

Graf-Lehndorf-Institut für Pferdewissenschaften

Veterinärmedizinische Universität Wien

**Das Embryotransferprogramm des Haupt- und Landgestüts
Neustadt (Dosse) in den Jahren 2008 bis 2019 sowie der Einfluss
der Stutenfamilie von Spender- und Empfängerstute auf die
Trächtigkeitsdauer nach Embryotransfer**

Diplomarbeit

vorgelegt von

Johanna Baumann

Wien, im August 2023

Betreuerin: Priv.-Doz. Dr. med. vet. Christina Nagel

Begutachter: o. Univ.-Prof. Dr. med. vet. Jörg Aurich

INHALTSVERZEICHNIS

KAPITEL	TITEL	SEITENZAHL
1	Einleitung	1
1.1	Technik des Embryotransfers beim Pferd	1
1.2	Trächtigkeitsdauer	3
1.3	Eigene Fragestellung	4
2	Material und Methoden	5
2.1	Tiere und Daten	5
2.2	Statistische Auswertung	6
3	Ergebnisse	7
3.1	Embryotransferprogramm des Brandenburgischen Haupt- und Landgestüts	7
3.2	Embryonenspenderstuten des Brandenburgischen Haupt- und Landgestüts	8
3.3	Empfängerstuten des Brandenburgischen Haupt- und Landgestüts	10
3.4	Zyklustag der Spender- und Empfängerstute bei Embryonenspülung und -übertragung	11
3.5	Trächtigkeitsdauer	12
4	Diskussion	14
5	Zusammenfassung	18
6	Summary	19
7	Literaturverzeichnis	20

1. Einleitung

Im Jahr 1891 wurde erstmals ein Embryotransfer bei Hasen durchgeführt (Heape, 1891). Der erste erfolgreiche Embryotransfer bei einem Pferd fand 1974 statt (Oguri und Tsutsumi, 1974). Ursprünglich war der Embryotransfer eine Möglichkeit, Nachkommen von wertvollen Stuten zu erhalten, die selbst bereits älter waren und nur noch eine geringe Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Trächtigkeit hatten (McKinnon und Squires, 1988). Der Embryotransfer bietet jedoch auch den Vorteil, Stuten gleichzeitig sowohl im Sport als auch in der Zucht nutzen zu können. (McKinnon und Squires, 1988; Squires et al., 1999; Stout, 2006). So kann von züchterisch wertvollen Stuten mehr als ein Fohlen pro Zuchtsaison geboren werden (Kraemer, 1983; McKinnon und Squires, 1988; Stout, 2006). Des Weiteren kann der Embryotransfer bei der Zucht von in Gefangenschaft lebenden Tieren zur Hilfe genommen werden, um so bedrohte Tierarten vor dem Aussterben zu bewahren (Kraemer, 1983).

Der Embryotransfer stößt allerdings auch an seine Grenzen. Im Gegensatz zur Superovulation beim Rind, können von einer Spenderstute pro Zuchtsaison maximal sechs bis acht Embryonen (McKinnon und Squires, 1988) mit ein bis maximal zwei zum Transfer geeigneten Embryonen pro Spülung (Squires et al., 1999; Allen, 2005) gewonnen werden. Für die kostentragenden Besitzer kann der Embryotransfer frustrierend sein, da er geld- und zeitintensiv ist und nicht immer erfolgreich endet (Campbell, 2014).

Zur Übertragung des Embryos auf die Empfängerstute gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die ersten erfolgreichen Embryotransfers wurden chirurgisch unter Anästhesie mittels einer Laparotomie durchgeführt (McKinnon und Squires, 1988). Später wurde die Methode der chirurgischen Übertragung durch eine Inzision in der Flanke am stehenden sedierten Pferd und die Methode der nicht-chirurgischen transvaginalen Übertragung (Squires et al., 1999) mit Einsetzen des Embryos in den Uteruskörper (Iuliano et al., 1985) eingeführt. Zunächst war die Erfolgsquote der chirurgischen Übertragung deutlich höher als die der nicht-chirurgischen Übertragung (Iuliano et al., 1985).

1.1. Technik des Embryotransfers beim Pferd

Die optimale Empfängerstute sollte zwischen drei und zehn Jahren alt sein, allgemein und gynäkologisch gesund sein und am besten bereits ein Fohlen ausgetragen und aufgezogen haben (Squires et al., 1999). Optimale Größe und Gewicht der Empfängerstute richtet sich

nach der Rasse der Spenderstute. Pro Spenderstute sollten mindestens drei Empfängerstuten für den Embryotransfer zur Verfügung stehen, so dass die Stute mit der besten Zyklussynchronizität ausgewählt werden kann. Ist dies nicht möglich, müssen aufwendigere Maßnahmen zur Zyklussynchronisierung angewendet werden (Aurich und Budik, 2009). Idealerweise favorisierte man eine Empfängerstute, die einen Tag vor, oder bis zu drei Tage nach der Spenderstute ovuliert hat (Squires et al., 1999).

Die Spenderstuten werden mit frischem, gekühltem oder tiefgefrorenem Samen besamt. Der Tag der Ovulation wird als Tag 0 bestimmt (Squires et al., 1999). Die Embryonenspülung bei der Spenderstute findet an Tag sieben oder acht nach der Ovulation statt (Iuliano et al., 1985; Squires et al., 1999). Um den Embryo der Spenderstute zu gewinnen, wird ein Embryospülkatheter durch die Zervix in den Uterus eingeführt. Anschließend wird der Uterus der Stute viermal hintereinander mit jeweils 1-2 Litern Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) oder Ringer Lactat angefüllt. Die Rückgewinnung der Spülflüssigkeit erfolgt entweder über ein geschlossenes System, welches direkt einen Filter beinhaltet, oder über ein offenes System in eine Glasflasche. Bei Verwendung eines offenen Systems muss die Spülflüssigkeit im Anschluss durch einen Embryonenfilter gegossen werden. Danach wird der Embryo in der, nach dem Filterungsprozess verbliebenen, Flüssigkeit unter dem Mikroskop gesucht. Wird ein Embryo gefunden, so wird dieser in ein Nährmedium umgesetzt, beurteilt und anschließend zur direkten Übertragung in eine Transferpaillette mit 0,5 ml Fassungsvermögen aufgezogen. Dabei wird die Transferpaillette mit drei Flüssigkeitssäulen, welche jeweils durch einen Luftraum voneinander getrennt sind, befüllt. Dadurch wird beim Übertragen des Embryos auf die Empfängerstute mit der ersten Flüssigkeitssäule der Katheterausgang befeuchtet. In der mittleren Säule befindet sich der Embryo. Die letzte Flüssigkeitssäule stellt sicher, dass der Embryo aus dem Katheter und von dessen Ausgang fortgespült wird (Stout, 2006). Wird der Embryo direkt übertragen, so kann er bei Raumtemperatur gelagert werden (Aurich und Budik, 2009). Der Embryo kann zur längeren Aufbewahrung oder zum Verschicken an andere Embryotransferstationen auch bei 5°C gekühlt werden (Squires et al., 1999).

Ebenso wie die Spülung wird auch die Übertragung des Embryos auf die Empfängerstute transzervikal vorgenommen. Diese Methode ist nicht nur schnell und kostengünstig, sondern birgt auch wenig Gesundheitsrisiken für die Empfängerstute (Stout, 2006; Aurich und Budik, 2009). Die mit dem Embryo bestückte Paillette wird in einen Transferkatheter gegeben. Der Transferkatheter wird unter Zuhilfenahme eines Spreizspekulums nach Polansky und einer

Zervixfasszange durch die Zervix in den Uterus der Empfängerstute eingeführt (Aurich und Budik, 2009). Um eine überschießende Prostaglandinfreisetzung und somit die vorzeitige Luteolyse mit darauffolgender Embryonenresorption zu verhindern, wird die Empfängerstute über drei Tage mit nicht-steroidalen Antiphlogistika behandelt (Koblischke et al., 2008). Sieben Tage nach der Übertragung des Embryos wird bei der Empfängerstute eine Trächtigkeitsuntersuchung durchgeführt (Aurich und Budik, 2009).

Im Jahr 2005 gab es allein in Nord- und Südamerika jährlich mehr als 20.000 Embryotransfers. Der internationale Newsletter der Embryotransfer Society schreibt, dass im Jahr 2019 37.545 Spülungen und 23.564 Embryotransfers durchgeführt wurden. Zu dieser Statistik trugen die Daten aus 11 Ländern bei (Viana, 2020).

1.2. Trächtigkeitsdauer

Die Trächtigkeitslänge der Stute beträgt 320 bis 360 Tage mit einem Mittelwert von 340 Tagen (Rossdale, 1993). Eine Voraussage der Trächtigkeitsdauer bei Stuten ist durch die hohe Variabilität in der Länge der Trächtigkeit und die teilweise wenig ausgeprägten Geburtsanzeichen der Stuten schwierig (Lester, 2005; Davies Morel et al., 2002). Doch es ist sowohl von ökonomischer Bedeutung als auch für das richtige Management der Stuten und ihrer Fohlen relevant, eine ungefähre Trächtigkeitslänge und somit eine Einschätzung des Entwicklungsstadiums des Fohlens zu erhalten (Ewert et al., 2018; Lester, 2005).

In der Regel werden Fohlen reif geboren, wenn die Trächtigkeitslänge mindestens 320 Tage oder länger ist. Bei einer Trächtigkeit von unter 320 Tagen gilt das Fohlen als prämaturn und ist oft nur mit Hilfe tiermedizinischer Betreuung überlebensfähig (Castagnetti und Veronesi, 2008). Bei einer Trächtigkeitslänge von unter 300 Tagen gilt es als nicht überlebensfähig (Rossdale, 1976).

Es gibt viele verschiedene Faktoren, die die Länge der Trächtigkeit einer Stute beeinflussen (Lester, 2005). Der Monat der Besamung hat Auswirkungen auf die Trächtigkeitslänge der Stute, mit der längsten Trächtigkeitsdauer bei Belegung im Januar und Februar und der kürzesten Trächtigkeitsdauer bei Belegung im Juni und Juli (Valera et al., 2006; Ewert et al., 2018; Rodrigues et al., 2020). Des Weiteren gibt es rassebedingte Unterschiede in der Länge der Trächtigkeit einer Stute und auch das Gewicht des Pferdes bedingt Unterschiede in der Trächtigkeitslänge (Langlois und Blouin, 2012; Nagel et al., 2020). Das Geschlecht des Fohlens hat einen Einfluss auf die Trächtigkeitslänge und Trächtigkeiten der Stuten, die ein

Hengstfohlen austragen, sind um einige Tage länger als Trächtigkeiten der Stuten mit Stutfohlen (Valera et al., 2006; Davies Morel et al., 2002; Ewert et al., 2018; Dicken et al., 2012). Zum Einfluss des Alters der Stute auf die Trächtigkeitslänge gibt es keine einheitlichen Aussagen. Einige Studien besagen, dass die Trächtigkeitslänge linear mit dem Alter der Stute ansteigt (Ewert et al., 2018; Langlois und Blouin, 2012; Rodrigues et al., 2020). Andere beobachteten bis zum Alter von 10 bis 12 Jahren eine Abnahme der Trächtigkeitslänge und anschließend einen Anstieg der Trächtigkeitslänge mit fortschreitendem Alter (Valera et al., 2006). Zwei Studien beobachteten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Alter der Stute und der Trächtigkeitslänge (Davies Morel et al., 2002; Dicken et al., 2012). Nicht nur die Wahl des Hengstes übt einen Einfluss auf die Trächtigkeitslänge aus (Rodrigues et al., 2020), sondern auch die Stute selbst beeinflusst die Trächtigkeitslänge. Eine Stute hat ihr Leben lang entweder tendenziell eine lange oder eine kurze Trächtigkeitsdauer (Rodrigues et al., 2020). Die letzte Trächtigkeitslänge hat sogar einen größeren Einfluss auf die diesjährige Trächtigkeitslänge als das Geschlecht des Fohlens.

Die eigene Arbeitsgruppe am Graf Lehndorff-Institut (Kuhl et al., 2015) ging der Hypothese nach, dass die mütterliche Abstammung die Trächtigkeitslänge der Stute beeinflusst. Dazu wurden 142 Zuchtstuten anhand ihrer mtDNA 13 verschiedenen Stutenfamilien zugeordnet. Hierbei beeinflusste nicht nur das Alter der Stute und das Geschlecht des Fohlens die Trächtigkeitslänge. Vor allem die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Stutenfamilie beeinflusste die Trächtigkeitslänge der Stute signifikant, was sich auf verschiedene Haplogruppen der mtDNA und somit verschiedene Mitochondrien-Funktionen zurückführen ließ.

1.3. *Eigene Fragestellung*

Da der größte Einfluss auf die Länge der Trächtigkeit von der Stute selbst bzw. ihrer Zugehörigkeit zu einer bestimmten Stutenfamilie ausgeht, soll im Folgenden untersucht werden, ob die Trächtigkeitslänge der Embryotransfer-Empfängerstute durch ihre Zugehörigkeit zu einer bestimmten Stutenfamilie oder durch die Zugehörigkeit des Embryos zu einer anderen Stutenfamilie bestimmt wird. Das Ziel dieser Diplomarbeit war die Auswertung des Embryotransfers am Haupt- und Landgestüt Neustadt (Dosse) von 2008 bis 2019 und die Untersuchung der Trächtigkeitslänge der Embryotransfer-Empfängerstuten in Abhängigkeit der Stutenfamilien von Embryonen-Spender und Empfängerstute.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere und Daten

In dieser retrospektiven Studie wurde das Embryotransferprogramm des Brandenburgischen Haupt- und Landgestüts (BHLG) in Neustadt an der Dosse der Jahre 2008 bis 2019 ausgewertet. Ausgewertet wurden die Daten der Embryotransferstation: Stutenkarten mit Daten zu Besamung, Ovulation und Embryonenspülungen bzw. Embryotransfers der entsprechenden Empfänger- und Spenderstuten, Embryotransferprotokolle, Abfohlzeiten und Fohlen assoziierte Daten. Den Unterlagen wurde die Anzahl aller auf dem Gestüt durchgeführten Embryonenspülungen und -transfers in dem genannten Zeitraum entnommen und analysiert. Den Embryotransferprotokollen konnten sowohl die Embryotransfers mit gestütseigenen Stuten als auch die, die in Dienstleistung an Fremdstuten aus der Landespfederzucht durchgeführt wurden, entnommen werden. Als Empfängerstuten dienten zum Teil ebenso Stuten von externen Züchtern, wie auch Stuten des BHLG. Bei den gestütseigenen Embryotransfers wurden ausschließlich Embryonen von gestütseigenen Spenderstuten auf gestütseigene Empfängerstuten übertragen.

Für alle am BHLG durchgeführten Embryotransfers wurden folgende Daten ermittelt: Anzahl der Spender- und Empfängerstuten sowie deren Alter, Anzahl positiver und negativer Spülungen der Spenderstuten, Anzahl übertragungsfähiger Embryonen und Anzahl positiver und negativer Trächtigkeitsuntersuchungen der Empfängerstuten acht Tage nach Embryotransfer. Außerdem wurde der Zyklustag, an dem die Embryonenspülung durchgeführt wurde, der Zyklustag der Empfängerstute bei Embryonenübertragung und die Differenz der Ovulation in Tagen zwischen Spender- und Empfängerstute ermittelt. Bei den gestütseigenen Embryotransfers konnte zusätzlich noch die Anzahl der lebend geborenen Fohlen nach erfolgreichem Embryotransfer ermittelt werden.

Um den Einfluss von Embryotransfer und Zugehörigkeit von Spender- und Empfängerstute zu einer bestimmten Stutenfamilie auf die Trächtigkeitslänge zu klären, wurden in einem ersten Schritt alle Stuten einer Stutenfamilie zugeordnet (Kuhl et al., 2015). Im zweiten Schritt wurden sowohl alle Embryotransferträchtigkeiten als auch alle eigenen Trächtigkeiten von Stuten, die an der Studie beteiligt waren, in Bezug auf ihre Trächtigkeitslänge betrachtet. Bei den Embryotransferträchtigkeiten wurde die Trächtigkeitslänge als Zeit von der Ovulation der Spenderstute und bis zum Abfohlen der Empfängerstute definiert. Bei den eigenen

Trächtigkeiten wurde die Trächtigkeitslänge von Ovulation bis zur Geburt des Fohlens bestimmt.

2.2. *Statistische Auswertung*

Für die Statistische Auswertung der Daten wurde das Statistikprogramm SPSS verwendet (Version 28.0; SPSS-IBM, Armonck, NY, USA). Die Betrachtung des Embryotransferprogramms: Trächtigkeitsrate bezogen auf Tag der Spülung und Synchronität der Empfängerstute, wurde mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. Für die Betrachtung der Trächtigkeitslänge bei eigenen Trächtigkeiten und ET-Empfängerstuten wurde eine Univariate Varianzanalyse mit Zugehörigkeit der Stutenfamilie und Art der Trächtigkeit als feste Faktoren durchgeführt. Die Trächtigkeitsdauer der Embryotransferträchtigkeiten der Empfängerstuten, die einen P-Embryo übertragen bekommen haben, wurde mittels Einfaktorieller Varianzanalyse untersucht. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM, standard error of mean) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. *Embryotransferprogramm des Brandenburgischen Haupt- und Landgestüts*

In 12 Jahren (2008-2019) wurden insgesamt 326 Embryonenspülungen in der Embryotransferstation des Brandenburgischen Haupt- und Landgestüts Neustadt (Dosse) durchgeführt. Von diesen 326 Embryonenspülungen wurden 204 bei Fremdstuten und 122 Embryonenspülungen bei gestütseigenen Stuten durchgeführt.

Im Dienstleistungs-Embryotransfer bei Fremdstuten wurden 73 verschiedene Warmblutstuten als Embryonenspender genutzt. Das durchschnittliche Alter der Spenderstuten zum Zeitpunkt des Embryotransfer lag bei $11,7 \pm 0,4$ Jahren (2-24 Jahre). Bei 5 Stuten konnte kein Alter ermittelt werden.

Bei den Spenderstuten aus dem Dienstleistungs-Embryotransfer wurde mindestens eine und höchstens 16 Embryonenspülungen durchgeführt (Mittelwert: $2,8 \pm 0,3$). Es waren zwischen null und 7 erfolgreiche (positive) Spülungen ($1,0 \pm 0,1$) und zwischen null und 9 negative Spülungen ($1,8 \pm 0,2$), bei denen kein Embryo gewonnen wurde, pro Stute. Von den 204 in Embryonenspülungen bei Fremdstuten waren 77 positiv (38%) und 127 negativ (62%; Tabelle 1). Bei den 77 positiven Embryonenspülungen konnten 80 übertragungsfähige Embryonen gewonnen werden, da bei drei Stuten jeweils zwei Embryonen in einer Spülung gewonnen wurden. Mit einer Erfolgsquote von 68% führten die 80 übertragenen Embryonen zu 54 Trächtigkeiten der Empfängerstuten acht Tage nach Embryotransfer. Somit ergibt sich für den in Dienstleistung durchgeführten Embryotransfer für eine Trächtigkeit eine insgesamt Erfolgsrate von 26%.

Für die 80 zu übertragenden Embryonen wurden 60 verschiedene Warmblutstuten als Empfängerstuten genutzt. Hierbei wurden 44 Stuten einmal, 12 Stuten zweimal und 4 Stuten dreimal verwendet. Von 4 Empfängerstuten konnte kein Alter ermittelt werden. Das durchschnittliche Alter der Empfängerstuten zum Zeitpunkt der Übertragung eines Embryos lag bei $7,7 \pm 0,6$ Jahre (2-20 Jahre).

Tabelle 1: Ergebnisse des Embryotransfers am Brandenburgischen Haupt- und Landgestüt in den Jahren 2008 bis 2019

	Embryonen- spülungen gesamt	positive Spülungen	Embryonen übertragen	Empfängerstute tragend	Lebende Fohlen
Fremdstuten	204 (63%)	77 (38%)	80	54 (68%)	nicht untersucht
Gestütsstuten	122 (37%)	54 (44%)	54	38 (70%)	31 (82%)

3.2. Embryonenspenderstuten des Brandenburgischen Haupt- und Landgestüts

Im Embryotransfer mit Gestütsstuten wurden 23 Spenderstuten der Rasse Deutsches Sportpferd genutzt, die bei ihrer ersten Nutzung $8,0 \pm 0,8$ Jahre (2-16 Jahre) alt waren. Zweiundzwanzig der 23 Spenderstuten lassen sich fünf verschiedenen Stutenfamilien zuordnen (Tabelle 2). Vier der 23 Spenderstuten wurden in der Zeit von 2008 bis 2019 ausschließlich im Embryotransfer eingesetzt. Die restlichen 19 Embryotransferspenderstuten trugen neben dem Einsatz im Embryotransferprogramm auch noch zwischen einem und maximal 12 (Mittelwert: $5,2 \pm 0,7$) eigene Fohlen aus. Bei den Spenderstuten des Brandenburgischen Haupt- und Landgestüts wurde mindestens eine und höchstens 23 Embryonenspülungen durchgeführt (Mittelwert: $5,3 \pm 1,2$ Embryonenspülungen). Es waren zwischen null und 9 positiven Spülungen ($2,3 \pm 0,5$) und zwischen null und 15 negative Spülungen ($3,0 \pm 0,8$) pro Stute. Insgesamt wurden 122 Embryonenspülungen durchgeführt. Von diesen 122 Embryonenspülungen waren 54 positiv (44%) und 68 negativ (56%; Tabelle 1). Es wurden 54 Embryonen gewonnen. Bei einer Stute konnten bei einer Spülung zwei Embryonen gewonnen werden, bei einer anderen wurde ein Embryo gewonnen, welcher jedoch nicht übertragungsfähig war. Mit einer Erfolgsquote von 70% führten die 54 übertragenen Embryonen zu 38 Trächtigkeiten der Empfängerstuten acht Tage nach Embryotransfer. Dies entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 31% eine Trächtigkeit mit Embryotransfer zu erzielen. Diese 38 Trächtigkeiten resultierten in der Geburt von 31 Fohlen (82%). Insgesamt ergab sich für die Stuten des BHLG daraus eine Embryotransfererfolgsquote von 25% für ein lebendes Fohlen.

Tabelle 2: Spenderstuten des Brandenburgischen Haupt- und Landgestüts 2008 bis 2019

	Geburts- jahr	Positive Embryonen- spülungen	Negative Embryonen- spülungen	positive TU Empfänger- stute	Lebende Fohlen aus ET (2008- 2019)	selbstaus- getragene Fohlen (2008- 2019)
G-Familie						
Glückskind	2007	2	0	1	0	7
I- Familie						
Ibiza	1999	0	3	0	0	9
Imperia	2010	1	1	1	1	2
M-Familie						
Melinda	2007	0	1	0	0	6
P-Familie						
Paola	2006	9	8	7	6	0
Parodie	2009	2	2	2	2	0
Pasadena	1996	1	1	1	1	6
Patrola *	2004	2	0	0	0	6
Phantastika	2013	0	13	0	0	2
Philharmonie	2004	2	3	0	0	9
Philosophia	2016	4	4	1	1	1
Poesie I	1992	8	15	6	3	1
Poesie II	2006	2	4	2	1	4
Poetin III	2005	7	4	7	7	3
Pokerface	2010	0	1	0	0	7
Pretoria II	2016	1	1	1	1	1
Prima Ballerina	1999	4	3	4	3	0
Prime Time	2003	1	0	1	1	12
T-Familie						
Tamila	2002	1	1	1	1	3
Tesla	2010	2	1	2	2	6
Tora	2000	2	0	1	1	8
Traumtänzerin	1996	0	2	0	0	6
Andere						
La Traviata	2002	3	0	0	0	0
Summe		54	68	38	31	99

* bei einer der zwei positiven Embryonenspülungen von Patrola war der Embryo nicht übertragungsfähig, bei der anderen Embryonenspülung konnten bei Patrola in einer Spülung zwei Embryonen gewonnen werden

3.3. Empfängerstuten des Brandenburgischen Haupt- und Landgestüts

Im gestütseigenen Embryotransferprogramm dienten 35 Stuten der Rasse Deutsches Sportpferd als Embryotransferempfänger. Diese Empfängerstuten waren bei ihrer ersten Nutzung zwischen 3 und 18 Jahre alt (Mittelwert: $7,1 \pm 0,7$ Jahre). Von den 35 Empfängerstuten lassen sich 33 Stuten fünf verschiedenen Stutenfamilien zuordnen (Tabelle 3). Sechzehn Empfängerstuten wurden ausschließlich für das Embryotransferprogramm genutzt. Neben der Nutzung als Embryotransfer-Empfängerstuten wurden 19 Stuten auch selbst zur Zucht genutzt. Diese 19 Stuten trugen zwischen einem und zehn ($3,4 \pm 0,6$) eigene Fohlen aus, sodass diese Stuten 64 eigene Fohlen zur Welt brachten. Die Stuten wurden mindestens einmal und höchstens 4-mal (Mittelwert: $1,5 \pm 0,2$) als Embryonenempfänger genutzt. Die Trächtigkeitsuntersuchung acht Tage nach der Embryonenübertragung war im Schnitt $1,1 \pm 0,2$ positiv und $0,5 \pm 0,1$ negativ.

Tabelle 3: Empfängerstuten des Brandenburgischen Haupt- und Landgestüts 2008 bis 2019

Empfängerstuten	Geburtsjahr	Positive TU d8 nach Embryo- transfer	Negative TU d8 nach Embryo- transfer	Lebende Fohlen aus ET (2008- 2019)	selbstauss- getragene Fohlen (2008- 2019)
G-Familie					
Gladdys	2015	1	0	1	0
Glückliche	2011	2	1	2	1
Grandiose Lady II	2006	1	0	1	0
Grandula	1998	1	1	1	1
Graziella II	2003	1	0	1	0
H-Familie					
Hedda	2000	2	1	1	2
Heide II	2010	0	1	0	0
Hella	2006	0	1	0	10
Hillary	2005	2	1	2	0
Hostess	2004	2	2	2	2
M-Familie					
Mademoiselle II	2010	1	0	1	0
Marlene	2011	0	1	0	0
Melinda	2007	3	1	2	6
Mon Bijou	1997	1	0	1	3
Mon Plaisir	2002	1	0	0	5
Mondieu	2010	1	0	1	0
Montana	2002	3	0	3	1
Moulin Rouge I	2007	1	0	1	1

P-Familie					
Pardon	2004	1	0	1	0
Perugia	2006	1	0	0	0
Piccola	2001	1	0	1	8
Pioletta	2012	0	1	0	2
Pußtablume	2001	1	0	1	0
Pußtalied	2005	2	0	2	0
T-Familie					
Tarasca	2004	1	0	1	1
Tascade	2010	1	0	0	0
Tasha	2015	1	0	1	0
Tatjana	2006	0	1	0	6
Toffifee	2012	0	1	0	4
Tracy I	2004	1	0	1	0
Traumtänzerin	1996	0	1	0	6
Trojanerin	1996	4	0	3	1
Tunika II	2002	0	1	0	0
Andere					
Antigua	2006	0	1	0	2
Kildare	2004	1	0	0	2
Summe		38	16	31	64

3.4. Zyklustag der Spender- und Empfängerstute bei Embryonenspülung und -übertragung

Die 122 Embryonenspülungen wurden im Durchschnitt an Tag $7,3 \pm 0,1$ des Zyklus der Spenderstute durchgeführt, frühestens an Tag 6, spätestens an Tag 9. Der Tag der Embryonenspülung unterschied sich nicht zwischen positiven und negativen Spülergebnissen. Die 54 positiven Embryonenspülungen wurden an Tag $7,3 \pm 0,1$, die 68 negativen Embryonenspülungen an Tag $7,3 \pm 0,1$ durchgeführt. Die Übertragung der 54 Embryonen erfolgte durchschnittlich an Tag $5,5 \pm 0,2$ des Zyklus der Empfängerstute. Frühestens fand eine Embryonenübertragung an Tag zwei, spätestens an Tag neun des Zyklus der Empfängerstute statt. Im Durchschnitt ovulierten die Empfängerstuten $1,8 \pm 0,2$ Tage nach den jeweiligen Spenderstuten. Die Differenz der Ovulation reicht von -1 bis +5 Tage von Spender- zu Empfängerstute. Bei den 38 Embryonenübertragungen, die in einer positiven Trächtigkeit resultierten, wurde die Embryonenübertragung an Tag $5,5 \pm 0,2$ des Zyklus der Empfängerstuten durchgeführt. Die Empfängerstuten ovulierten $1,8 \pm 0,2$ Tage nach den dazugehörigen Spenderstuten. Die 16 Embryotransfers mit einer negativen Trächtigkeitsuntersuchung der Empfängerstute fanden durchschnittlich an Tag $5,3 \pm 0,3$ des Zyklus der Empfängerstuten statt. Im Durchschnitt ovulierten die Empfängerstuten $1,8 \pm 0,3$

Tage nach den jeweiligen Spenderstuten. Es gab weder signifikante Unterschiede zwischen positiven und negativen Trächtigkeitsergebnissen der Empfängerstute bezogen auf Zyklustag der Empfängerstute bei der Übertragung des Embryos noch in der Differenz der Zyklustage zwischen Spender- und Empfängerstuten. Vergleicht man die Embryonenspüraten und Trächtigkeitsraten der Empfängerstuten bei gestütseignen und fremden Stuten so ergeben sich keine statistischen Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.5. Trächtigkeitsdauer

Neben den 31 Fohlen aus Embryotransfer (Hengstfohlen n=15; Stutfohlen n=16) trugen 36 Stuten aus der Studienpopulation (der Spender- und Empfängerstuten) in der Zeit von 2008 bis 2019 mindestens ein eigenes Fohlen selbst aus, so dass 151 selbstausgetragene Fohlen (Hengstfohlen n=75, Stutfohlen n=76) geboren wurden (Tabelle 4).

Die durchschnittliche Trächtigkeitsdauer aller Stuten, die ihr eigenes Fohlen austrugen, betrug $336,2 \pm 1,8$ Tage. Die Trächtigkeitslänge bei Stuten, die ein Embryotransferfohlen (unabhängig von der Zugehörigkeit des Embryos zu einer Stutenfamilie) austrugen betrug $338,8 \pm 1,4$. Tendenziell waren somit die ET-Trächtigkeiten ca. 2 Tage länger als die eigenen Trächtigkeiten (Univariate Varianzanalyse; $p < 0,073$). Bei gleichzeitiger Betrachtung des Einflusses der Zugehörigkeit der Stute zu einer Stutenfamilie ergibt sich bei eigenen Trächtigkeiten und bei ET-Trächtigkeiten ein signifikanter Einfluss (Tabelle 4 und 5; $p < 0,005$) der Stutenfamilie auf die Trächtigkeitslänge.

Tabelle 4: Trächtigkeitslänge bei selbstausgetragene Trächtigkeiten aufgeschlüsselt nach der Zugehörigkeit der Stute zu einer bestimmten Stutenfamilie

Stutenfamilie	Anzahl Stuten	Trächtigkeiten/Fohlen	Trächtigkeitslänge
G	3	9	$342,0 \pm 2,1$
H	3	14	$331,6 \pm 2,8$
I	2	11	$342,5 \pm 2,2$
M	5	16	$334,4 \pm 1,3$
P	13	62	$339,2 \pm 1,0$
T	8	35	$333,8 \pm 1,3$
Andere	2	4	$329,8 \pm 1,8$
Insgesamt	36	151	$336,2 \pm 1,8$

Tabelle 5: Trächtigkeitslänge bei ET-Trächtigkeiten aufgeschlüsselt nach der Zugehörigkeit der Empfängerstute zu einer bestimmten Stutenfamilie

Stutenfamilie Empfängerstuten	Anzahl Stuten	Trächtigkeiten/Fohlen	Trächtigkeitslänge
G	5	6	339,2 ± 2,9
H	3	5	338,4 ± 3,8
M	6	9	336,7 ± 2,8
P	4	5	343,4 ± 3,7
T	4	6	338,3 ± 2,6
Insgesamt	22	31	338,8 ± 1,4

Betrachtet man den Effekt der Stutenfamilie auf die Trächtigkeitslänge bei allen Embryotransferempfängerstuten, die einen P- Embryo übertragen bekommen haben (Tabelle 6), so ist die Trächtigkeitslänge nicht von der Zugehörigkeit der Stute zu ihrer Stutenfamilie beeinflusst.

Tabelle 6: Trächtigkeitslänge aufgeschlüsselt nach Stutenfamilien der Spender- und Empfängerstuten

Stutenfamilie Spenderstuten	Stutenfamilie Empfängerstuten	Trächtigkeiten/Fohlen	Trächtigkeitslänge
I	H	1	343
P	G	5	340,4 ± 3,2
P	H	4	337,3 ± 4,7
P	M	8	336,1 ± 3,1
P	P	3	343,1 ± 6,2
P	T	6	338,3 ± 2,6
T	G	1	333
T	M	1	341
T	P	2	344,0 ± 5,0

4. Diskussion

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden die Ergebnisse des Embryotransfers am Brandenburgischen Haupt- und Landgestüt Neustadt (Dosse) ausgewertet und der Einfluss der Stutenfamilie von Spender- und Empfängerstute auf die Trächtigkeitsdauer untersucht. Die Embryonengewinnungsrate betrug bei Fremdstuten 38% und bei Gestütstuten 44%. Das ist niedriger als in experimentellen Studien der eigenen Arbeitsgruppe an strikt kontrollierten Versuchsstuten (63%; Koblischke et al., 2008; 2010).

Die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Embryonengewinnung ist unter anderem vom Alter der Stute (Stout, 2006; McCue et al., 2010; Marinone et al., 2015) und deren Fertilität (McCue et al., 2010, Panzani et al., 2014), sowie von der Art des Samens (Frisch-, Versand- oder Tiefgefriersamen) und dessen Qualität abhängig (McCue et al., 2010; Squires et al., 1999). Die Art und auch die Qualität des Samens wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt und ist in einem kommerziellen ET-Programm auch nur bedingt zu beeinflussen. Das Alter der Spenderstuten lag durchschnittlich bei 8 bzw. 12 Jahren. Ab einem Alter der Spenderstuten von 13 Jahren liegt die Embryonengewinnungsrate unter der jüngerer Spenderstuten (Marinone et al., 2015). Die größere Spannbreite im Alter der Spenderstuten der eigenen Studie könnte Grund für die niedrigen Embryonengewinnungsraten sein. Im gestütseigenen Embryotransfer waren vier Spenderstuten zum Zeitpunkt der Embryonengewinnung bereits 13 Jahre oder älter, bei den Fremdstuten waren es 29 Stuten. In der Stutenherde des Brandenburgischen Haupt- und Landgestüts ist die Fruchtbarkeit im Allgemeinen sehr hoch (Kuhl et al., 2015). Beim Embryotransfer wichen jedoch einige Stuten von der normalerweise hohen zu erwartenden Fruchtbarkeit ab. Werden die vier Stuten Phantastika, Philharmonie, Philosophia und Poesie I nicht in die Berechnung mit einbezogen kommt der gestütsinterne Embryotransfer auf eine positive Spülrate von 55%.

Der Tag der Ovulation der Spenderstute im Embryotransfer wurde in dieser Studie wie auch in vielen anderen Studien als Tag 0 festgelegt und auch der Zyklustag der Embryonenspülung deckt sich mit dem anderer Studien (Dicken et al., 2012; Cuervo-Arango, 2019). Embryonen wurden zwischen Tag 6 und 9 gewonnen. Entscheidend für die Auswahl des Tages, an dem gespült wird, ist vor allem das Alter der Spenderstute (Squires et al., 1999; Marinone et al., 2015) und die Art des Spermas. Beides ist maßgeblich an der Größe des Embryos zum Zeitpunkt der Spülung beteiligt. Der Embryodurchmesser wird auch als Kriterium zur

Bewertung der Embryonengüte genutzt und ist bei älteren Stuten oft deutlich reduziert (Panzani et al., 2014; Willmann et al., 2011). Große Embryonen haben eine bessere Qualität und demnach auch eine höhere Wahrscheinlichkeit, die Phase nach dem Embryotransfer zu überstehen und zu einer erfolgreichen Trächtigkeit der Empfängerstute zu führen (Carnevale et al., 2000). Über den Einfluss der Samenqualität auf die Embryogröße wird diskutiert. Während die Qualität des Samens keine Auswirkungen auf den Embryodurchmesser (Cuervo-Arango et al., 2018) und somit auch nicht auf den Erfolg des Embryos im Embryotransfer hat, wird in einer anderen Studie ein Zusammenhang erkannt. Einen deutlichen Einfluss auf die Embryonengröße hat jedoch der Einsatz Frisch- oder Versandsamen oder Tiefgefriersperma. Nach der Besamung mit Tiefgefriersperma sind die Embryonen am selben Zyklustag deutlich kleiner als bei Stuten, die mit Frisch- oder Versandsamen besamt wurden (McCue et al., 2010). In dieser Studie wurde nicht vermerkt, welche Besamungen mit Frischsamen und welche mit Tiefgefriersamen durchgeführt wurden und auch kein weiterer Zusammenhang zum Tag der Embryonenspülung hergestellt. Ein Zusammenhang mit dem Embryotransfererfolg kann hier daher nicht untersucht werden.

Der optimale postovulatorische Zeitpunkt für die Übertragung des Embryos ist laut Cuervo-Arango (2019) Tag 4 des Zyklus der Empfängerstute. In dieser Studie wurde der Embryo auf die Empfängerstute durchschnittlich an Tag 5,5 und somit durchschnittlich 1,5 Tage später übertragen. Allerdings gab es im Embryotransfer dieses Gestüts keine Unterschiede zwischen den positiven und negativen Trächtigkeitsergebnissen bezogen auf die Zyklustage der Spender- und Empfängerstuten.

Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Empfängerstute nach Transfer eines Embryos als tragend diagnostiziert werden kann, liegt zwischen 60% (Koblischke et al., 2010) und 76% (Cuervo-Arango et al., 2017). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass sich der Einsatz von nicht steroidaler Antiphlogistika bei der Empfängerstuten nach dem Embryotransfer positiv auf die Trächtigkeitsrate auswirkt. Nicht steroidale Antiphlogistika reduzieren eine mögliche Entzündungsreaktion des Endometriums und die Ausschüttung von Prostaglandin $F_{2\alpha}$, so dass eine vorzeitige Luteolyse verhindert wird (Koblischke et al., 2008). Die Chance auf eine positive Trächtigkeitsuntersuchung nach Embryotransfer lag bei 17% ohne Behandlung mit NSAIDs und bei 79% bei Stuten, die nach dem Embryotransfer mit NSAIDs behandelt wurden. Im Embryotransferprogramm am BHLG werden alle Stuten nach Embryotransfer mit NSAIDs behandelt (Koblischke et al., 2010). Hier lag im gestütseigenen Embryotransfer die Wahrscheinlichkeit auf eine positive Trächtigkeitsuntersuchung der Empfängerstute bei 70%

und im Dienstleistungs-Embryotransfer bei 68%. Werden die vier Stuten Phantastika, Philharmonie, Philosophia und Poesie I erneut nicht in die Berechnung mit einbezogen, lag die Wahrscheinlichkeit auf eine positive Trächtigkeitsuntersuchung der Empfängerstute im gestütseigenen Embryotransfer bei 78% (40 positive Spülungen, davon 31 positive Trächtigkeitsuntersuchungen).

Bei den gestütseigenen Embryotransfers konnte zusätzlich noch die Anzahl der lebend geborenen Fohlen nach Embryotransfer ermittelt werden. Die Chance, dass eine Gestütsstute durch Embryotransfer ein lebendes Fohlen hervorgebracht hat, lag mit 25% jedoch sehr niedrig. Werden die Berechnungen ohne die vier Stuten Phantastika, Philharmonie, Philosophia und Poesie I durchgeführt liegt die Wahrscheinlichkeit für ein lebendes Fohlen nach erfolgreichem Embryotransfer bei 87% nach positiver Trächtigkeitsuntersuchung (31 positive Trächtigkeitsuntersuchungen davon 27 lebende Fohlen) und somit steigt die Chance der Geburt eines lebenden Fohlens nach Embryotransfer ohne Einberechnung der vier Stuten aus der P-Familie auf 37%.

Bei der Betrachtung der Unterschiede der Trächtigkeitslänge muss vorweg gestellt werden, dass trotz des Studienzeitraums von 12 Jahren die Studienpopulation recht klein war und damit nur Vermutungen zum Einfluss der Stutenfamilie auf die Trächtigkeitslänge nach Embryotransfer getroffen werden können. Hinzu kommt, dass die Trächtigkeitslänge bei der Stute sehr variabel ist und durch viele Einflussfaktoren bedingt ist (Lester, 2005; Valera et al., 2006; Davies Morel et al., 2002; Ewert et al., 2018; Dicken et al., 2012; Rodrigues et al., 2020). Um einige Faktoren wie das Jahr und auch die Stute an sich zu minimieren, wurden als Kontrollgruppe nur die eigenen Trächtigkeiten der an der Studie beteiligten Stuten aus den Jahren 2008 bis 2019 einbezogen und nicht wie in anderen Studien die gesamte Population (Kuhl et al., 2015). Auch der Einfluss des Besamungszeitpunktes ist durch ein striktes Gestütsmanagement mit einer Zuchtsaison von Februar bis Mitte Juni minimiert. Sowohl die Trächtigkeitslängen der Stuten, die ihr eigenes Fohlen austrugen, als auch die Embryotransferträchtigkeitslängen liegen mit 337 und 339 Tagen in den von der Literatur genannten Zeitspannen (Rossdale, 1993) und liegen auch im langjährigen für die Stuten des Gestüts üblichen Mittel (Kuhl et al., 2015). Interessanterweise zeigt sich eine statistische Tendenz zu einer längeren Trächtigkeitsdauer nach Embryotransfer. Der Einfluss der Stutenfamilie auf die Trächtigkeitslänge der eigenen Trächtigkeit konnte in dieser Studie bestätigt werden (Kuhl et al. 2015) und derselbe Effekt kann auch bei der Gesamtheit der ET-Trächtigkeiten beobachtet werden. Im Gegensatz dazu gab es keinen Einfluss der

Stutenfamilie auf die Trächtigkeitslänge, wenn nur ET-Trächtigkeiten mit P-Embryonen untersucht wurden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass nicht nur die Zugehörigkeit der Stute zu ihrer Stutenfamilie, sondern auch die Genetik des Embryos einen Einfluss auf die Trächtigkeitsdauer hat.

5. Zusammenfassung

In dieser Diplomarbeit wird das Embryotransferprogramm des Brandenburgischen Haupt- und Landgestüts in Neustadt/Dosse, Deutschland, ausgewertet und es wird untersucht, ob die Trächtigkeitslänge der Embryotransfer-Empfängerstute durch ihre Zugehörigkeit zu einer bestimmten Stutenfamilie oder durch die Zugehörigkeit des Embryos zu einer anderen Stutenfamilie bestimmt wird.

Im Untersuchungszeitraum von 2008 bis 2019 wurden 326 Embryonenspülungen, davon 204 im Dienstleistungssektor und 122 bei gestüts eigenen Stuten durchgeführt. Die Embryonengewinnungsrate bei Spülungen lag im Dienstleistungssektor bei 38% und gestütsintern bei 44%. Die übertragenen Embryonen führten mit einer Erfolgsquote von 68% im Dienstleistungssektor und 70% gestütsintern zu positiven Trächtigkeitsuntersuchungen. Die insgesamt Erfolgsquote für den in Dienstleistung durchgeführten Embryotransfer für eine positive Trächtigkeitsuntersuchung liegt bei 26%. Für die Stuten des BHLG ergibt sich eine Embryotransfererfolgsquote von 25% für ein lebendes Fohlen.

Mit $336,9 \pm 0,7$ Tagen bei den eigenen Trächtigkeiten der Gestütsstuten und $338,8 \pm 1,4$ Tagen bei den Embryotransferträchtigkeiten liegen die Trächtigkeitslängen dieser Studie in den von der Literatur genannten Zeitspannen. Es konnte eine Tendenz zu einer längeren Trächtigkeitsdauer nach Embryotransfer festgestellt werden. In Bezug auf die eigenen Trächtigkeiten sowie bei den ET-Trächtigkeiten konnte ein signifikanter Einfluss der Stutenfamilie auf die Trächtigkeitslänge nachgewiesen werden ($p < 0,005$). Bei gleichzeitiger Betrachtung des Einflusses der Zugehörigkeit der Stute zu einer Stutenfamilie ergibt sich bei eigenen Trächtigkeiten und bei ET-Trächtigkeiten ein signifikanter Einfluss (Tabelle 4 und 5; $p < 0,005$) der Stutenfamilie auf die Trächtigkeitslänge. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass nicht nur die Zugehörigkeit der Stute zu ihrer Stutenfamilie, sondern auch die Genetik des Embryos einen Einfluss auf die Trächtigkeitsdauer hervorruft.

6. Summary

In this thesis, the embryo transfer program of the Brandenburg State Stud in Neustadt/Dosse, Germany, is evaluated and it is investigated whether the gestation length of the embryo transfer recipient mare is determined by her affiliation to a specific mare family or by the affiliation of the embryo to a different mare family.

During the study period from 2008 to 2019, a total of 326 embryo flushes were performed, with 204 in the service sector and 122 in stud-owned mares. The embryo recovery rate for flushes was 38% in the service sector and 44% internally at the stud. The transferred embryos resulted in positive pregnancy examinations with a success rate of 68% in the service sector and 70% internally at the stud. The overall success rate for embryo transfer performed in the service sector for a positive pregnancy examination is 26%. For the mares of the Brandenburg State Stud, the embryo transfer success rate is 25% for a live foal.

With 336.9 ± 0.7 days for the natural pregnancies of the stud-owned mares and 338.8 ± 1.4 days for the embryo transfer pregnancies, the gestation lengths in this study fall within the time frames mentioned in the literature. A tendency towards a longer gestation duration after embryo transfer was observed. Regarding both natural pregnancies and ET pregnancies, a significant influence of the mare family on gestation length was demonstrated ($p < 0.005$). When considering the mare's affiliation to a mare family, a significant influence of the mare family on gestation length was found for both natural pregnancies and ET pregnancies (Table 4 and 5; $p < 0.005$). From this, it can be concluded that not only the mare's affiliation to her mare family, but also the genetics of the embryo, have an impact on gestation duration.

7. Literaturverzeichnis

- Allen WR. 2005. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction in Domestic Animals* 40(4):310-29.
- Aurich C, Budik S. 2009. Durchführung von Embryonengewinnung und Embryotransfer bei der Stute. *Pferde Spiegel* 2:53–60.
- Campbell MLH. 2014. Embryo transfer in competition horses: Managing mares and expectations. *Equine Veterinary Education* 26(6):322-327.
- Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall D, McCue PM. 2000. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology* 54:965-979.
- Castagnetti C, Veronesi MC. 2008. Prognostic factors in the sick neonatal foal. *Veterinary Research Communication* 32 Supplement 1:87-91.
- Cuervo-Arango J, Claes AN, Ruijter-Villani M, Stout TA. 2017. Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. *Equine Veterinary Journal* 50(3):386-390.
- Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TAE. 2018. Horse embryo diameter is influenced by the embryonic age but not by the type of semen used to inseminate donor mares. *Theriogenology* 115:90-93.
- Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TA. 2019. The recipient's day after ovulation and the number of corpora lutea influence the likelihood of pregnancy in mares following transfer of ICSI frozen embryos. *Theriogenology* 135:181-188.
- Davies Morel MCG, Newcombe JR, Holland SJ. 2002 Factors affecting gestation length in the Thoroughbred mare. *Animal reproduction science* 74 (3-4):175–185.
- Dicken M, Gee EK, Rogers CW, Mayhew IG. 2012. Gestation length and occurrence of daytime foaling of standardbred mares on two stud farms in New Zealand. *New Zealand veterinary journal* 60 (1):42–46.
- Ewert M, Lüders I, Böröcz J, Uphaus H, Distl O, Sieme H. 2018. Determinants of gestation length in Thoroughbred mares on german stud farms. *Animal reproduction science* 191:22–33.

- Heape W. 1891. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. *Proceedings of the Royal Society* 48:457-459.
- Iuliano MF, Squires EL, Cook VM. 1985. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. *Journal of Animal Science* 60(1):258-63.
- Koblischke P, Kindahl H, Budik S, Aurich J, Palm F, Walter I, Kolodziejek J, Nowotny N, Hoppen HO, Aurich C. 2008. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology* 70(7):1147-58.
- Koblischke P, Budik S, Müller J, Aurich C. 2010. Practical experience with the treatment of recipient mares with a non-steroidal anti-inflammatory drug in an equine embryo transfer programme. *Reproduction in Domestic Animals* 45(6):1039-41.
- Kraemer DC. 1983. Intra- and interspecific embryo transfer. *The journal of experimental zoology* 228:363-371.
- Kuhl J, Stock KF, Wulf M, Aurich C. 2015. Maternal lineage of Warmblood mares contributes to variation of gestation length and bias of foal sex ratio. *PLoS One* 10(10):e0139358.
- Langlois B, Blouin C. 2012. Genetic parameters for gestation length in french horse breeds. *Livestock Science* 146 (2-3):133–139.
- Lester GD. 2005. Maturity of the neonatal foal. *The veterinary clinics of North America. Equine practice* 21 (2):333–355.
- Marinone AI, Losinno L, Fumuso E, Rodríguez EM, Redolatti C, Cantatore S, Cuervo-Arango J. 2015. The effect of mare's age on multiple ovulation rate, embryo recovery, post-transfer pregnancy rate, and interovulatory interval in a commercial embryo transfer program in Argentina. *Animal Reproduction Science* 158:53–59.
- McCue PM, Ferris RA, Lindholm AR, DeLuca CA. 2010. Embryo recovery procedures and collection success: Results of 492 embryo-flush attempts. *Theriogenology* 56:318-321.
- McKinnon AO, Squires EL. 1988. Equine embryo transfer. *Veterinary clinics of North America. Equine Practice* 4(2):305-333.
- Nagel C, Melchert M, Aurich C, Aurich J. 2020. Differences in endocrine and cardiac changes in mares and her fetus before, during, and after parturition in horses of different size. *Animals (Basel)* 10(9):1577.

- Oguri N, Tsutsumi Y. 1974. Non-surgical egg transfer in mares. *Journal of Reproduction and Fertility* 41:313-320.
- Panzani D, Rota A, Marmorini P, Vannozzi I, Camillo F. 2014. Retrospective study of factors affecting multiple ovulations, embryo recovery, quality, and diameter in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology* 82:807-814.
- Rodrigues JA, Gonçalves AR, Antunes L, Bettencourt EV, Gama LT. 2020. Genetic and environmental factors influencing gestation length in Lusitano horses. *Journal of equine veterinary science* 84:102850.
- Rossdale PD. 1976. A clinician's view of prematurity and dysmaturity in Thoroughbred foals. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 69(9):631-2.
- Rossdale PD. 1993. Clinical view of disturbances in equine foetal maturation. *Equine veterinary journal. Supplement* (14):3–7.
- Squires EL, McCue PM, Vanderwall D. 1999. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology* 51:91-104.
- Stout TAE. 2006. Equine embryo transfer: review of developing potential. *Equine Veterinary Journal* 38(5):467-478.
- Valera M, Blesa F, Dos Santos R, Molina A. 2006. Genetic study of gestation length in Andalusian and Arabian mares. *Animal reproduction science* 95 (1-2):75–96.
- Viana J. 2020. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter of the International Embryo Technology Society* 38:4.
- Willmann C, Schuler G, Hoffmann B, Parvizi N, Aurich C. 2011. Effects of age and altrenogest treatment on conceptus development and secretion of LH, progesterone and eCG in early pregnant mares. *Theriogenology* 75(3):421-8.