρουσίαζαν διαφορές ανάλογα με το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου. Από την ομάδα Β συλλέχθηκαν συνολικά 148 (89,70%) Ω-Z-E, από τα οποία τα 107 (72,30%) Z-E ήταν κατάλληλα. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα ποσοστά των Ω-Z-E ανάλογα με το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου. Ωστόσο, το μεγαλύτερο ποσοστό ($P<0,05$) κατάλληλων Z-E συλλέχθηκε από τα κουνέλια με ιώδες χρώμα αιδοίου (84,38%) και το μικρότερο από εκείνα με ροδαλό (33,30%).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρόκληση ΠΩ, η διενέργεια ΤΣ στον κατάλληλο

every ovary, O-Z-E and Z-E appropriate for further use collected from every oviduct in relationship with the color of the mucosa of the vulva are presented on table 2. In group A, the mean value of Z-E appropriate for further use collected from every doe was 18,53±10,77 while in group B it was 6,69±5,49. There was no significant difference among animals of the same group as far as the number of O-Z-E is concerned in relation to the color of the mucosa of the vulva. However, there was a significant difference between group A and group B in the entire mean values presented on table 2, independent of the color of the mucosa of the vulva.

Total numbers and percentages of O-Z-E related to the corpora lutea recorded on the ovaries and total numbers of Z-E appropriate for further use related to the color of the mucosa of the vulva in both groups are presented on table 3. In group A, 517 O-Z-E were collected (82,72%) and 352 (68,09%) were appropriate for further use. As far as the color of vulva is concerned, the greater ($P<0,05$) percentage of O-Z-E was collected from does with red color (96,20%) and the smallest ($P<0,05$) from those with purple color of the mucosa of the vulva (66,08%). The percentages of Z-E ranged from 66,08% to 72,67% and did not differ significantly in relation to the color of the mucosa of the vulva. In group B 148 O-Z-E were collected (89,70%) out of which 107 (72,30%) were appropriate for further use. The differences recorded in the percentages of O-Z-E in accordance to the color of the mucosa of the vulva were not significant. However, the greatest percentage ($P<0,05$) of Z-E appropriate for further use was collected from does with purple (84,38%), and the smallest from those with rose color of the mucosa of the vulva (33,30%).

Πίνακας 3. Κατανομή ωχρών σωματίων, Ω-Z-E και κατάλληλων Z-E, ανάλογα με την αντίδραση των ωοθηκών στην αγωγή πρόκλησης ΠΩ και το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου

Table 3. Distribution of corpus luteum, O-Z-E and appropriate Z-E, in relation to the reaction of ovaries in multiple ovulation treatment and the color of the mucosa of vulva

	Χρώμα βλεννογόνου αιδοίου Color of vulva				Σύνολο Total n (%)
	Ωχρό Pale n (%)	Ροδαλό Rose n (%)	Κόκκινο Red n (%)	Ιώδες Purple n (%)	
Αριθμός κουνελιών Number of does	2 (5,7)	9 (25,7)	13(37,2)	11(31,4)	35(100)
Αντίδραση ωοθηκών Ovarian reaction					
Ομάδα Α - Group A					
Ωχρά σωματίδια Corpora lutea	0	161	237	227	625
Ω-Z-E	0	140	227	150	517
O-Z-E	(86,96) ^a	(96,20) ^b	(66,08) ^γ	(82,72)	
Κατάλληλα Z-E	0	92	151	109	352
a Z-E	(65,71)	(66,52)	(72,67)	(68,09)	
Ομάδα Β - Group B					
Ωχρά σωματίδια Corpora lutea	28	25	80	32	165
Ω-Z-E	27	21	72	28	148
O-Z-E	(96,43)	(84)	(90)	(87,5)	(89,70)
Κατάλληλα Z-E	27	7	46	27	107
a Z-E	(100)	(33,30) ^γ	(63,39) ^β	(84,38) ^a	(72,30)

^{a,b,γ} Ποσοστά στην ίδια σειρά με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά (P<0,05)

^{a,b,γ} Percentages on the same line with different superscripts differ significantly

χρόνο και η συλλογή των εμβρύων είναι τα κύρια στάδια παραγωγής κατάλληλων για περαιτέρω χειρισμούς ζυγωτών - εμβρύων (Z-E). Η γονιμότητα στο κουνέλι επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων είναι και η δεκτικότητα (Bettaglini et al 1982), η προθυμία δηλαδή του θηλυκού να δεχτεί την ορχεία. Κλινικό σημείο οίστρου θεωρείται το συμφορημένο αιδοίο, ιώδους χρώματος. Ωστόσο, τα υψηλότερα ποσοστά κυοφορίας παρατηρήθηκαν σε κουνέλια, των οποίων ο βλεννογόνος των χειλέων του αιδοίου κατά την ΤΣ είχε κόκκινο χρώμα και τα χαμηλότερα, όταν είχε ωχρό ή ιώδες (Theau -Clement 1991). Επίσης, έχει βρεθεί ότι το ποσοστό αντιστοιχίας βλεννογόνου ιώδους χρώματος και υψηλής αναλογίας (%) κερατινοποιημένων κυττάρων είναι μικρό (Υψηλάντης και συν. 1996). Η παρουσία κερατινοποιημένων κυττάρων υποδηλώνει την αύξηση των οιστρογόνων στο αίμα. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αναφορές για τη σχέση μεταξύ του χρώματος του βλεννογόνου του αιδοίου και της ανταπόκρισης των ωοθηκών στην αγωγή πρόκλησης ΠΩ.

Τα ποσοστά των θηλυκών κουνελιών, τα οποία αντέδρασαν στην αγωγή πρόκλησης ΠΩ, των κουνελιών που δεν παρουσίασαν την αναμενόμενη αντίδραση και εκείνων που δεν εκδήλωσαν καμία αντίδραση, δε σχετίζονται με το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου. Επίσης, τα α-

DISCUSSION

Induction of multiple ovulation, optimal timing of artificial insemination and collection of embryos are the main steps of production of embryos appropriate to be used for further experimentations. In does, fertility is influenced by several parameters. One of these is considered to be receptivity (Battaglini 1982), the willingness of the doe to accept mating. A clinical sign of estrous is thought to be the purple color of the mucosa of the vulva. However, the maximum pregnancy rates were recorded from does with red, and the minimum from those with pale and purple color of the mucosa of the vulva, by the time of artificial insemination (Theau-Clement 1991). Furthermore, purple color of the mucosa of the vulva is not accompanied with a high percentage of superficial cells (%) on the vaginal smears (Ypsilantis et al 1996). The presence of superficial cells on the vaginal mucosa indicates an increase of estrogen blood levels. Thus, the relationship between the color of the mucosa of the vulva and the ovarian response to the induction of multiple ovulation has not been so far investigated.

The percentage of animals that responded to the treatment, of those that did not show the expected response and those that did not respond at all, did not range in

ντίστοιχα ποσοστά των κουνελιών από τα οποία συλλέχθηκαν Z-E κατάλληλα για περαιτέρω χρησιμοποίηση δεν παρουσίασαν διαφορές ανάλογα με το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου. Οι Theau-Clement & Roustan (1991) αναφέρουν ότι το ποσοστό κυοφορίας μετά από διενέργεια ΤΣ, χωρίς αγωγή πρόκλησης ΠΩ, διαφέρει ανάλογα με το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου. Ειδικότερα, το 75% των κουνελιών με κόκκινο, το 55% με ροδαλό, το 40% με ιώδες και το 35% με ωχρό χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου κυοφορούν (Theau-Clement & Roustan 1991).

Στα κουνέλια που εκδήλωσαν ΠΩ, ο μέσος αριθμός των ωχρών σωματίων που καταμετρήθηκαν σε κάθε ωθήκη, των Ω-Z-E που συλλέχθηκαν από κάθε ωαγωγό και των κατάλληλων Z-E που συνολικά συλλέχθηκαν δε διέφερε ανάλογα με το χρώμα του βλεννογόνου των χειλέων του αιδοίου κατά τη μέρα έναρξης της ορμονικής αγωγής. Μετά από χορήγηση PMSG και hCG ο μέσος αριθμός Ω-Z-E που συλλέχθηκε από κουνέλια ήταν στην παρούσα έρευνα περίπου ίδιος με αυτόν που αναφέρουν οι Chrenek et al. (1998), αλλά μεγαλύτερος από αυτόν που αναφέρουν οι Maurer et al. (1968b). Ενδεχομένως, η διαφορά αυτή να οφείλεται στο ότι οι Maurer et al. (1968b) χορήγησαν τις παραπάνω ορμόνες με διαφορετικό σχήμα και δόσεις (3x30 IU PMSG και 50 IU hCG την 5η ημέρα).

Συνολικά ποσοστά Ω-Z-E ανάλογα με τα δικά μας συνέλεξαν και άλλοι ερευνητές, οι οποίοι χορήγησαν είτε PMSG και hCG, είτε FSH και LH (Maurer et al 1968a, Schimdt et al 1992, Besenfelder et al 1993, Chrenek et al 1998). Οι Kauffman et al (1998) και οι Carney & Foote (1990), οι οποίοι χορήγησαν FSH σε συνδυασμό με hCG ή LH παρατήρησαν ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα από αυτά της παρούσας έρευνας. Η χρησιμοποίηση FSH προκαλεί μεγαλύτερη καταπόνηση του ζώου (6 ως 8 δόσεις με μεσοδιάστημα 12 ωρών), απαιτεί περισσότερο χρόνο και βέβαια έχει μεγαλύτερο κόστος. Επιπλέον, τα αποτελέσματα δεν είναι εμφανώς καλύτερα από αυτά που παρατηρούνται με τα απλοποιημένα σχήματα, ώστε να ενθαρρύνουν τη χρησιμοποίησή τους.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα έρευνα είναι: ικανοποιητικό ποσοστό κουνελιών εμφανίζουν ΠΩ μετά από χορήγηση PMSG και hCG και τα περισσότερα από αυτά δίνουν κατάλληλα για περαιτέρω χειρισμούς ζυγωτά - έμβρυα. Επίσης, σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό Ω-Z-E συλλέγεται όταν η αγωγή πρόκλησης ΠΩ ξεκινάει την ημέρα που το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου είναι κόκκινο. Επομένως, το χρώμα του βλεννογόνου του αιδοίου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ενδεικτικό σημείο για τον κατάλληλο χρόνο έναρξης της ορμονικής αγωγής ή για την επιλογή των ζώων δοτών, ώστε να συλλέγεται το μεγαλύτερο δυνατό ποσοστό Ω-Z-E μετά από πρόκληση ΠΩ. □

relation to the color of the mucosa of the vulva. Furthermore, the percentage of Z-E collected cannot be related to the color of the mucosa of the vulva, in all three groups. Theau-Clement & Roustan (1991) reported that pregnancy rates, after artificial insemination, without an induction of multiple ovulation, range when related to the color of the mucosa of the vulva. The pregnancy rates were in detail: 75% of does with red, 55% of those with rose, 40% with purple and 35% of does with pale color of the mucosa of the vulva by the time of artificial insemination were pregnant (Theau-Clement & Roustan 1991).

In animals that responded to the treatment for multiple ovulation, the mean number of corpora lutea on every ovary, and of O-Z-E and Z-E appropriate for further use did not range in relation to the color of the mucosa of the vulva on the first day of hormonal treatment. The mean values of O-Z-E collected after the PMSG and hCG administration, in the present research did not differ from those reported from Chrenek et al. (1998), but are higher in comparison with those of Maurer et al. (1968b) who administrated the same hormones on a different dosage schedule.

Total percentages of O-Z-E similar to ours were also obtained from other investigators, after administration of PMSG and hCG or FSH and LH (Maurer et al 1968a, Schimdt et al 1992, Besenfelder et al 1993, Chrenek et al 1998). Kauffman et al (1998) and Carney & Foote (1990) who used FSH in combination with hCG or LH obtained only slightly better results when compared to the present study. The use of FSH is stressful for the animal (6-8 doses, one dose every 12 hours), demands much more time and is more expensive than PMSG. In addition to that, the results of FSH are similar to those of simplified treatments.

Conclusions drawn from the present study, are the following: A satisfying percentage of does responds to the treatment with PMSG and hCG properly and most of these animals provide us with Z-E appropriate for further use. Furthermore, a significantly higher percentage of O-Z-E is collected from animals with red color of the mucosa of the vulva on the day of PMSG administration. These results lead us to the conclusion that the color of the mucosa of the vulva can be used as a marker for the selection of does for multiple ovulation, in order to obtain the maximum possible number of O-Z-E. □

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Battaglini M, et al. (1982) Induzione della ovulazione e fecondazione strumentale nella coniglia. *Coniglicoltura*, 19(12):45-51.
- Bedford JM (1970) The influence of oestrogen and progesterone on sperm capacitation in the reproductive tract of the female rabbit. *J Endocr*, 46:191.
- Besenfelder U (1990) Untersuchungen zum Einfluß von β -Carotin auf Fertilitätsparameter in Embryotransferprogrammen beim Kaninchen. München, Diss Med Vet.
- Besenfelder U, Solti L, Seregi J and Brem G (1993) Influence of b-carotene on the fertility in rabbits when using embryo transfer programs. *Theriogenology*, 39:1093-1109.
- Boussit D (1989) In :Reproduction et insemination artificielle en cuniculere. Editions AFC.
- Carney EW & Foote RH (1990) Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos in vivo and in vitro. *J Reprod Fert*, 89:543-551.
- Chrenek P, Makarech A, Vasicek D, Laurincik J, Bulla T, Gajarska T and Rafay J (1998) Effects of superovulation, culture and microinjection on development of rabbit embryos in vitro. *Theriogenology*, 50:659-666.
- Fischer B (1987) Development retardation in cultured preimplantation rabbit embryos. *J Reprod Fert*, 79:115-123.
- Hagen KW (1974) Colony husbandry. In : Weisbroth SH, Flatt RE, Kraus AL (eds) *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Academic Press. New York, San Francisco, London, :23-45.
- Illera MJ, Rodriguez de Sadia C, Munoz I & Illera M (1990) The effect of PMSG anti PMSG on the performance of rabbit embryos. *Theriogenology*, 33:253.
- Kauffman RD, Schmidt PM, Rall WF and Hoeg JM (1998) Superovulation of rabbit with FSH alter in vivo development of vitrified morulae. *Theriogenology*, 50:1081-1092.
- Liebl I (1996) Endoskopischer Eileitertransfer bei Kaninchen. München, Diss Med Vet.
- Maurer RR, Hunt WL, Van Vleck LD & Foote RH (1968a) Developmental potential of superovulated rabbit ova. *J Reprod Fert*, 15:171-175.
- Maurer RR, Hunt WL & Foote RH (1968b) Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in dutch-belted rabbit. *J Reprod Fert*, 15:93-102.
- Schmidt PM, Hollifield VM, Lin X and Wildt DE (1992) Induced ovulation and adequate embryo recoveries in New Zealand White rabbits treated with a low PMSG/HCG dose or single, daily injections of FSH-P. *Theriogenology*, 37:293.
- Schranner S (1993) Untersuchungen zum maschinellen Milchentzug beim Kaninchen als Grundlage zur Bestimmung von Lactationsleistungen und Michinhaltsstoffen. München, Diss Med Vet.
- Σφαιρόπουλος Α (1991) Κονιζοτροφία. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, :50-73.
- Theau-Clement and Roustan A (1991) L'insemination artificielle chez la lapine. *El et Ins*, 245:3-12.
- Wettemann RP and Hafs HD (1970) Sperm capacitation after injection of LH or HCG in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med*, 133:1002.
- Yang X, Jiang S, Kovacs A and Foote RH (1992) Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. *Biol Reprod*, 47:636-643.
- Ypsilantis P, Tsiligianni Th, Karagiannidis A (1996) The Use of cytological examination of vaginal smears for the determination of domestic rabbit's estrus cycle. *Bull Hellenic Vet Med Soc*, 47(3):186-190.