

Congélation du sperme de verrat Résultats observés sur le terrain en Belgique pendant les années 1995 et 1996

P. THILMANT

*Centre Interprofessionnel pour l'Amélioration et la Promotion animales (C.I.A.P.)
Rue St Rémy, 5 - B4601 Argenteau, Belgique*

Congélation du sperme de verrat : Résultats observés sur le terrain, en Belgique, pendant les années 1995 et 1996

Une méthode de congélation-décongélation de la semence de verrat a été mise au point au C.I.A.P. en utilisant des paillettes françaises de 0,5 ml.

Pendant l'année 1995, 199 truies de phénotype Landrace Belge provenant de 48 exploitations différentes ont été inséminées, en notre présence, avec de la semence congelée provenant de 13 verrats de 4 races différentes. Comparés aux résultats obtenus avec de la semence fraîche, aucune différence significative de fertilité et de prolificité n'a été observée (79,9% vs 80,3% et 10,1 vs 9,8 goretés nés totaux en semence congelée et fraîche respectivement). Par contre une différence significative est enregistrée au niveau de la fertilité des truies dont la parité est différente de 0 lorsqu'elles sont inséminées une ou deux fois pendant la période œstrale (simple dose: le pourcentage de gestation est de 67,7%; double dose: le pourcentage de gestation est de 84,9%). Du point de vue prolificité, l'écart n'est pas significatif (9,9 porcelets en simple dose contre 10,4 en double dose).

En 1996, 298 truies réparties dans 29 exploitations ont été inséminées sans contrôle systématique des chaleurs de notre part. Un taux de gestation de 76,2% et une prolificité de 9,4 porcelets nés sont observés. Cette diminution déterminée aussi par la méthode BLUP (-0,5 goret) de la taille de portée (10,1 en 1995) peut s'expliquer par l'utilisation de 2 paillettes en moins lors de la première insémination (5 au lieu de 7) mais peut-être aussi par une approximation moins bien ciblée de l'éleveur du moment idéal de l'insémination.

Au vu de ces résultats, nous pensons que le procédé de congélation-décongélation que nous avons développé est fiable si l'on travaille avec rigueur et utilisable dans les conditions de la pratique. Cependant, il nous paraît impératif de bien cibler le moment de l'ovulation, la congélation pouvant diminuer la durée de fécondance des spermatozoïdes.

Cryopreservation of boar semen : field results in Belgium during 1995 and 1996

CIAP has developed a freezing/thawing method for boar semen using 0.5 ml French straws.

In 1995, 199 Belgian Landrace phenotype sows from 48 different herds were inseminated under the supervision of the author with frozen semen from 13 boars of four different breeds. There were no significant differences in fertility and prolificity compared with the results obtained using fresh semen (79.9 vs 80.3% and 10.1 vs 9.8 total piglets born using frozen vs. fresh semen, respectively). In contrast, there was a significant difference in the fertility of the sows (nulliparous vs. primiparous and multiparous) when they were inseminated once or twice during the oestrus period (the conception rate was 67.7% for single insemination and 84.9% for two inseminations). However, the difference in prolificity was not significant (9.9 piglets for single insemination vs. 10.4 for two inseminations).

In 1996, 298 sows from 29 different herds were inseminated without the author systematically checking that the animals were in heat. The resulting conception rate and prolificity were 76.2% and 9.4 total piglets born, respectively. The drop in litter size observed (9.4 compared to 10.1 in 1995), was also confirmed by BLUP (-0.5 piglet) and can be explained by the use of fewer straws for the first insemination (5 instead of 7) but perhaps also by less accurate targeting by the inseminator of the ideal time for insemination.

Therefore, we believe that the freezing/thawing technique that we have developed is reliable if one works carefully and is effective when used in field conditions. However, it is imperative that the moment of ovulation be determined with precision, as freezing can shorten the period during which the spermatozoa is fertile.

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières décennies, la conservation du sperme de verrat à basse température a fait l'objet de nombreuses recherches (POLGE et al., 1970 ; PURSEL et JOHNSON, 1971, 1975 ; CRABO et EINARSSON, 1971; PAQUIGNON et al., 1974; LARSSON et EINARSSON, 1976; WESTENDORF et al., 1975 ; HAMMITT et MARTIN, 1989ab). Celles-ci ont porté sur la composition du dilueur, la nature et la concentration du cryopréservateur ainsi que sur la méthode de congélation en pastilles, en pailles (PAQUIGNON et al, 1986) et, plus récemment, en paillettes (FISER et FAIRFULL, 1990) ou en pochettes (BWANGA et al., 1991; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1996). Bien que des progrès considérables aient été enregistrés, les résultats de fertilité et de prolificité restaient encore souvent à la limite de la rentabilité en raison des dommages cellulaires encourus par le sperme pendant le processus de congélation-décongélation (COURTENS et al., 1985).

Ainsi, en nous inspirant des résultats des recherches déjà publiées, nous avons mis au point une technique de congélation en paillettes françaises de 0,5 ml qui soit facilement réalisable sur le terrain avec un taux de réussite proche de celui de la semence fraîche (THILMANT, 1997). Les inséminations ont eu lieu en exploitations durant les années 1995 et 1996.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Protocole de congélation-décongélation de la semence

Celui-ci est effectué suivant la méthode du C.I.A.P. (THILMANT, 1997).

1.2. Contrôle in vitro après décongélation de la qualité de la semence rediluée

- Une évaluation de la motilité et du pourcentage de spermatozoïdes mobiles de la semence diluée juste après décongélation (grossissement 100 fois sur fond noir). Classement en 5 catégories :
 - α = spermatozoïdes fléchants
 - β = déplacements rapides et rectilignes des spermatozoïdes
 - γ = trajectoires curvilignes et/ou déplacements lents
 - δ = spermatozoïdes vibrants faibles déplacements
 - ε = spermatozoïdes vibrants en rotation sur eux-mêmes
 Critère minimum pour insémination: β et 70% de spermatozoïdes mobiles
- Appréciation de la thermo-résistance à 38°C toutes les heures pendant 4 heures.
Critère minimum: γ 50% après 3 heures ;

Coloration à l'éosine-nigrosine et examen microscopique sur fond noir de 200 spermatozoïdes au grossissement 1000x en vue de déterminer la morphologie de l'acrosome (normal ou anormal c'est-à-dire vacuolisé, invaginé, gonflé, éclaté) et le nombre de spermatozoïdes vivants.

Nous avons aussi réparti les spermatozoïdes en 4 classes (BAMBA, 1988) :

- classe 1: non teintés et acrosomes normaux
- classe 2: teintés et acrosomes normaux
- classe 3: non teintés et acrosomes anormaux
- classe 4: teintés et acrosomes anormaux

Critère minimum: 50% d'acrosomes normaux (1 et 2) et 65% de spermatozoïdes vivants (1 et 3).

1.3. Essai sur le terrain pendant l'année 1995

Cette première expérimentation concerne 13 verrats de races Large-White (n=1), Landrace Belge (n=3), Piétrain Belge (n=9) et Réhal, stress négatif hétérozygote (n=2). Les éjaculats collectés de ces verrats contiennent au moins 85% de bons spermatozoïdes.

Les 199 truies inséminées pendant leur période d'immobilité sont de phénotype Landrace Belge et réparties dans 48 exploitations différentes.

Une dose d'insémination correspond à 7 paillettes soit environ $5,3 \times 10^9$ spermatozoïdes dilués dans 95 ml de BTS à 38°C. La semence diluée est utilisée en général endéans l'heure qui suit la décongélation et l'insémination est réalisée durant la phase d'immobilité de la truie. Si celle-ci est encore immobile le lendemain, elle est réinséminée avec une deuxième dose contenant soit 7, 5 ou 3 paillettes soit environ $5,3 \times 10^9$ spz; $3,8 \times 10^9$ spz ou $2,3 \times 10^9$ spz.

Le taux de gestation (fertilité) de ces truies est déterminé par échographie entre le 23^{ème} et le 42^{ème} jour après l'insémination et la prolificité par le nombre total de gorets nés (vivants + mort-nés).

1.4. Année 1996

Nous avons utilisé, pour cette deuxième année, 19 verrats de races Landrace Belge (n=7), Piétrain Belge (n=10) et Réhal (n=2).

Deux cent quatre vingt dix huit truies (phénotype Landrace Belge) réparties parmi 29 exploitations sont inséminées avec de la semence ayant subi le même protocole de congélation. Cette fois, une dose équivaut à 5 paillettes soit environ $3,8 \times 10^9$ spermatozoïdes. Nous avons partiellement utilisé de la semence dont la qualité est inférieure aux critères minimum décrits ci-avant; de 73 à 84% spz. normaux dans l'éjaculat avant congélation et, après le processus de congélation-décongélation, de 34 à 49% d'acrosomes normaux, de 59 à 65% de spz. vivants et une diminution de la thermorésistance (inférieur à γ 50 à 3h). Des truies ayant eu des retours en oestrus (repeat breeders) sont aussi réinséminées avec de la semence congelée. A la différence de l'année 1995, certains exploitants ont assuré, partiellement, la mise en place de doses sans aucun contrôle de notre part sur l'état des chaleurs des truies inséminées.

Les résultats de fertilité et de prolificité sont recueillis de la même manière que précédemment (année 1995) et pourront être comparés à ceux-ci.

De plus, connaissant la valeur génétique de la prolificité de 92 truies inséminées cette année, il nous est possible de cerner avec précision l'effet de la semence congelée sur le nombre de porcelets nés (méthode d'évaluation BLUP- Best Linear Unbiased Predictor).

et de la concentration en spermatozoïdes totaux utilisée lors de la 2^e insémination (7, 5 ou 3 paillettes) pendant le même œstrus. Les utilisations occasionnelles de 6 ou de 4 paillettes lors des inséminations sont dues à des accidents au cours de la manipulation.

a) *taux de gestation* : la seule différence significative est observée lors de l'utilisation de la simple ou de la double dose (70,3% de gestations et 85,6% respectivement). Cet écart est encore plus important pour les truies ayant mis bas au moins une fois (67,7% et 84,9% respectivement). Le taux de gestation a été de 87,1% chez les cochettes (nullipares) contre 78,6% chez les autres truies (primipares et multipares). L'usage de la double dose ou de la simple dose chez les cochettes (89,5% et 83,3% de gestation respectivement) ne semble générer que peu de différence.

De même, il n'existe pas de différence significative entre l'utilisation de 7, de 5 ou de 3 paillettes lors de la deuxième insémination (89,3%; 86,8%; 75% respectivement).

L'influence de la race ne paraît pas déterminante comme le montrent les pourcentages de gestation suivants : le Large-White (1 verrat) 80% de gestations, le Landrace Belge (3 verrats différents) 84,9%, le Piétrain Belge (7 verrats) 79,2% et le Rehal (2 verrats) 75%.

b) *prolificité* : aucune différence significative n'a été observée entre l'utilisation d'une simple ou d'une double dose (9,7 goretés nés totaux et 10,3 respectivement). Un goret supplémentaire est normalement observé entre la série des truies ayant eu au moins une gestation (10,3 goretés) et celle des cochettes (9,2). De même, nous n'avons remarqué que peu de différences entre races (Large-White: 11 porcelets; Landrace Belge : 11,2; Piétrain: 9,7; Réhal : 10) et selon le nombre de paillettes pour la deuxième insémination (7 paill. : 10,6 goretés; 5 paill. : 9,9; 3 paill. : 9,9).

2.2. Essais de terrain: année 1996

2.2.1. Résultats généraux

L'échographie nous a permis de diagnostiquer 227 gestations sur 298 truies inséminées avec de la semence congelée soit une fertilité de 76,2%. Celle-ci comparée à l'année 1995 (79,9%, en semence congelée), ne présente pas de différence significative.

De ces 227 gestations, 188 truies ont mis bas, 11 ont avorté, 2 sont mortes, 1 est vendue et 25 cochettes sont abattues 40 jours après insémination pour une autre expérience. Nous avons enregistré la naissance de 1767 goretés (1617 nés-vivants et 150 mort-nés) soit une moyenne de $9,4 \pm 3,2$ par nichée. La diminution de la prolificité par rapport à 1995 en semence congelée (10,1 goretés) est presque significative (tableau 3).

De plus, en se rapportant au tableau 4, nous remarquons une différence significative au niveau de la prolificité (- 0,7 goret pour la semence congelée).

De même, nous avons déterminé, avec davantage de précision, un effet de -0,5 goret lors de l'utilisation de cette semence en analysant les résultats de prolificité de 92 truies dont nous connaissions les valeurs génétiques (BLUP).

2.2.2. Influence de différents facteurs

Le tableau 5 résume les résultats obtenus en fonction de l'âge de la truie et de l'utilisation d'une simple ou double dose, des inséminations réalisées chez des "repeat breeders" (type 1) ou non (type 2) et de la qualité de la semence utilisée.

a) *taux de gestation* : la seule différence significative est observée lors de l'utilisation de la simple dose chez la truie ayant mis bas au moins une fois (37,5% contre 77,6% pour

Tableau 3 - Comparaison des résultats obtenus en 1996 et en 1995 avec la semence congelée

| Semence congelée | Fertilité | | | Prolificité | | |
|------------------|-----------|-------|---|--------------|-------|----|
| 1995 | 79,9% | (199) | * | 10,08 ± 3,27 | (149) | |
| 1996 | 76,2% | (298) | * | 9,40 ± 3,24 | (188) | ns |

* Confirmation par échographie entre 23 et 42 jours après insémination.

ns : Différence non significative; fertilité et prolificité: test de t $p > 0,05$

Fertilité: truies gestantes/truies inséminées (n)x100

Prolificité: nombre moyen de goretés nés totaux par mise bas (n)

Tableau 4 - Comparaison de la semence congelée avec la semence fraîche (1996)

| Semence | Fertilité | | | Prolificité | | |
|-----------------|-----------|--------|----|-------------|--------|-------|
| Congelée | 76,2% | (298) | * | 9,4 ± 3,2 | (188) | |
| Fraîche | 80,4% | (1996) | ** | 10,1 ± 3,1 | (5262) | *** s |

* Confirmation par échographie entre 23 et 42 jours après insémination.

** Données récoltées au CIAP pendant l'année 1996. Les inséminations ont été réalisées par les vétérinaires du centre. Dans ce cas, les truies qui n'ont pas été réinséminées sont considérées comme gestantes.

*** Données récoltées en 1996 sur l'ensemble des GTT (gestion technique des troupeaux) traitées au CIAP.

s: Différence significative; prolificité: test de Z $p > 0,05$.

Fertilité: truies gestantes/truies inséminées (n) x 100

Prolificité: nombre moyen de goretés nés totaux par mise bas (n)

Tableau 5 - Effets de différents facteurs lors de l'utilisation de la semence congelée (1996)

| | Fertilité | | | Prolificité | | |
|------------------------------|-----------|-------|------------|-------------|-------|----|
| Cochettes s.d. | 82,9% | (41) | ns | 8,6 ± 2,9 | (9) | ns |
| Cochettes d.d. | 77,4% | (31) | ns | 9,0 ± 3,7 | (20) | ns |
| Truies s.d. | 37,5% | (16) | | 9,0 ± 4,2 | (6) | ns |
| Truies d.d. | 77,6% | (210) | | 9,5 ± 3,2 | (153) | ns |
| | | | $p < 0,05$ | | | |
| Tr "no repeat" type 1 | 76,7% | (280) | ns | 9,5 ± 3,3 | (180) | ns |
| Tr "repeat" type 2 | 57,1% | (7) | ns | 4 | (1) | ns |
| Non communiqué | 72,7% | (11) | ns | 8,6 ± 0,5 | (7) | ns |
| Sem. "cat bonne" | 74,5% | (208) | ns | 9,3 ± 3,3 | (122) | ns |
| Sem. "cat moyenn" | 79,3% | (82) | ns | 9,7 ± 3,3 | (59) | ns |
| Sem. "cat inconnue" | 77,8% | (8) | ns | 8,7 ± 1,8 | (7) | ns |

sd : Simple dose

dd : Double dose

ns : Différence non significative; fertilité : test de t

prolificité: test de t $p > 0,05$

Fertilité: truies gestantes/truies inséminées (n)x100

Prolificité: nombre moyen de gorets nés totaux par mise bas (n)

la simple et double dose respectivement). En ce qui concerne les cochettes, cette différence n'est pas significative (82,9% et 77,4% resp.).

Nous n'avons pas remarqué d'écart significatif avec l'emploi de la semence dont les critères avant ou après congélation étaient en-dessous de ceux déjà décrits (catégorie moyenne). Cette catégorie est même meilleure, contre toute attente, que celle (cat. bonne) qui les respecte (79,3% contre 74,5% respectivement).

Quoique la différence ne soit pas non plus significative, les truies qui sont déjà revenues en oestrus (rechauffantes ou repeat breeders) paraissent avoir une fertilité réduite (57,1% contre 76,7%).

b) *prolificité* : aucune différence significative n'a été observée entre l'utilisation d'une simple ou d'une double dose parmi les cochettes (8,6 gorets nés totaux et 9 respectivement) et les autres truies (9 et 9,5 resp.). 9,5 porcelets sont nés de truies inséminées de type 1 (qui ne sont pas revenues en oestrus). Nous n'avons eu qu'une seule mise-bas avec 4 gorets pour une truie "rechauffante ou type 2". L'utilisation de semence de qualité inférieure aux critères habituels n'est pas non plus déterminante. On ne retrouve pas à ce niveau de différence significative malgré de meilleurs résultats pour la catégorie "moyenne" (9,3 et 9,7 gorets pour les catégories "bonne" et "moyenne" respectivement).

3. DISCUSSION

3.1. Année 1995

L'analyse des données obtenues en 1995 (tableaux 1 et 2) montre qu'il n'existe pas de différence significative de la fertilité après l'utilisation de la semence fraîche ou congelée lorsqu'on pratique deux inséminations successives (avec 7 paillettes pour la première). Par contre celle-ci diminue quand on ne procède qu'à une seule insémination avec de la semence congelée. En effet, sur 125 truies inséminées une deuxième fois pendant les chaleurs, 85,6 % sont diagnostiquées gestantes alors que pour les 74 autres truies

inséminées une seule fois, ce pourcentage est de 70,3%. Si cette différence est significative pour les vieilles truies (84,9% vs 67,7%) elle ne l'est pas pour les nullipares (89,5% vs 83,3%).

Du point de vue prolificité, nous n'avons relevé de différence significative ni entre les inséminations réalisées avec la semence congelée ou fraîche (10,1 gorets vs 9,8) ni entre les différents facteurs décrits dans le tableau 2.

Au vu de ces résultats, la technique de congélation-décongélation et le protocole d'insémination que nous avons mis en oeuvre en 1995 sont fiables et facilement utilisables dans les conditions de la pratique. Ils constituent un progrès par rapport à ceux encore récemment observés sur le terrain (ALMLID et HOFMO, 1996) montrant une nette diminution de la fertilité et de la prolificité. La deuxième insémination est nécessaire surtout chez les vieilles truies pour couvrir au mieux le moment de l'ovulation. Les moins bons résultats enregistrés lors d'une insémination simple peuvent en partie s'expliquer par une intervention trop tardive (ou par le fait que certains animaux ont présenté un œstrus plus court). Par contre, les truies fécondées, inséminées avec une ou deux doses, ont donné naissance au même nombre de porcelets. Il est donc fort probable que les spermatozoïdes décongelés ont aussi une survie plus réduite et que, par conséquent, le délai entre l'insémination et l'ovulation est plus court que lors d'utilisation de la semence fraîche. Le processus de congélation-décongélation endommage en partie la membrane et les organites cellulaires perturbant ainsi le métabolisme et, par là, la durée de fécondance des spermatozoïdes. Il faut remarquer en outre que lors de la seconde insémination, il n'y a pas de différence au niveau de la fertilité ni de la prolificité, que le nombre de paillettes utilisées soit de 7, 5 ou 3. Cette constatation vient confirmer le fait que si le moment de l'ovulation est bien déterminé, le nombre de spermatozoïdes à utiliser peut être réduit, d'où probablement l'intérêt d'induire artificiellement l'ovulation.

En ce qui concerne les différentes races de verrats, nous n'avons pas trouvé de différence significative du point de vue de la fertilité. Il convient de mentionner la meilleure

prolificité du Landrace Belge (11,2 goret) par rapport au Piétrain (9,7).

Cette différence s'expliquerait par le fait que la semence de Landrace Belge est surtout utilisée sur les truies les plus fécondes en vue d'obtenir les jeunes truies destinées à l'élevage. Le verrat Piétrain est, quant à lui, plus fréquemment utilisé comme verrat terminal pour la fabrication du porc charcutier en Belgique.

3.2. Année 1996

Les résultats de fertilité (76,2%) et de prolificité (9,4 goret) obtenus en 1996 ne présentent pas d'écart significatif par rapport à 1995 (en semence congelée) quoi qu'étant moins favorables (tableau 3).

Il faut néanmoins reconnaître que la taille moyenne observée des nichées pendant cette année est plus petite que celle obtenue en 1995 et que cet écart (0,7) est presque significatif. Par contre, cette perte de prolificité se remarque significativement, aussi, si l'on compare le nombre de goret obtenus en semence fraîche et en congelé en 1996 (10,1 vs 9,4). Cette diminution est en fait plus faible (0,5 goret) si l'on tient compte des différents effets dus au milieu (cfr Blup).

Plusieurs raisons pourraient expliquer ce moins bon résultat de 1996 :

- diminution du nombre de paillettes à la première insémination (5 au lieu de 7);
- absence de contrôle systématique de notre part de l'état des chaleurs des truies;
- problèmes sanitaires dus à l'accroissement de la propagation du virus de la PRRS (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) parmi les porcheries provoquant, entre autres, une baisse de la prolificité.

Nous remarquons cette fois encore la nécessité d'inséminer une deuxième fois les vieilles truies afin d'assurer un maximum de taux de gestation (77,6% vs 37,5% pour la simple dose). Cette différence est significative (tableau 5). Les bons résultats de fertilité (79,3%) et de prolificité (9,7) obtenus avec de la semence de qualité "moyenne" sont encourageants car nous pensons pouvoir diminuer, dans une certaine mesure, les critères minimum d'estimation de celle-ci.

CONCLUSION

Au vu de ces résultats, nous pensons que le procédé de congélation-décongélation que nous avons développé est fiable si l'on travaille avec rigueur et utilisable dans les conditions de la pratique. Cependant, il nous paraît impératif de bien cibler le moment de l'ovulation, la congélation pouvant diminuer la durée de fécondance des spermatozoïdes.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier bien vivement Monsieur le Professeur ECTORS et son équipe (Service d'Obstétrique et de Pathologie de la Reproduction - Université de Liège) pour toute l'aide scientifique qu'ils nous ont apportée ainsi que les membres du personnel du CIAP qui n'ont pas ménagé leur aide et leurs encouragements.

Cette recherche a été subsidiée par la Région Wallonne (arrêté ministériel du 22/04/93) et la Province de Liège.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALMLID T., HOFMO P.O., 1996. *Reprod. Domest. Anim.*, 31, 169-173
- BAMBIA K., 1988. Evaluations of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using eosin-nicrosin stain. *Theriogenology*, 29,1245-1251.
- BWANGA C.O., EINARSON S., RODRIGUEZ-MARTINEZ H., 1991. *Reprod. Domest. Anim.*, 26, 117-125
- COURTENS J.L., PAQUIGNON M., 1985. *First Int. Conf. Deep Freezing Boar Semen*, Uppsala, 61-87.
- CRABO B., EINARSSON S., 1971. *Acta Vet. Scand.*, 12,125-127.
- FISER P.S., FAIRFULL R.W., 1990. *Molecular Reproduction and Development*, 25, 123-129.
- HAMMITT D.G., MARTIN P.A., 1989a. *Theriogenology*, 32,359-368.
- HAMMITT D.G., MARTIN P.A., 1989b. *Theriogenology*, 32,369-384.
- LARSSON K., EINARSSON S., 1976. *Acta Vet. Scand.*, 17,43-62.
- PAQUIGNON M., MERGOUNIS D., COUROT M., Du MESNIL du BUISSON F., 1974. *Journées Rech. Porcine en France*, 6, 71-76.
- PAQUIGNON M., QUELLIER P., DACHEUX J.L., 1986. *Ann. Zootech.*, 35, 173-184.
- POLGE C., SALAMON S., WILMUT I., 1970. *Vet. Rec.*, 87,424-428.
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A., 1971. *J. Anim. Sci.*, 33,265(abstr).
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A., 1975. *J. Anim. Sci.*, 40,99-102.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H., ERIKSSON B., LUNDEHEIM N., 1996. *Reprod. Domest. Anim.*, 31,161-168.
- THILMANT P., 1997. *Ann. méd. vét.*, 141, 457-462
- WESTENDORF P., RICHTER L., TREU H., 1975. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 82,261-267.