

Aus dem Departement für Fortpflanzungskunde der Universität Zürich  
(Vorsteher a.i.: Prof. Dr. U. Braun) und

dem Nationalgestüt Avenches (Direktor: Dr. P. A. Poncet)

Arbeit unter der Leitung von Dr. F. Janett

## **Jahreszeitliche Schwankungen der Samenqualität bei Freibergerhengsten**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Zürich

vorgelegt von

STEFAN BETTSCHEN Tierarzt

von Burgdorf BE

Genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. R. Thun, Referent  
Prof. Dr. E. Scharrer, Korreferent

Zürich 2002

Zentralstelle der Studentenschaft

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Bedeutung der künstlichen Besamung beim Pferd .....	1
1.2.	Einflussfaktoren bezüglich der Samenqualität.....	4
1.3.	Fragestellung .....	6
<b>2.</b>	<b>TIERE, MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>7</b>
2.1.	Tiere .....	7
2.2.	Versuchsanordnung.....	7
2.3.	Samengewinnung .....	8
2.4.	Samenverarbeitung.....	8
2.5.	Untersuchungen im Frischsamen .....	10
2.5.1.	Volumen .....	10
2.5.2.	Dichte .....	10
2.5.3.	Gesamtspermienzahl .....	10
2.5.4.	Motilität.....	10
2.5.5.	Morphologie.....	12
2.6.	Untersuchungen im aufgetauten Samen.....	12
2.6.1.	Motilität.....	12
2.6.2.	Vitalität.....	13
2.6.3.	Osmotischer Resistenztest (ORT).....	14
2.7.	Statistik.....	15
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>16</b>
3.1.	Samenqualität im Frischsamen .....	16
3.1.1.	Jahreszeitliche Schwankungen.....	16
3.1.2.	Individuelle Schwankungen.....	22
3.1.3.	Einfluss von Hengst und Zeitpunkt der Samengewinnung.....	27

3.1.4.	Saisonale Unterschiede .....	28
3.2.	Samenqualität im aufgetauten Samen .....	29
3.2.1.	Schwankungen im Winterhalbjahr .....	29
3.2.2.	Individuelle Schwankungen .....	31
3.2.3.	Einfluss von Hengst und Zeitpunkt der Samengewinnung .....	33
3.2.4.	Unterschiede zwischen Herbst und Winter .....	34
3.3.	Korrelationen zwischen den verschiedenen Samenqualitätsparametern ....	35
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>36</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>42</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>44</b>
<b>7.</b>	<b>APPENDIX .....</b>	<b>46</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>49</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>55</b>
<b>10.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>56</b>

# 1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

## 1.1. Bedeutung der künstlichen Besamung beim Pferd

Erste historische Angaben über die künstliche Besamung (KB) beim Pferd findet man bereits in arabischen Texten aus dem 14. Jahrhundert. Der Legende nach wurde von einem arabischen König der Samen eines wertvollen Hengstes seines Rivalen aus der Scheide einer soeben gedeckten Stute gestohlen. 1776 benutzte SPALLANZANI (Abt in Pavia, Italien), der anerkannte Vater der KB, Hengstsamen um die Auswirkungen von Kühlung auf Spermien zu untersuchen. Ende des 18. Jahrhunderts versuchten Wissenschaftler in Frankreich und Deutschland erstmals Stuten künstlich zu besamen. 1899 untersuchte IWANOFF im russischen Reichsgestüt die Anwendbarkeit der KB im Gestütswesen. In den Laboratorien der Veterinärverwaltung in St. Petersburg setzte er seine Versuche fort und befasste sich mit der Entwicklung geeigneter Instrumente zur Samengewinnung und -übertragung. Diese Arbeiten gewannen vor allem nach dem ersten Weltkrieg grosse Bedeutung, als der dezimierte Pferdebestand wieder aufgebaut werden musste. Bereits 1938 besamen Tierärzte in Russland rund 150'000 Stuten. In Westeuropa waren es vor allem die Deutschen, welche die KB in erster Linie zur Bekämpfung von Deckseuchen eingesetzt hatten und im Nationalgestüt Avenches leitete 1966 WIERZBOWSKI aus Krakau die ersten Experimente mit gekühltem Hengstsamen. Das erste „CH“-Fohlen aus einer KB erblickte 1969 in Avenches das Licht der Welt. Ebenfalls im Nationalgestüt wurden erstmals 1977 Untersuchungen über die Auswahl von Hengsten als Samenspender für die instrumentelle Samenübertragung von Tiefgefriersamen und erste systematische Samentiefgefrierungen einzelner Hengste vorgenommen. Insbesondere der Ausbruch der kontagiösen equinen Metritis (CEM, ansteckende Gebärmutterentzündung) im Jahre 1988 führte dazu, die Technik der KB beim Pferd routinemässig anzuwenden.

Zu den Vorteilen der KB (Tab. 1) gehören in erster Linie die Verhinderung der Ausbreitung ansteckender Geschlechtskrankheiten (Deckseuchen) sowie die geographische Unabhängigkeit von Stute und Hengst, die einen schnelleren Zuchtfortschritt ermöglicht. Zusätzlich werden die Stuten intensiver betreut als im Natursprung, insbesondere wenn Follikelwachstum und Ovulationszeitpunkt sonographisch kontrolliert werden. Für den Hengsthalter sind der rationalisierte Einsatz sowie die verminderte Stressbelastung des Hengstes während der Decksaison von grosser Bedeutung. Bei Frisch- und Kühlsamenübertragungen dürfen mindestens gleichwertige Trächtigkeitsraten wie beim Natursprung erwartet werden.

In den letzten Jahren gewann auch das Tiefgefrieren von Equidensamen immer mehr an Bedeutung. Heute werden in der Schweiz knapp zwei Drittel der Zuchtstuten künstlich besamt, ungefähr ein Drittel davon mit Gefriersamen. Durch die Kryokonservierung kann die Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen während Jahrzehnten erhalten bleiben. In der Zucht ermöglicht dies eine weitgehend geographische und zeitliche Unabhängigkeit bezüglich Hengst- und Stutenstationierung sowie eine bedeutend grössere Hengstauswahl. Als Nachteil der KB mit Tiefgefriersamen müssen im Vergleich zur Frischsamenübertragung der höhere Arbeitsaufwand für die Follikelkontrollen sowie eine geringere Trächtigkeitsrate in Kauf genommen werden. Hauptgrund für die schlechteren Konzeptionsraten nach Gefriersamenübertragung sind vor allem die durch das Einfrieren und Auftauen hervorgerufenen Membranschädigungen, welche Vitalität und Befruchtungsfähigkeit der Spermien deutlich mindern. Unter günstigen Bedingungen können aber am Ende der Saison ebenfalls Trächtigkeitsraten von mehr als 80% erreicht werden (Samper, 2000). Günstige Bedingungen bedeuten eine gute Qualität des aufgetauten Samens sowie geschlechts gesunde Stuten, die unter Follikel- bzw. Ovulationskontrolle zum richtigen Zeitpunkt besamt werden. Da jedoch die Trächtigkeitsrate pro Zyklus mit Gefriersamen in der Regel geringer ist als mit Kühl- oder Frischsamen (30-40% vs. 50%), müssen die Stuten pro Saison oft mehrmals besamt werden (Pickett und Amann, 1993; Graham, 1996).

Die künstliche Besamung ist heutzutage nicht mehr aus der Pferdezucht wegzudenken. Die fortschreitende Entwicklung der KB in der Schweiz wirkt gezwungenermassen auch Fragen zur Bestimmung der Samenqualität, der Kryokonservierbarkeit sowie deren Einflüsse auf die Fruchtbarkeit auf.

**Tab. 1.** Vorteile der künstlichen Besamung.

Bekämpfung von Deckseuchen	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Kein direkter Kontakt zwischen Stute und Hengst beim Decken</li> <li>➤ Hygienische Samengewinnung</li> <li>➤ Keimreduktion durch antibiotikahaltige Verdüner und geringe Volumina der Besamungsdosen</li> <li>➤ Hygiene bei der Samenübertragung (Wegwerfbesamungsinstrumente)</li> </ul>
Zuchtfortschritt	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Geographische und zeitliche Unabhängigkeit von Stute und Hengst</li> <li>➤ Effiziente Nutzung von nachzuchtgeprüften Hengsten</li> </ul>
Hengstmanagement	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Rationeller Zuchteinsatz</li> <li>➤ Geringeres Verletzungsrisiko</li> <li>➤ Samenqualitätskontrolle</li> <li>➤ Zuchteinsatz über den Tod des Hengstes hinaus möglich</li> </ul>
Stutenmanagement	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Höhere Trächtigkeitsraten</li> <li>➤ Geringeres Verletzungsrisiko</li> <li>➤ Stuten, die den Hengst verweigern, können besamt werden</li> </ul>

## **1.2. Einflussfaktoren bezüglich der Samenqualität**

Einflüsse auf die Qualität und die Kryokonservierbarkeit von Hengstsamen sind vor allem bei Anwendung der KB von grosser Bedeutung. Verschiedene Untersuchungen, vor allem bei Vollblütern, zeigen, dass adäquate Bewegung, Fütterung, Haltung und Pflege der Hengste sich positiv auf die Samenqualität auswirken (Pickett, 1993). Nebst dem Hengstmanagement wirken sich natürlich auch die Deckfrequenz und die Handhabung des Frisch- und Gefriersamens auf dessen Qualität aus (Malmgren, 1997). Angaben über mögliche rassenbedingte Unterschiede sind in der Literatur (Colenbrander et al., 1992; Dowsett und Knott, 1996) kaum vorhanden. Hingegen ist bekannt, dass verschiedene Hengste deutliche individuelle Unterschiede aufweisen, wobei vor allem Volumen, Dichte, Motilität und die Membranintegrität der Spermien betroffen sind (Johnson und Thompson, 1983; Magistrini et al., 1987; Jasko et al., 1991).

Obwohl einige Autoren (Pickett und Amann, 1993; Samper et al., 1994) berichten, dass sich Ejakulate gewisser Hengste unabhängig von der Qualität für den Gefrierprozess besser eignen (good freezers) als andere (poor freezers), ist andererseits bekannt, dass vor allem die Dichte und Motilität des Frischsamens auf die Qualität des Gefriersamens grossen Einfluss haben können (Samper et al., 1994). Was die Samenverarbeitung und den Gefrierprozess angeht, sind der verwendete Verdünner, die Samendichte, die Intensität und Dauer der Zentrifugation, die Einfriereschwindigkeit (Cochran et al., 1984; Blach et al., 1989) sowie die Auftautemperatur (Borg et al., 1997) als wesentliche Einflussfaktoren schon länger bekannt.

Saisonbedingte Schwankungen bezüglich Hormonhaushalt und im Sexualverhalten beim Hengst wie auch bei der Stute sind ebenfalls schon länger bekannt und werden durch jahreszeitliche Veränderungen der Tageslichtdauer (Photoperiodik)

---

hervorgerufen (Pickett et al., 1989). Aus mehreren Untersuchungen (Irvine und Alexander, 1982; Clay und Clay, 1992) geht deutlich hervor, dass bei zunehmenden Tageslichtlängen (Langtage) die Hodenfunktion und damit auch die Konzentrationen testikulärer Hormone (Testosteron, Oestrogene, Inhibin) im Seminalplasma (Braun et al., 1996) und im Blut (Byers et al., 1983) zunehmen. Dies führt zu einer Steigerung von Libido und Spermatogenese sowie einer Stimulation der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Harris et al., 1982). Da der photoperiodische Effekt in unseren Breitengraden im ersten Halbjahr stattfindet, wird das Pferd zu den frühjahrsbrünstigen Tieren gerechnet. Bei herbstbrünstigen Tieren, wie Schaf und Ziege, liegen die Verhältnisse gerade umgekehrt, da die Gonadenaktivität durch Abnahme der Tageslichtdauer (Kurztag) stimuliert wird (Thun, 1995).

Über saisonale Veränderungen der Samenqualität liegen nur spärliche und zum Teil widersprüchliche Berichte vor (Van der Holst, 1975; Pickett et al., 1976; Magistrini et al., 1987; Jasko et al., 1991), wobei für das Freibergerpferd diesbezügliche Referenzwerte gänzlich fehlen.

### **1.3. Fragestellung**

Seit Beginn des kommerziellen Einsatzes der künstlichen Besamung beim Pferd in den 80er Jahren wird nach standardisierten Methoden gesucht, die Qualität von Hengstsamen objektiv beurteilen zu können. Da die Samenqualität beim Freibergerhengst bis heute nie systematisch untersucht wurde und im Nationalgestüt aus organisatorischen Gründen Hengstsamen vor allem in den Wintermonaten (November bis Februar) und nicht während der physiologischen Fortpflanzungsperiode im Frühling und Sommer kryokonserviert wird, drängten sich folgende Fragestellungen auf:

Wie verändert sich die Samenqualität beim Freibergerhengst im Verlaufe eines Jahres?

Welche Unterschiede bestehen in der Kryokonservierbarkeit des Samens zwischen Herbst und Winter?

## **2. TIERE, MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Tiere**

Für die vorliegende Untersuchung standen 15 gekörte Zuchthengste der Freibergerrasse im Alter zwischen 4 und 23 Jahren zur Verfügung. Während der Decksaison (1. März bis 30. Juni) waren fünf Tiere im Jura (Le Crêt-du-Loche, Montfaucon, Les Breuleux), sechs im Kanton Bern (Bütschelegg, Bärau, Sumiswald) und vier in Avenches (Nationalgestüt) stationiert. Ausserhalb der Decksaison waren alle Hengste im Nationalgestüt in Boxen aufgestellt. Sie wurden während der Untersuchung in Boxen auf Stroh gehalten und erhielten täglich zweimal Heu (je 3kg), dreimal Hafer (je 1-2 Liter) sowie Pellets (je 1-2 Liter) und zusätzlich zweimal pro Woche Mash (aufgebrühter Hafer, Weizenkleie, Leinsamen, Glaubersalz). Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Zur Förderung der Kondition wurden die Hengste täglich im Auslauf (Weide oder Karussell) bewegt und/oder wurden eingespannt. Klimatische Einflüsse, Haltungsbedingungen sowie die Deckintensität konnten während der Zuchtsaison nicht standardisiert werden.

### **2.2. Versuchsanordnung**

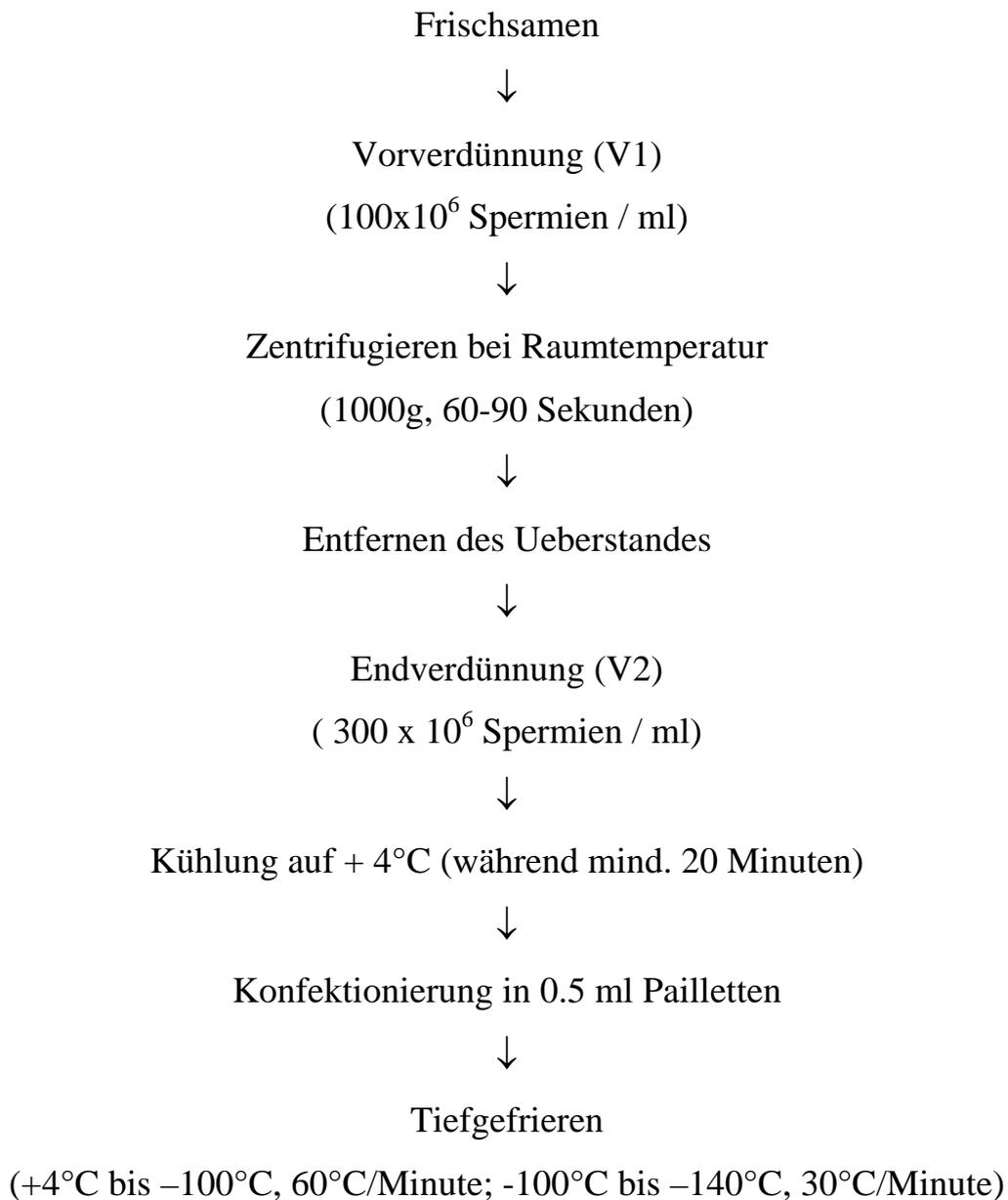
Vor Versuchsbeginn wurden die extragonadalen Spermienreserven durch Samenentnahmen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen minimiert und die Hengste ans Phantom gewöhnt (Hurtgen, 1992). Während der einjährigen Versuchsdauer wurden alle Hengste monatlich abgesamt und die Samenqualität im Frischsamen bestimmt. Im Herbst und Winter (September bis Februar) wurden die Hengste regelmässig in wöchentlichen Abständen abgesamt und der Samen einmal pro Monat untersucht und tiefgefroren. Während des Frühlings und Sommers wurden die Hengste unregelmässig im Natursprung eingesetzt, so dass Deckfrequenz und Gesamtzahl der Sprünge von Hengst zu Hengst unterschiedlich waren.

### **2.3. Samengewinnung**

Die Samengewinnung erfolgte mittels einer künstlichen Scheide Modell „Avenches“ in Anwesenheit einer ovariectomierten Freibergerstute. Die Absamungen erfolgten in monatlichen Abständen am Phantom oder mit der Stute als Sprungpartner.

### **2.4. Samenverarbeitung**

Unmittelbar nach der Samengewinnung wurde die gelfreie Fraktion ins Wasserbad (37°C) gestellt und Volumen sowie Spermienkonzentration bestimmt. Nach der Dichtebestimmung (Spektrophotometer, Minitüb) erfolgte die Vorverdünnung mit V1 (s. Appendix) auf eine Konzentration von  $100 \times 10^6$  Spermien / ml, wobei das Verdünnungsverhältnis jeweils mindestens 1:1 betrug. Die Vorwärtsbeweglichkeit des vorverdünnten Samens wurde sowohl subjektiv (Phasenkontrastmikroskop), wie auch objektiv (Cell Motion Analyzer, CMA) bestimmt. Anschliessend folgte bei Raumtemperatur die für jeden Hengst individuelle Zentrifugation des Samens ( $10^3 \times g$ , 60-90 Sekunden, Hermle Zentrifuge ZK 380), und der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt. Die Endkonzentration des Samens von  $300 \times 10^6$  Spermien/ml wurde durch einen weiteren Verdünnungsschritt mit V2 (s. Appendix) bei Raumtemperatur durchgeführt. Während mindestens 20 Minuten wurde der so verdünnte Samen in einer Kühlvitrine auf einem Mischgerät (Rock'n Roller, Minitüb, Deutschland) auf +4°C gekühlt und danach in 0.5 ml Pailletten abgepackt (Konfektionierungsgerät: MRS1 Cassou, IMV, Frankreich). Die computergesteuerte Samengefrierung (Minidigitcool 700 ZB 290, IMV, Frankreich) erfolgte von +4°C bis -100°C mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 60°C/min und von -100°C bis -140°C mit einer Geschwindigkeit von 30°C/min. Die tiefgefrorenen Pailletten wurden in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.



**Abb. 1.** Samenverarbeitung von der Gewinnung bis zum Tiefgefrieren.

## **2.5. Untersuchungen im Frischsamen**

Zur Beurteilung der Qualität des Frischsamens wurden Volumen, Dichte und Motilität (subjektiv und objektiv) bestimmt und die Samenzellen morphologisch untersucht.

### **2.5.1. Volumen**

Das Volumen des gefilterten Ejakulates (Milchfilterschläuche für Rohrmelkanlagen aus Vliesstoff, 250 mm x 57 mm, Flawa, Flawil) wurde in einem graduierten Messzylinder bestimmt.

### **2.5.2. Dichte**

Die Spermienmenge pro Milliliter Ejakulat wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (Spermacue®, Minitüb, Deutschland) bestimmt.

### **2.5.3. Gesamtspermienzahl**

Die Gesamtspermienzahl stellt die absolute Anzahl Spermien im Ejakulat dar und ergibt sich aus dem Produkt von Volumen und Dichte.

### **2.5.4. Motilität**

Zur subjektiven Beurteilung der Motilität wurden 6 µl des vorverdünnten Ejakulates auf einen vorgewärmten (37°C) Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas (24 mm x 24 mm) versehen. Der prozentuale Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien wurde im Phasenkontrastmikroskop (Axiolab®, Zeiss) bei 200facher Vergrößerung geschätzt.

Die objektive Bestimmung der Motilität wurde mittels CMA (SM-CMA-1074, MTM, Switzerland; Software für Microsoft Windows 95 & NT 4.0 Version 2.0) durchgeführt. Der CMA erfasst die Samenzellen unter dem Phasenkontrastmikroskop

über eine Videokamera, digitalisiert die Bilder und legt sie im Sequenzspeicher ab. Am Computerbildschirm können die Bilder abgerufen, ausgewertet und ausgedruckt werden. Die Bildverarbeitungskarte des Meßsystems ist mit einem Sequenzspeicher ausgestattet, um eine Echtzeit-Bewegungsanalyse zu ermöglichen. Echtzeit-Analyse bedeutet, dass die von der Videokamera aufgenommenen Bilder in Echtzeit in den Sequenzspeicher abgelegt werden und später Bild für Bild vom Computer ausgewertet werden können. Je nach Bildschirmnorm (CCIR-Norm mit 50 Hz oder NTSC-Norm mit 60 Hz) erreichen 50 bzw. 60 Bilder in der Sekunde die Bildverarbeitungskarte. Die Digitalisierung erfolgt mit acht Bits, d.h. die Bilder liegen in 256 Helligkeitsstufen vor. Bei der Analyse werden die Bilder vom Sequenzspeicher einzeln in den Arbeitsbildspeicher übertragen und ausgewertet. Nach erfolgter Analyse werden die Bahnen der Samenzellen auf dem Überlagerungsbildspeicher (Overlayspeicher) mit dem Arbeitsbildspeicher dargestellt.

Für die Messung wurde ein Tropfen des vorverdünnten Ejakulats (Dichte:  $100 \times 10^6$  Spermien / ml) in eine spezielle Kammer (Mika Chamber, MTM AG, Switzerland) mit einer Tiefe von 0.01 mm gegeben und jeweils 10 Sequenzen sowie mindestens 500 Spermien ausgewertet. Für Hengstsamen wurden folgende standardisierte Einstellungen gewählt:

**Tab. 2.** Einstellungen des Cell Motion Analyzer für Hengstspermien.

ANALYSE-EINSTELLUNGEN	WERT	EINHEIT
Anzahl Bilder	32	
Minimale Fläche der Samenzellen	20	Pixel
Maximale Fläche der Samenzellen	299	Pixel
Geschwindigkeitsgrenze für unbewegliche Samenzellen	9	$\mu\text{m} / \text{s}$
Geschwindigkeitsgrenze für lokal bewegliche Samenzellen	15	$\mu\text{m} / \text{s}$

Mit dem CMA kann sowohl die Motilität (unbewegliche, ortsbewegliche und vorwärtsbewegliche Spermien) als auch die Geschwindigkeit (VSL, VAP, VCL) gemessen werden. In unserer Studie wurde nur die Vorwärtsbeweglichkeit (progressive Motilität) der Spermien berücksichtigt. Da die Bestimmung der Motilität im vorverdünnten Samen erfolgt, musste der Vorverdünner vorgängig zentrifugiert (2600 x g, während 30 Minuten) und gefiltert (glass fibre prefilters, Millipore) werden, damit Eigelb und/oder andere Verdünnerpartikel nicht fälschlicherweise als Spermien interpretiert werden (Kolossa et al., 1989; Jasko, 1992).

### **2.5.5. Morphologie**

Für die morphologische Spermienuntersuchung wurden 5 Tropfen Frischsamen in 2 ml Hancock-Lösung (s. Appendix) fixiert. Davon wurden einige Tropfen auf einen Objektträger pipettiert und anschliessend zum Trocknen senkrecht auf ein Löschblatt gestellt. Die getrockneten Ausstriche wurden unter fliessendem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Zur Beurteilung wurden die Ausstriche mit einem kleinen Tropfen Wasser versehen, ein Deckglas (24 mm x 24 mm) darübergelegt und mindestens 200 Spermien bei 1000facher Vergrösserung im Phasenkontrast (Olympus BX50, U Plan FI 100x/1.30) ausgezählt. Die Spermiendefekte wurden gemäss Klassifikationsschema des Andrologielabors (s. Appendix) protokolliert.

## **2.6. Untersuchungen im aufgetauten Samen**

### **2.6.1. Motilität**

Von jedem tiefgefrorenen Samen wurden drei Pailletten à 0.5 ml aufgetaut (37°C, 30 Sek.) und wie folgt untersucht:

Der Inhalt von je drei Pailletten wurde zusammengegeben und diente zur Bestimmung der Motilität mit dem CMA. Aufgrund der hohen Dichte musste der Samen verdünnt werden (ca. 1:2). Die Messungen wurden wie unter 2.5.4. durchgeführt.

### 2.6.2. Vitalität

Drei weitere Pailletten dienten zur Bestimmung der Vitalität (Fluoreszenzmikroskop) und zur Durchführung des Osmotischen Resistenztests (ORT). Die Vitalität (strukturelle Membranintegrität) wurde mittels DNA-Doppelfärbung bestimmt (LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, Molecular Probes Europe, Leiden NL). Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-14 zeigt eine hohe Affinität zur DNA lebender und toter Zellen, während Propidiumjodid (PI) nur die Zellmembran toter Zellen zu durchdringen vermag (Thomas et al., 1998).

SYBR-14 (Komponente A) wurde mit DMSO 100% in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt (Komponente AL). Propidiumjodid (Komponente B) wurde in der Form verwendet, wie sie von der Firma geliefert wird. 1 µl der Komponente AL wurde zu einer Samenmenge von 1 ml gegeben. Nach Inkubation von 15 Minuten bei 37°C wurden 5 µl der Komponente B dazugegeben. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation wurden zweimal 5 µl des gefärbten Samens auf einen Objektträger pipettiert, mit Deckgläser (24 mm x 24 mm) versehen und bei 400facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Olympus BX50, U Plan Apo 40 x / 0.85 mit Fluoreszenzeinrichtung; Filtermodul FITC, Hochdruck-Halogenlampe) auf dem nicht vorgewärmten Heiztisch betrachtet. Über eine am Mikroskop angeschlossene Videokamera (Colour CCD Camera, SANYO VCC-2972) konnten die emittierten Fluoreszenzen auf einen Monitor (SONY Trinitron Colour Video Monitor, PVM-1440 QM) projiziert werden. Bei einer Exzitation durch Wellenlängen von 488 nm liegen die maximalen Fluoreszenzemissionen für Komponente A (grün) und B (orange) bei Wellenlängen von 516 nm bzw. 617 nm. Mit SYBR-14 angefärbte Spermien fluoreszieren grün, während tote, PI positive Zellen orange erscheinen.

Durch Verschieben des Objektträgers wurden verschiedene Bildsequenzen auf eine Videokassette aufgezeichnet. Mit abwischbaren Boardmarkern wurden pro Samenprobe 500 Spermien auf dem Monitor rot und grün markiert. Der prozentuale Anteil an grün fluoreszierenden Spermien wurde der Vitalität gleichgesetzt (Garner et al., 1994; Garner und Johnson, 1995).

### **2.6.3. Osmotischer Resistenztest (ORT)**

Dieser Test dient zur Überprüfung der funktionellen Membranintegrität (Revell and Mrode, 1994). Intakte Zellmembranen erlauben den Austausch von Ionen und Flüssigkeit zwischen intra- und extrazellulärem Raum. Werden Samenzellen in ein hypotones Medium gegeben, schwellen sie aufgrund eines Flüssigkeitseinstromes zur Erhaltung des osmotischen Gleichgewichtes an, vorausgesetzt die Membran ist intakt (Jeyendran et al., 1984). Die Schwellung des Spermiums ist vor allem am Aufrollen des Schwanzes ersichtlich. 1 ml ORT-Lösung (s. Appendix) wird auf 37°C vorgewärmt, 100 µl Samen dazugegeben und bei 37°C während 30 Minuten inkubiert (Caiza de la Cueva et al., 1997). Zwei Tropfen zu je 5µl werden auf einen Objektträger gegeben, mit Deckgläser (24 mm x 24 mm) versehen und bei 400facher Vergrößerung untersucht.

Pro Tropfen werden jeweils 200 Spermien ausgezählt. Aufgrund von Formveränderung des Spermischwanzes wurde der prozentuale Anteil geschwollener und zugleich beweglicher Spermien (ORT-aktiv) bestimmt (Revell und Mrode, 1994).

## 2.7. Statistik

Die Datenerfassung wurde auf einem Power Macintosh (FileMaker Pro 4.1, FileMaker Inc.) vorgenommen und die statistische Auswertung mit dem Programm StatView 5.0 (SAS Institute) durchgeführt. Die graphische Darstellung der verschiedenen Samenqualitätsparameter erfolgte mit Boxplots. Der Einfluss des Zeitpunktes (Jahreszeit) der Samengewinnung und des Hengstes wurde mittels multivariater Varianzanalyse (whole-model-test) geprüft. Zur Berechnung saisonaler Schwankungen wurden die Ergebnisse dem Fisher's PLSD post-hoc Test unterzogen. Als Frühling wurden die Monate März, April und Mai definiert, als Sommer die Monate Juni, Juli und August, als Herbst die Monate September, Oktober, November und als Winter die Monate Dezember, Januar und Februar. Abschliessend wurden die verschiedenen Samenqualitätsparameter auch einer Korrelationsanalyse unterzogen. Die Signifikanzschwelle wurde auf 0.05 festgelegt.

### **3. ERGEBNISSE**

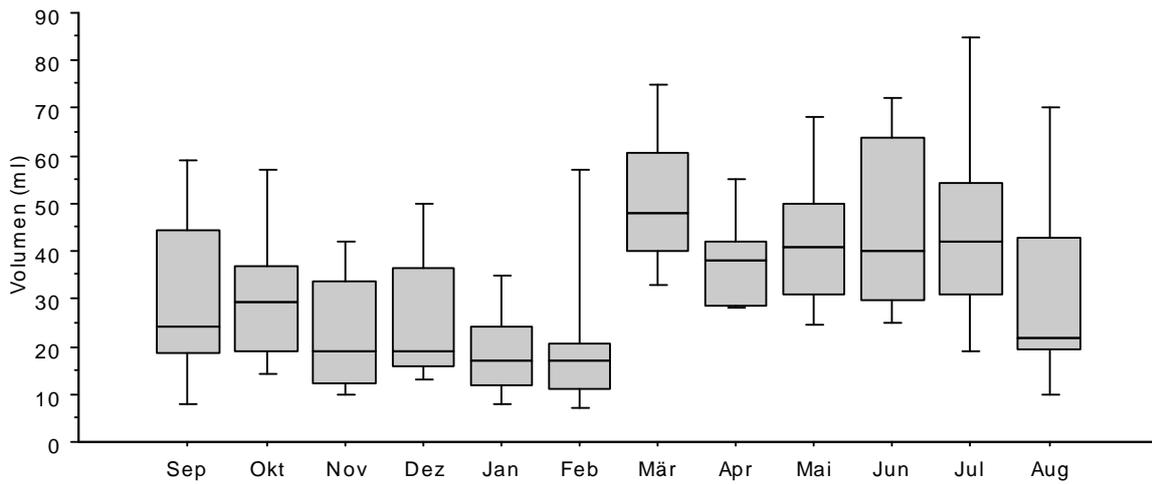
#### **3.1. Samenqualität im Frischsamen**

##### **3.1.1. Jahreszeitliche Schwankungen**

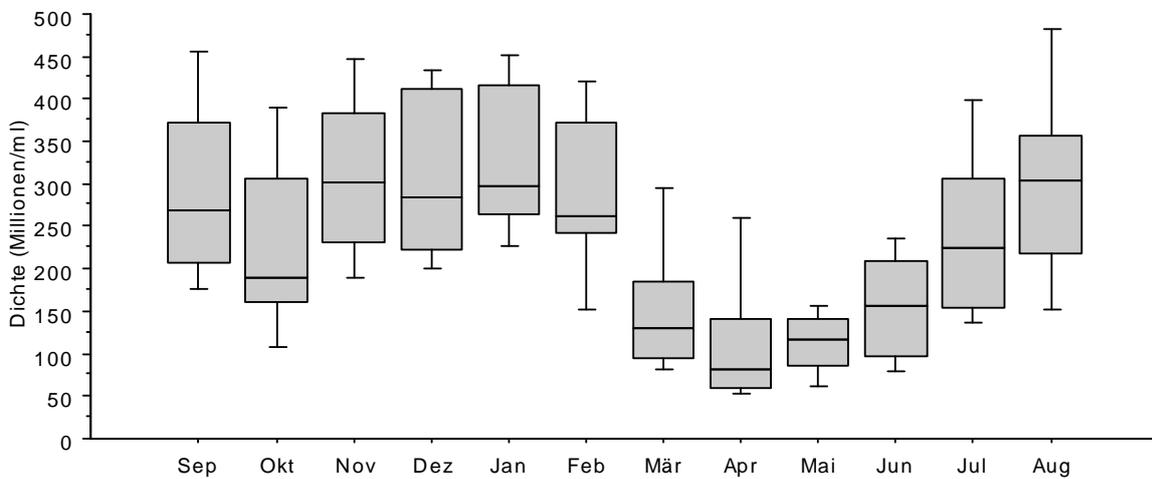
Die während eines Jahres monatlich bestimmten Qualitätsparameter im Frischsamen von 15 Freiburgerhengsten sind in Form von Boxplots in den Abbildungen 2-10 dargestellt.

Die Medianwerte des Ejakulatvolumens schwankten zwischen 17 ml und 48 ml (Abb. 2), die der Spermiedichte zwischen  $82 \times 10^6$  und  $305 \times 10^6$  Spermien pro ml Ejakulat (Abb. 3) und die der Gesamtspermienzahl zwischen  $3.1 \times 10^9$  und  $9.4 \times 10^9$  Spermien pro Ejakulat (Abb. 4). Eine gegenläufige Abhängigkeit zwischen Ejakulatsvolumen und Spermiedichte war in den Monaten März bis Juli deutlich zu erkennen.

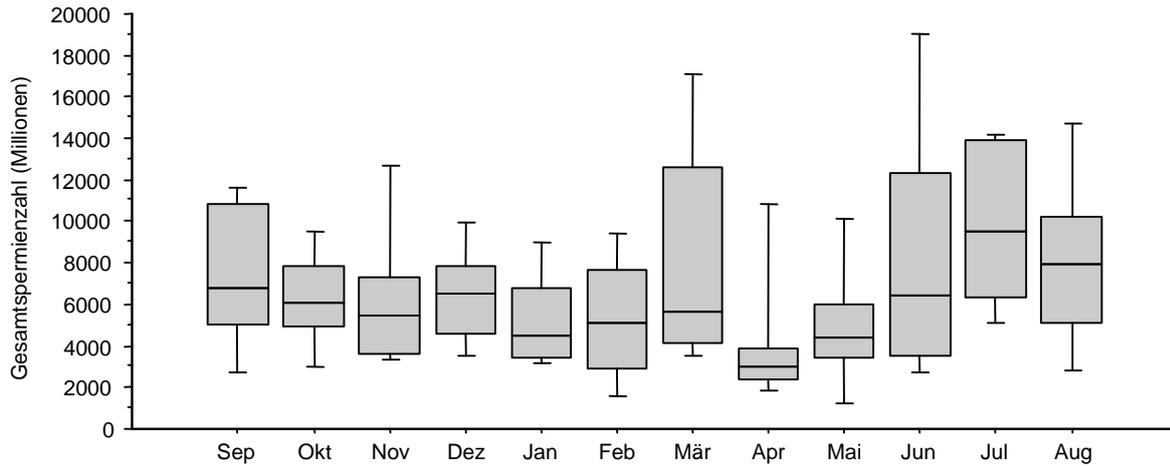
Die Medianwerte der Motilität variierten zwischen 56 % und 82 %, die der morphologisch normalen Spermien zwischen 3.2 % und 29.7 % und die der Hauptdefekte zwischen 55.6 % und 90.6 %. Beim prozentualen Anteil von Akrosomdefekten schwankten die Medianwerte stets unterhalb von 10 % und bei den Kernvakuolen zwischen 14.4 % und 42.6 %. Mittels multivariater Varianzanalyse konnten bei allen Parametern jahreszeitlich signifikante ( $P < 0.05$ ) Unterschiede beobachtet werden (Tab. 3).



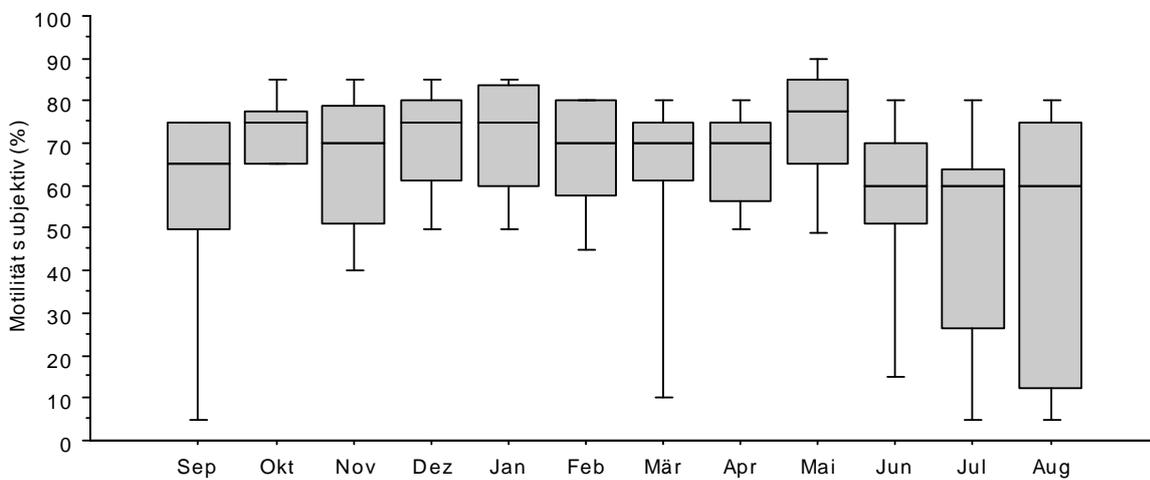
**Abb. 2.** Boxplot-Darstellung des Ejakulatvolumens bei 15 Freiburgerhengsten während eines Jahres.



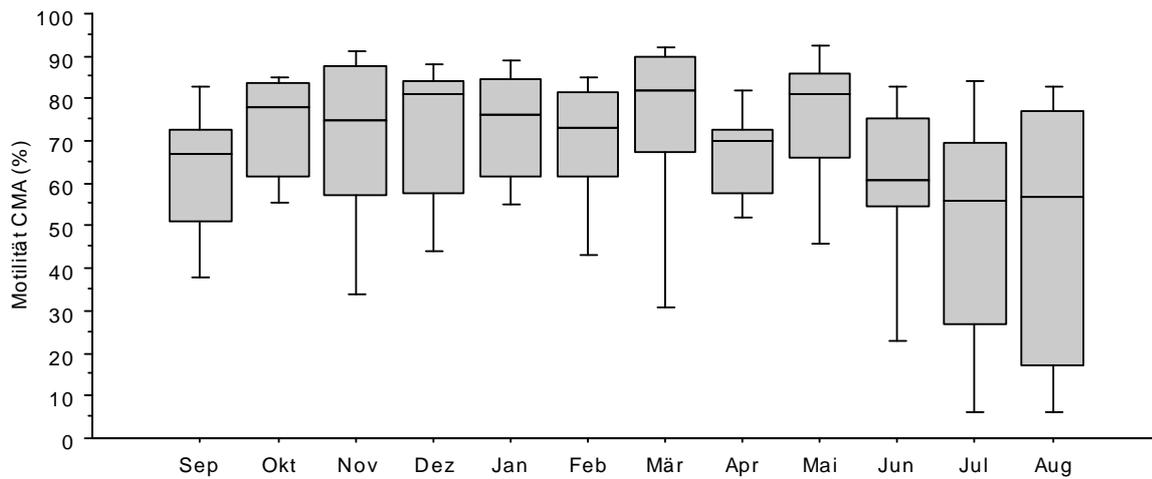
**Abb. 3.** Boxplot-Darstellung der Spermiedichte bei 15 Freiburgerhengsten während eines Jahres.



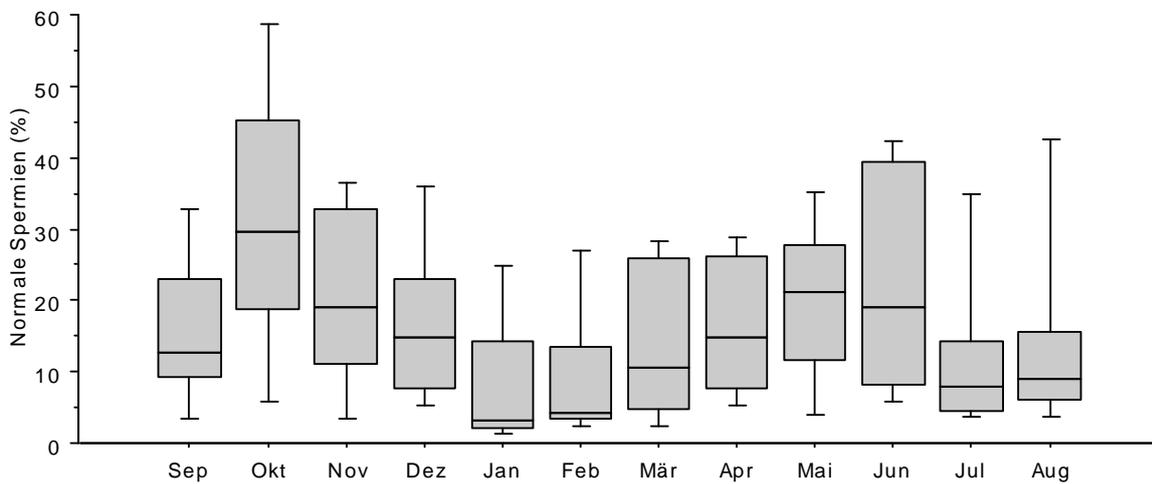
**Abb. 4.** Boxplot-Darstellung der Gesamtpermienzahl bei 15 Freibergherhengsten während eines Jahres.



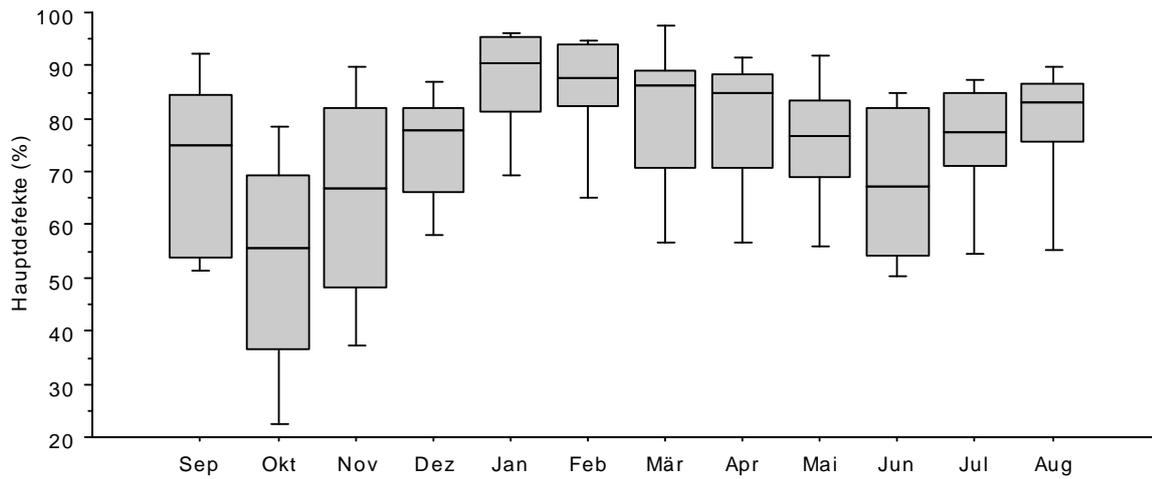
**Abb. 5.** Boxplot-Darstellung der progressiven Motilität (subjektiv) bei 15 Freibergherhengsten während eines Jahres.



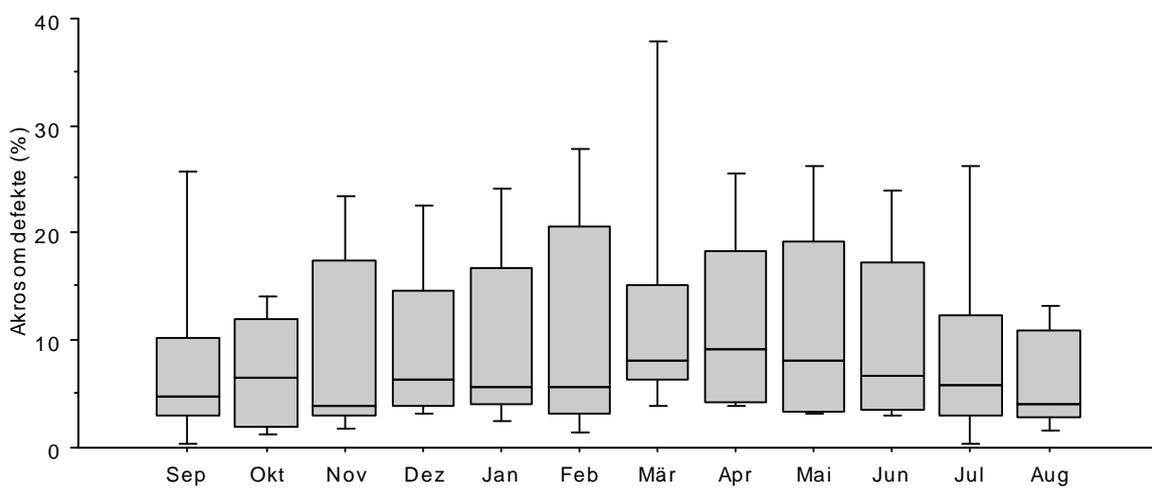
**Abb. 6.** Boxplot-Darstellung der progressiven Motilität (CMA) bei 15 Freibergerhengsten während eines Jahres.



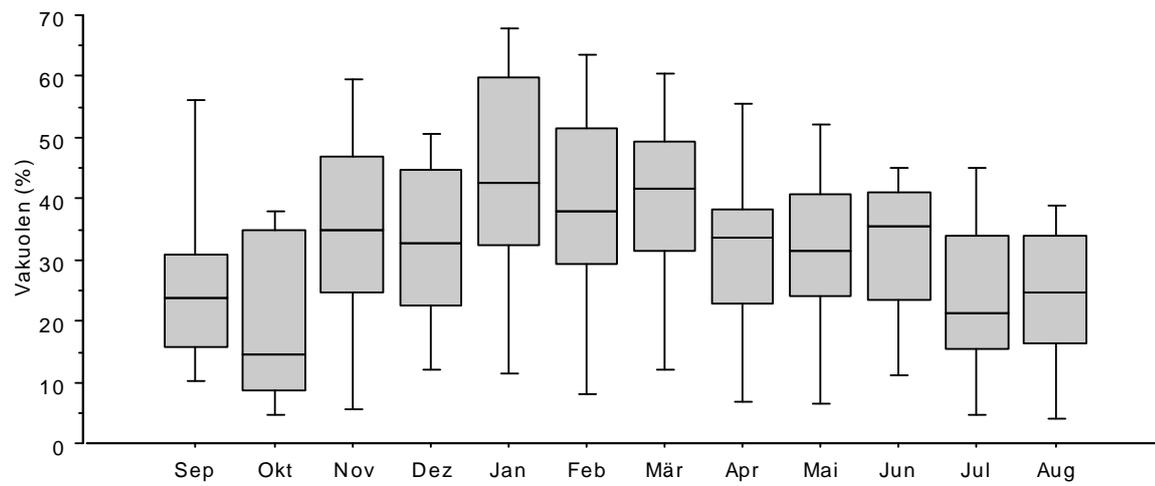
**Abb. 7.** Boxplot-Darstellung der morphologisch normalen Spermien bei 15 Freibergerhengsten während eines Jahres.



**Abb. 8.** Boxplot-Darstellung der Hauptdefekte bei 15 Freibergerhengsten während eines Jahres.



**Abb. 9.** Boxplot-Darstellung der Akrosomdefekte bei 15 Freibergerhengsten während eines Jahres.

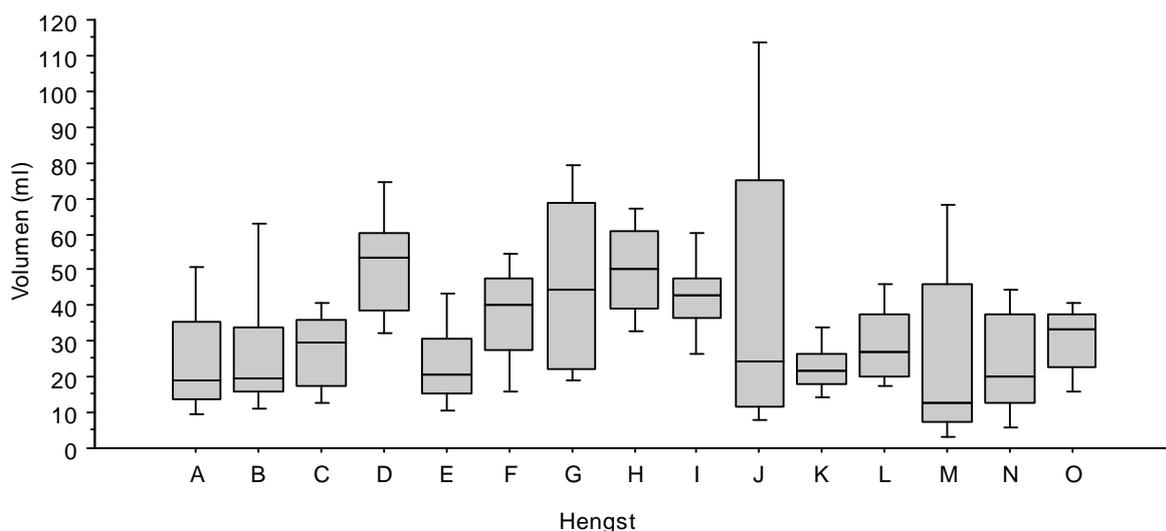


**Abb. 10.** Boxplot-Darstellung der Kernvakuolen bei 15 Freiburgerhengsten während eines Jahres.

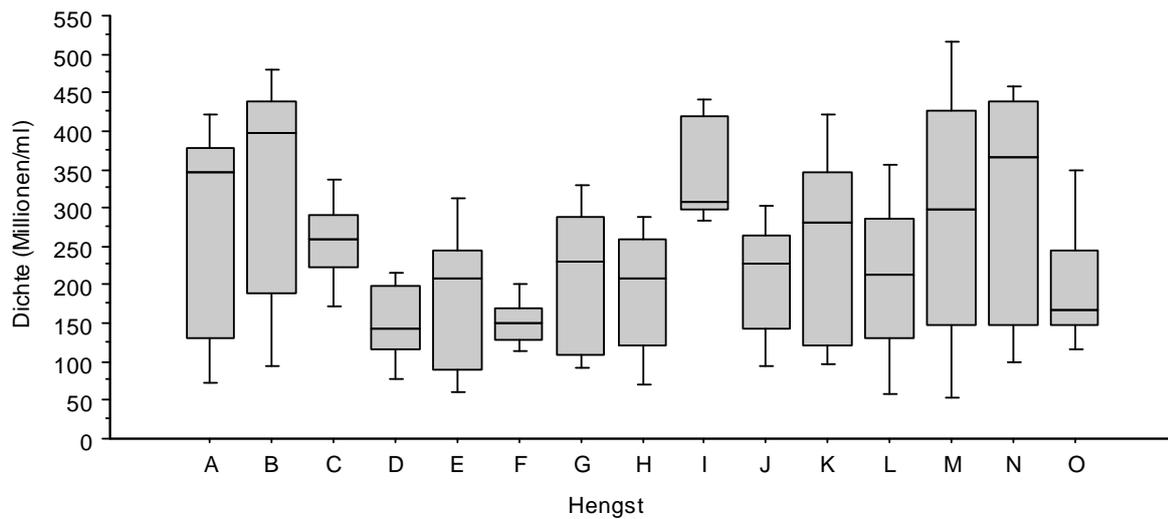
### 3.1.2. Individuelle Schwankungen

Die bei einzelnen Hengsten während eines Jahres im Frischsamen erhobenen Qualitätsparameter sind in den Abbildungen 11-19 als Boxplots graphisch dargestellt. Aus diesen Abbildungen geht hervor, dass zwischen einzelnen Hengsten deutliche individuelle Unterschiede bestehen.

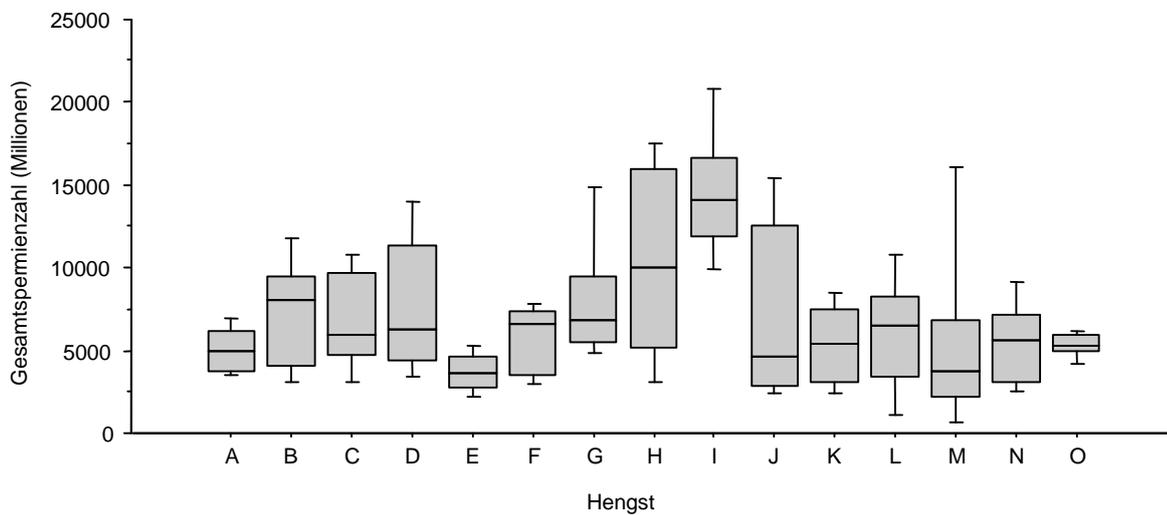
Die Medianwerte des Ejakulatvolumens einzelner Hengste schwankten zwischen 12.5 und 53.5 ml (Abb. 11), diejenigen der Spermiedichte zwischen  $142 \times 10^6$  und  $397.5 \times 10^6$  Spermien pro ml Ejakulat (Abb. 12), die der Gesamtspermienzahl zwischen  $3.7 \times 10^9$  und  $13.2 \times 10^9$  Spermien (Abb. 13), die der subjektiven und objektiven (CMA) Motilität zwischen 26 % und 84 % (Abb. 14, 15), die des Anteils morphologisch normaler Spermien zwischen 3.3 % und 36.4 % (Abb. 16) und die des Anteils an Hauptdefekten zwischen 44.1 % und 91.9 % (Abb. 17). Die Medianwerte der Akrosomdefekte (Abb. 18) und der Kernvakuolen (Abb. 19) schwankten zwischen 2.8 % und 32.4 % bzw. 4.2 % und 62.5 %.



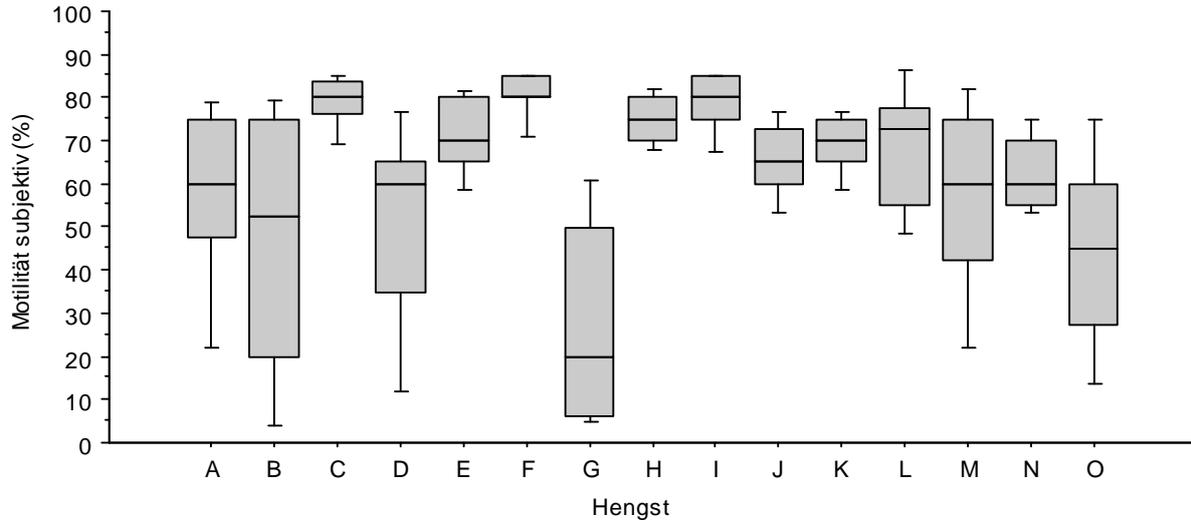
**Abb. 11.** Boxplot-Darstellung des Ejakulatvolumens bei 15 verschiedenen Freiburgerhengsten während eines Jahres (n=12).



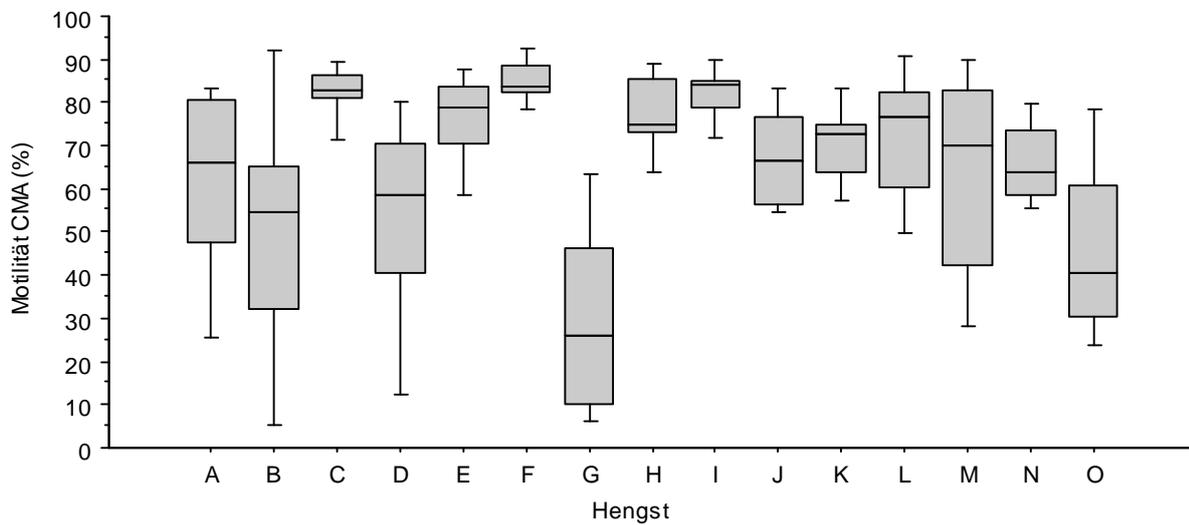
**Abb. 12.** Boxplot-Darstellung der Spermiedichte bei 15 verschiedenen Freibergerhengsten während eines Jahres (n=12).



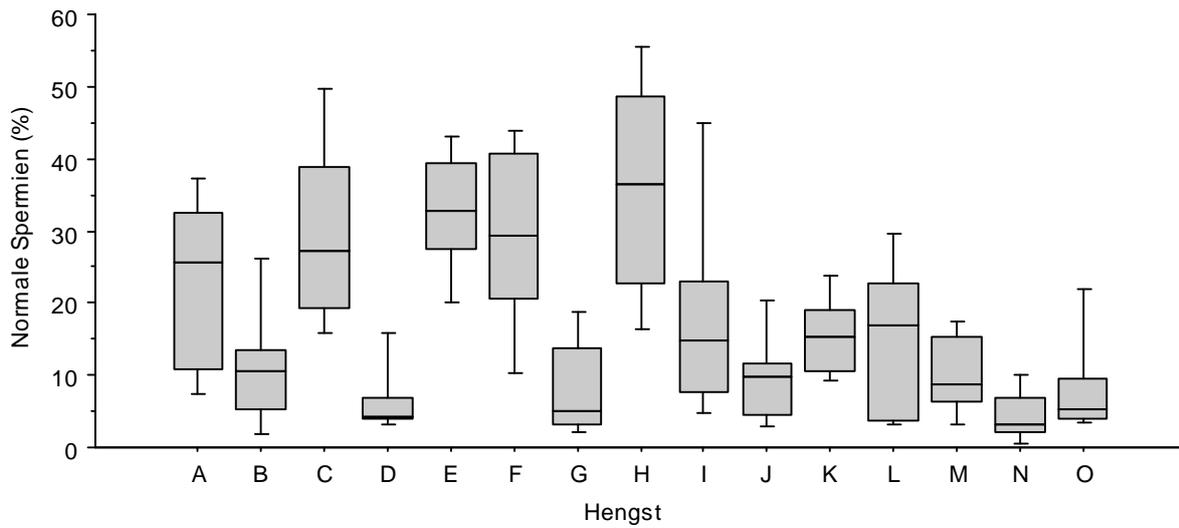
**Abb. 13.** Boxplot-Darstellung der Gesamtpermienzahl bei 15 verschiedenen Freibergerhengsten während eines Jahres (n=12).



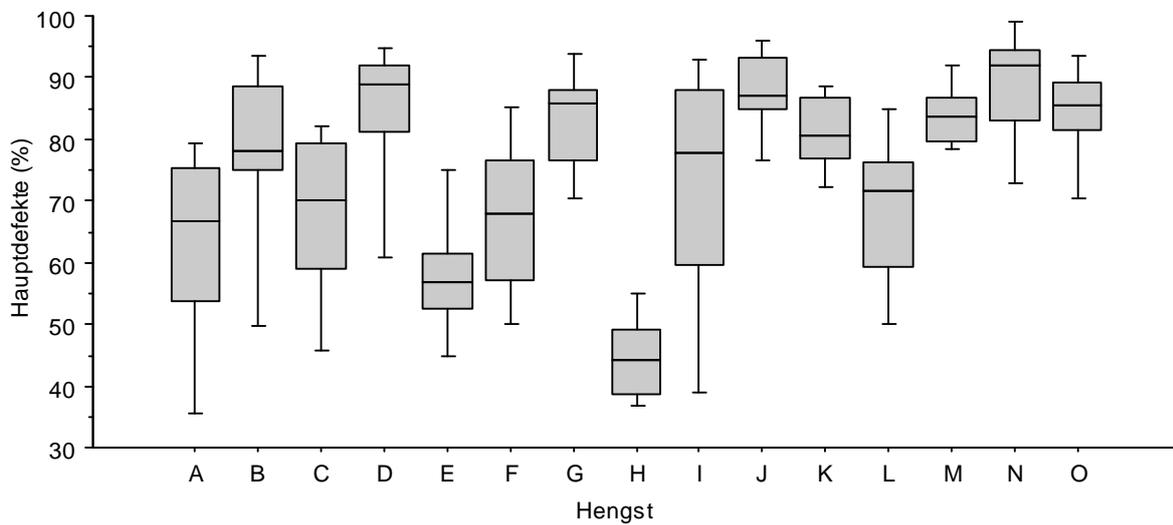
**Abb. 14.** Boxplot-Darstellung der progressiven Motilität (subjektiv) bei 15 verschiedenen Freibergerhengsten während eines Jahres (n=12).



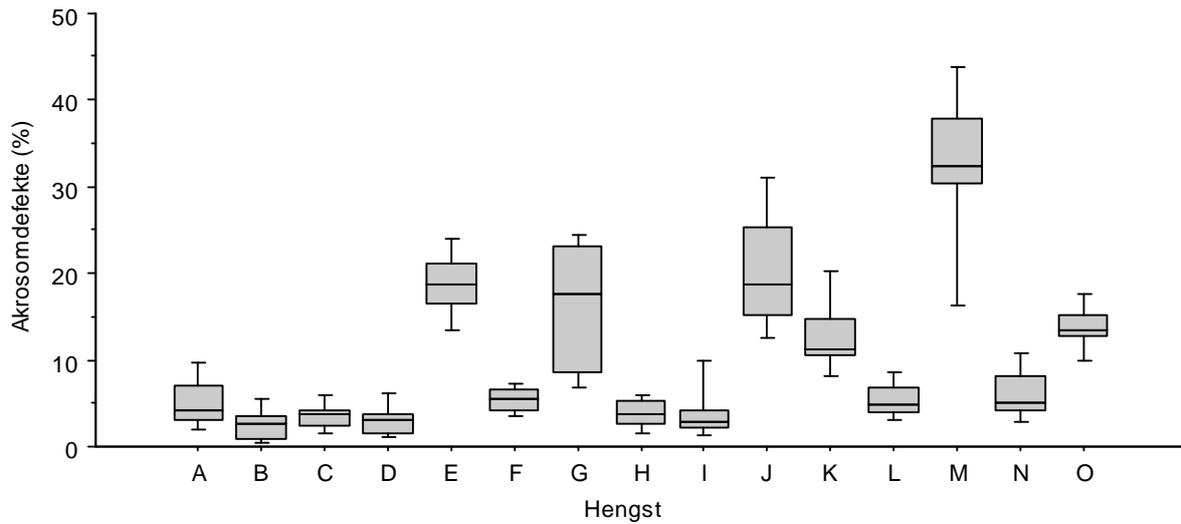
**Abb. 15.** Boxplot-Darstellung der progressiven Motilität (CMA) bei 15 verschiedenen Freibergerhengsten während eines Jahres (n=12).



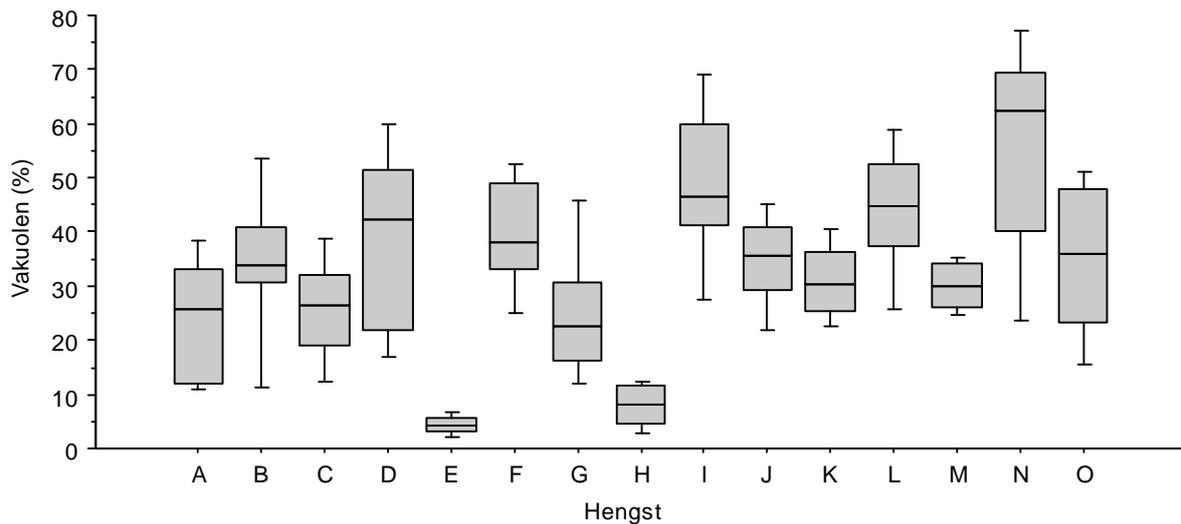
**Abb. 16.** Boxplot-Darstellung der morphologisch normalen Spermien bei 15 verschiedenen Freibergerhengsten während eines Jahres (n=12).



**Abb. 17.** Boxplot-Darstellung der Hauptdefekte bei 15 verschiedenen Freibergerhengsten während eines Jahres (n=12).



**Abb. 18.** Boxplot-Darstellung der Akrosomdefekte bei 15 verschiedenen Freibergerhengsten während eines Jahres (n=12).



**Abb. 19.** Boxplot-Darstellung der Kernvakuolen bei 15 verschiedenen Freibergerhengsten während eines Jahres (n=12).

### 3.1.3. Einfluss von Hengst und Zeitpunkt der Samengewinnung

Die Resultate (P-Werte) der multivariaten Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses von Hengst (P-Hengst) und Zeitpunkt der Samengewinnung (P-Zeitpunkt) auf die einzelnen Samenqualitätsparameter im Frischsamen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Daraus ist ersichtlich, dass sowohl der einzelne Hengst als auch die verschiedenen Monate einen hochsignifikanten Einfluss auf alle Parameter im Frischsamen ausüben.

**Tab. 3.** Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse (P-Werten) für die beiden Einflussfaktoren Hengst und Zeitpunkt der Samengewinnung auf die Qualität des Frischsamens bei 15 Freiberghengsten während eines Jahres.

<b>Parameter</b>	<b>P-Hengst</b>	<b>P-Zeitpunkt</b>
<b>Volumen</b>	< 0.0001	< 0.0001
<b>Dichte</b>	< 0.0001	< 0.0001
<b>Gesamtpermienzahl</b>	< 0.0001	0.0003
<b>Motilität</b>	< 0.0001	< 0.0001
<b>Normale Spermien</b>	< 0.0001	< 0.0001
<b>Hauptdefekte</b>	< 0.0001	< 0.0001
<b>Akrosomdefekte</b>	< 0.0001	0.0002
<b>Kernvakuolen</b>	< 0.0001	< 0.0001

### 3.1.4. Saisonale Unterschiede

Die saisonalen Unterschiede der einzelnen Samenqualitätsparameter zwischen Herbst, Winter, Frühling und Sommer sind als Mittelwertsvergleiche in Tabelle 4 angegeben. Die Mittelwerte für das Volumen waren im Frühling und Sommer signifikant ( $P < 0.05$ ) höher als im Herbst und Winter und die Dichte im Frühling signifikant ( $P < 0.05$ ) niedriger als in den übrigen Jahreszeiten. Im Sommer wurden signifikant ( $P < 0.05$ ) höhere Gesamtspermienzahlen und eine signifikant ( $P < 0.05$ ) geringere Motilität als im Herbst, Winter und Frühling gemessen.

Bei den morphologischen Untersuchungen konnten im Herbst signifikant ( $P < 0.05$ ) mehr normale Spermien als im Winter und Sommer sowie signifikant weniger ( $P < 0.05$ ) Hauptdefekte als in den übrigen Jahreszeiten beobachtet werden. Im Herbst traten signifikant ( $P < 0.05$ ) weniger Akrosomdefekte als im Frühling und signifikant ( $P < 0.05$ ) weniger Kernvakuolen als im Winter auf.

**Tab. 4.** Mittelwerte ( $m \pm$  Standardfehler) der Samenqualitätsparameter im Frischsamen bei 15 Freibergerhengsten im Herbst, Winter, Frühling und Sommer.

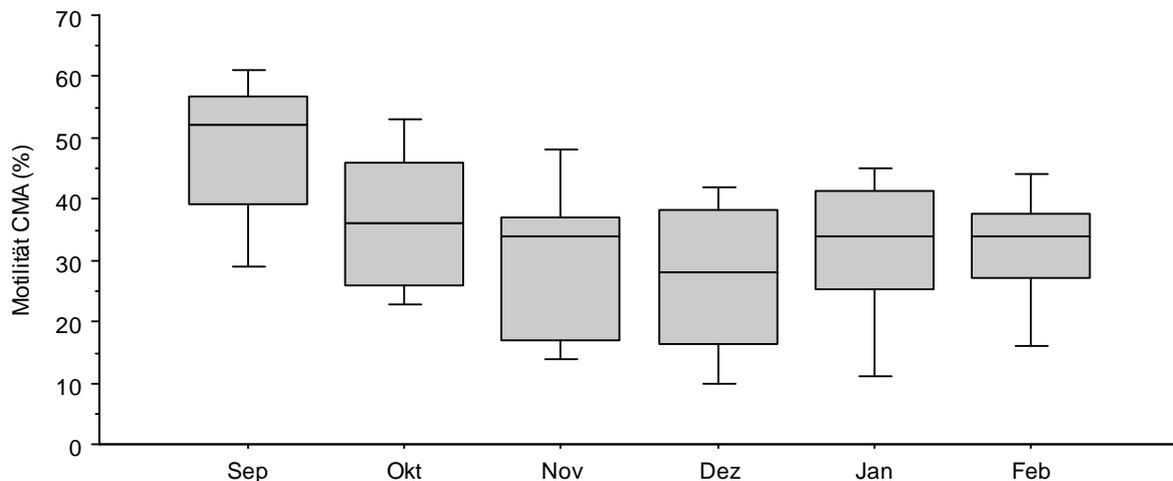
PARAMETER	Herbst ( $m \pm$ SEM)	Winter ( $m \pm$ SEM)	Frühling ( $m \pm$ SEM)	Sommer ( $m \pm$ SEM)
<b>Volumen (ml)</b>	28.6 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	21.4 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	45.5 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>	41.2 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>
<b>Dichte (Millionen/ml)</b>	275.1 $\pm$ 12.6 <sup>ac</sup>	305.7 $\pm$ 12.6 <sup>a</sup>	127.2 $\pm$ 12.7 <sup>b</sup>	237.8 $\pm$ 12.6 <sup>c</sup>
<b>Gesamtspermienzahl (<math>\times 10^9</math>)</b>	6.9 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	6.0 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	5.9 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	8.9 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
<b>Motilität CMA (%)</b>	66.6 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	70.7 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	71.5 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	52.5 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>
<b>Normale Spermien (%)</b>	23.2 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	11.6 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	17.9 $\pm$ 1.4 <sup>ac</sup>	17.0 $\pm$ 1.4 <sup>bc</sup>
<b>Hauptdefekte (%)</b>	62.7 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	81.4 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	77.9 $\pm$ 1.6 <sup>bc</sup>	73.4 $\pm$ 1.6 <sup>c</sup>
<b>Akrosomdefekte (%)</b>	8.4 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	11.2 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>	12.5 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	9.2 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>
<b>Kernvakuolen (%)</b>	26.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	38.5 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	34.2 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	28.3 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>

<sup>abc</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Indizes sind signifikant verschieden ( $P < 0.05$ )

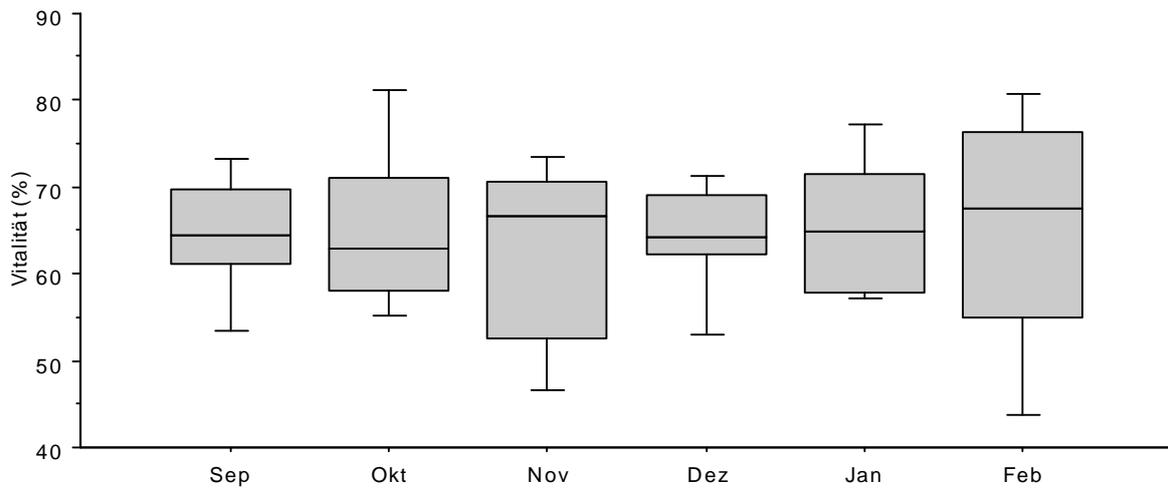
## 3.2. Samenqualität im aufgetauten Samen

### 3.2.1. Schwankungen im Winterhalbjahr

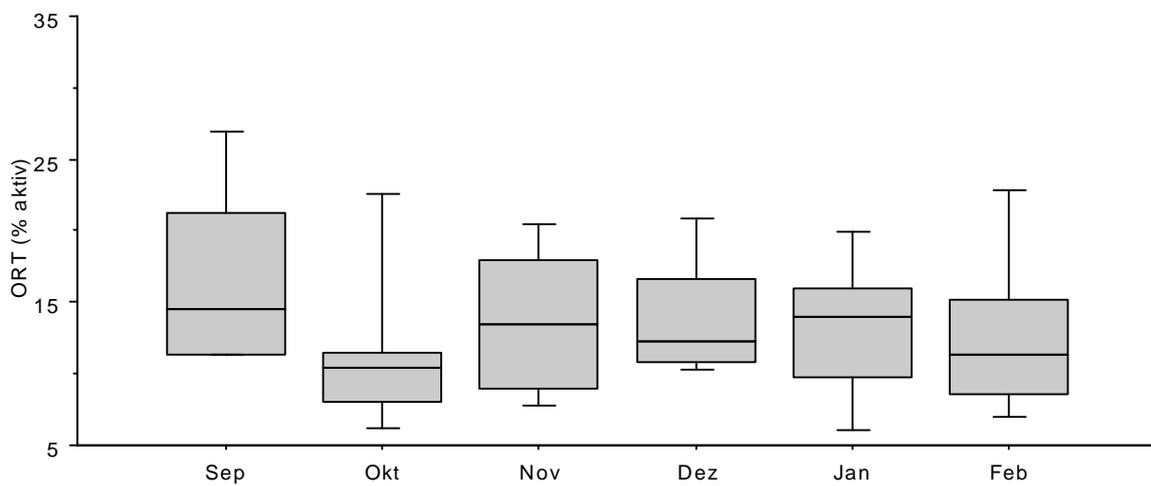
Die Ergebnisse der Samenqualitätsparameter im aufgetauten Samen während der Monate September bis Februar sind in Form von Boxplots in den Abbildungen 20 bis 22 dargestellt. Die Medianwerte für die Motilität im aufgetauten Tiefgefriersamen schwankten zwischen 28 % und 52 % (Abb. 20), die für die Vitalität zwischen 63 % und 67.5 % (Abb. 21) und beim ORT zwischen 10.4 % und 14.5 % (Abb. 22).



**Abb. 20.** Boxplot-Darstellung der Motilität (CMA) im aufgetauten Samen bei 15 Freiberggerhengsten im Winterhalbjahr.



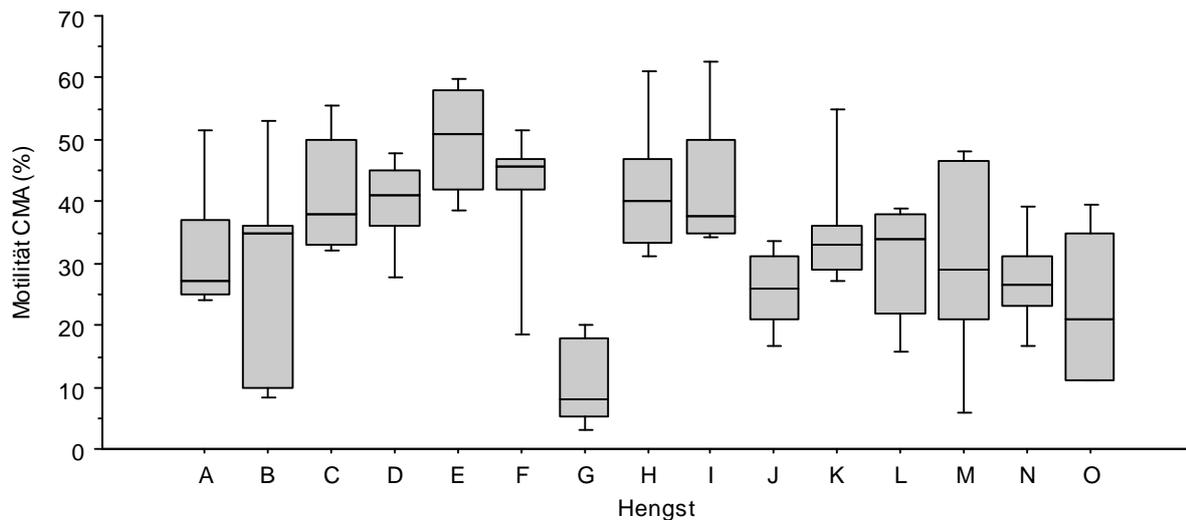
**Abb. 21.** Boxplot-Darstellung der Vitalität im aufgetauten Samen bei 15 Freibergerhengsten im Winterhalbjahr.



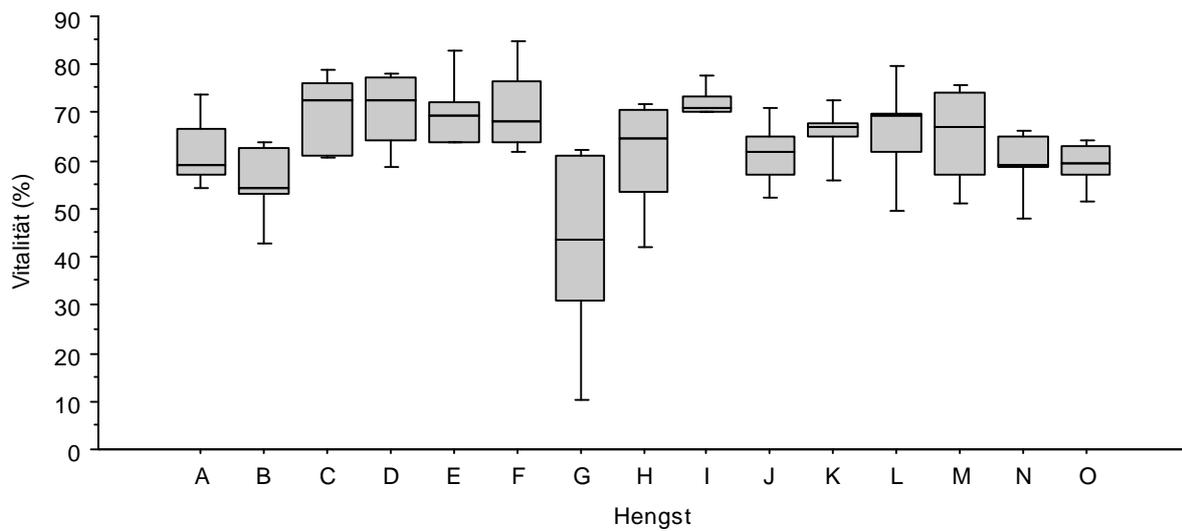
**Abb. 22.** Boxplot-Darstellung der ORT-aktiven Spermien im aufgetauten Samen bei 15 Freibergerhengsten im Winterhalbjahr.

### 3.2.2. Individuelle Schwankungen

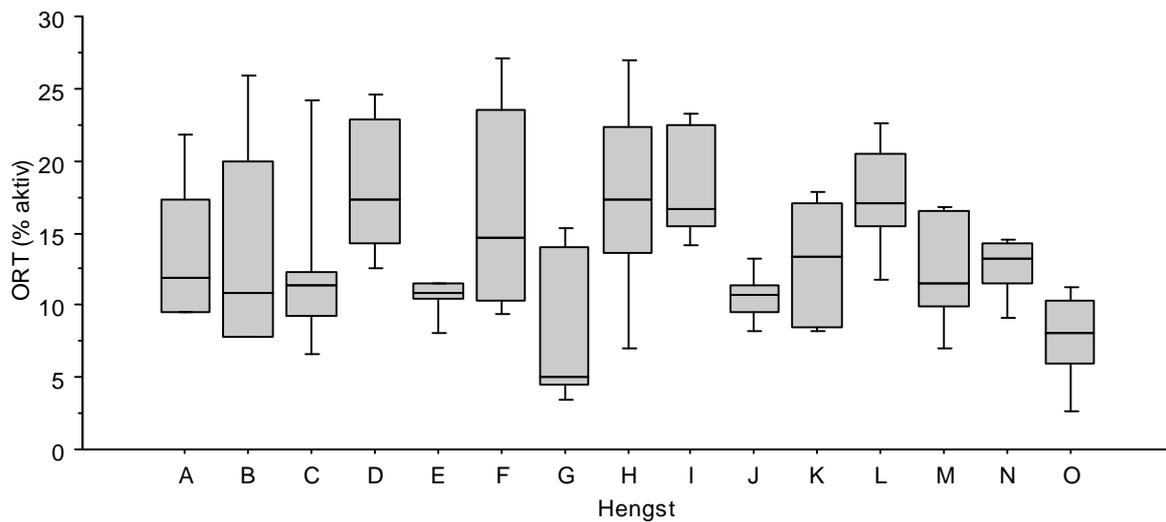
Die erhobenen Samenqualitätsparameter im aufgetauten Samen der einzelnen Hengste während des Winterhalbjahres sind in den Abbildungen 23 bis 25 als Boxplots graphisch dargestellt. Die Medianwerte für die Motilität schwankten zwischen 8 % und 51 % (Abb. 23), für die Vitalität zwischen 43.7 % und 72.5 % (Abb. 24) und für den ORT zwischen 5 % und 17.3 % (Abb. 25).



**Abb. 23.** Boxplot-Darstellung der Motilität im aufgetauten Samen bei 15 verschiedenen Freibergerhengsten während des Winterhalbjahres (n=6).



**Abb. 24.** Boxplot-Darstellung der Vitalität im aufgetauten Samen bei 15 verschiedenen Freiberghengsten während des Winterhalbjahres (n=6).



**Abb. 25.** Boxplot-Darstellung der ORT-aktiven Spermien im aufgetauten Samen bei 15 verschiedenen Freiberghengsten während des Winterhalbjahres (n=6).

### 3.2.3. Einfluss von Hengst und Zeitpunkt der Samengewinnung

Der Einfluss des Zeitpunktes der Samengewinnung (P-Zeitpunkt) und des Hengstes (P-Hengst) auf die Samenqualitätsparameter im aufgetauten Samen ist in Tabelle 5. zusammengefasst. Daraus geht hervor, dass der Zeitpunkt der Samengewinnung nur auf die Motilität einen signifikanten ( $P < 0.05$ ) Einfluss hatte, nicht aber auf die Vitalität und den ORT. Hingegen war der Einfluss des Hengstes auf alle drei Qualitätsparameter überall signifikant ( $P < 0.05$ ).

**Tab. 5.** Ergebnisse (P-Werte) der multivariaten Varianzanalyse für die beiden Einflussfaktoren Hengst und Zeitpunkt der Samengewinnung auf die Qualität des aufgetauten Samens bei 15 Freiberghengsten während eines Jahres.

<b>PARAMETER</b>	<b>P-Hengst</b>	<b>P-Zeitpunkt</b>
<b>Motilität CMA</b>	< 0.0001	< 0.0001
<b>Vitalität</b>	< 0.0001	0.8042
<b>ORT-aktiv</b>	0.0015	0.2184

### 3.2.4. Unterschiede zwischen Herbst und Winter

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der untersuchten Parameter im aufgetauten Samen vom Herbst und Winter dargestellt. Ein signifikanter ( $P < 0.05$ ) Unterschied zwischen Herbst und Winter bestand nur bei der progressiven Motilität.

**Tab. 6.** Mittelwerte ( $m \pm$  Standardfehler) der Qualitätsparameter im aufgetauten Samen von Herbst und Winter bei 15 Freibergerhengsten.

<b>PARAMETER</b>	<b>Herbst</b> ( $m \pm$ SEM)	<b>Winter</b> ( $m \pm$ SEM)
<b>Motilität (%)</b>	$37.7 \pm 1.6^a$	$30.2 \pm 1.6^b$
<b>Vitalität (%)</b>	$62.8 \pm 1.4^a$	$64.7 \pm 1.4^a$
<b>ORT (% aktiv)</b>	$14.2 \pm 0.8^a$	$13.2 \pm 0.7^a$

<sup>ab</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Indizes sind signifikant verschieden ( $P < 0.05$ )

### 3.3. Korrelationen zwischen den verschiedenen Samenqualitätsparametern

In Tabelle 7 sind die Korrelationen zwischen den verschiedenen Samenqualitätsparametern angegeben. Hohe gegenseitige Abhängigkeiten bestehen zwischen der subjektiven und objektiven Motilität ( $r = 0.94$ ), der Motilität im Frisch- und aufgetauten Samen ( $r = 0.56$ ), der Vitalität und Motilität im Frisch- ( $r = 0.63$ ) bzw. aufgetauten Samen ( $r = 0.60$ ) sowie zwischen Volumen und Gesamtspermienzahl ( $r = 0.63$ ). Eine geringe Korrelation ( $r = 0.40$ ) konnte zwischen ORT-aktiven Spermien und der Vitalität gefunden werden.

**Tab. 7.** Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) zwischen verschiedenen Samenqualitätsparametern.

	Volumen	Dichte	Gesamt-spermien-zahl	Motilität subjektiv	Motilität CMA	Normale Spermien	Haupt-defekte	Akrosom-defekte	Vakuolen	Motilität im aufgetauten Samen	Vitalität
Dichte	-.46	1.00									
Gesamt-spermien-zahl	.63	.27	1.00								
Motilität subjektiv	-.08	-.15	-.15	1.00							
Motilität CMA	-.03	-.16	-.10	.94	1.00						
Normale Spermien	.02	-.22	-.06	.46	.45	1.00					
Haupt-defekte	-.08	.08	-.12	-.29	-.28	-.86	1.00				
Akrosom-defekte	-.01	-.09	-.19	-.01	-.01	-.20	.30	1.00			
Vakuolen	-.06	.08	-.02	.03	0.37	-.57	.65	-.14	1.00		
Motilität im aufgetauten Samen	.20	-.18	-.18	.50	.56	.43	-.32	-.16	-.25	1.00	
Vitalität	-.04	-.13	-.06	.62	.63	.26	-.09	-.02	.00	.60	1.00
ORT	.33	-.12	.24	.21	.23	.06	-.11	-.32	.09	.41	.40

## 4. DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die Qualitätsparameter im Frischsamen und im aufgetauten Samen beim Freiburgerhengst während eines Jahres deutliche Schwankungen aufweisen. Werden die einzelnen monatlich erhobenen Daten zu je dreimonatigen Zeitabschnitten (Herbst, Winter, Frühling, Sommer) zusammengefasst, können signifikante saisonale Unterschiede ( $P < 0.05$ ) bei allen untersuchten Parametern im Frischsamen festgestellt werden.

Die Gesamtspermienzahl ist ein wichtiger Parameter bei der Samenproduktion für die künstliche Besamung sowie zur Beurteilung der Zuchttauglichkeit (Hurtgen, 1992). Die höchsten Gesamtspermienzahlen wurden bei unseren Hengsten im Sommer beobachtet, was mit den Ergebnissen von Pickett et al. (1976) und Jasko et al. (1991) übereinstimmt, welche höchste Werte im Juli und August fanden. Hingegen konnten Magistrini et al. (1987) in ihren Untersuchungen kein deutliches saisonales Muster der Gesamtspermienzahl feststellen.

Im Bezug auf die Samendichte waren die Werte im Winter signifikant höher als im Frühling und Sommer. Diese Befunde weichen von früheren Untersuchungsergebnissen ab, wo höchste Werte im August und tiefste im Dezember (Pickett et al., 1976; Jasko et al., 1991) bzw. im Herbst und Sommer (Magistrini et al., 1987) gefunden wurden.

Das gelfreie Volumen verhielt sich, wie bereits früher beobachtet (Pickett et al., 1976; Magistrini et al., 1987) umgekehrt proportional zur Dichte. Im Frühling und Sommer wurden signifikant höhere Ejakulatmengen gemessen als im Herbst und Winter. Analog zu unseren Untersuchungen fanden auch Magistrini et al. (1987) Höchstwerte im Frühling während Pickett et al. (1976) und Jasko et al. (1991) höchste Volumina im July bzw. März und tiefste im August bzw. Dezember beobachteten.

Die teilweise voneinander abweichenden Resultate der Arbeiten von Pickett et al. (1976), Jasko et al. (1991) und Magistrini et al. (1987) könnten auf Unterschiede der geographischen Lage und der Absamungsfrequenz zurückzuführen sein, doch müssen auch die Anzahl Versuchstiere sowie die Rassenzugehörigkeit (Colenbrander et al., 1992; Dowsett und Knott, 1996) berücksichtigt werden. Die von uns während der Sommermonate beobachtete Zunahme der Gesamtspermienzahl und des Volumens kann mit Änderungen der Photoperiodizität erklärt werden. Beim Pferd wird mit zunehmender Tageslichtdauer die endokrine Aktivität der Geschlechtsorgane (Harris et al., 1982; Johnson und Thompson, 1983; Hoffmann und Landeck, 1999) sowie die Sekretion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen stimuliert. Nach Untersuchungen von Johnson (1991) ist die erhöhte Spermienproduktion mit einer signifikanten Zunahme der Spermatogonienzahl während der Zuchtsaison verbunden.

Die progressive Motilität der Spermien ist wie die Gesamtspermienzahl und die Spermienmorphologie ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Zuchttauglichkeit eines Hengstes (Hurtgen, 1992; Pickett 1993). Es ist bekannt, dass die Spermienmotilität bei subfertilen Hengsten deutlich tiefer ist als bei Hengsten mit guter Fruchtbarkeit (Jasko et al., 1992). Die bei unseren Freiberghengsten gemessene Spermienmotilität war im Winter und Frühling am höchsten und im Sommer am tiefsten. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu früheren Untersuchungen, bei denen entweder keine saisonalen Unterschiede (Pickett et al., 1976), eine Tendenz zu schlechterer Motilität im Winter (Jasko et al., 1991) oder besserer Motilität im Sommer (Magistrini et al., 1987) beobachtet wurden. Die Annahme, dass die Motilität während der physiologischen Decksaison (Frühling und Sommer) am höchsten sei, konnten wir somit nur zum Teil bestätigen. Inwieweit saisonale Schwankungen der Spermienmotilität von der Pferderasse und von den jeweiligen klimatischen Verhältnissen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit etc.) abhängig sind, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. In diesem Zusammenhang spielt auch der Einfluss des Seminalplasmas eine wichtige Rolle, dessen Zusammensetzung

saisonale Schwankungen aufweisen kann (Gebauer et al., 1976). Zudem ist auch bekannt, dass sowohl zu geringe als auch zu hohe Mengen an Seminalplasma einen negativen Einfluss auf die Spermienmotilität haben können (Pickett et al., 1975).

Der saisonale Einfluss auf die Spermienmorphologie war ebenfalls deutlich zu erkennen. Der Anteil an morphologisch normalen Spermien war im Herbst und Frühling signifikant höher als im Winter. Ebenfalls kamen im Herbst signifikant weniger Hauptdefekte als in den übrigen Jahreszeiten vor. Diese Beobachtung deckt sich nur teilweise mit den spärlichen Angaben aus der Literatur (Van der Holst, 1975), dass während der Zuchtsaison (März bis August) weniger Spermienabnormalitäten auftreten sollen, als im Herbst und Winter. Insgesamt bleibt jedoch festzuhalten, dass die Anzahl morphologisch normaler Spermien bei unseren Hengsten während der ganzen Versuchszeit sehr tief war. Ein Hengst mit guter Fruchtbarkeit sollte mehr als 60% morphologisch normale Spermien und weniger als 5% Akrosomdefekte aufweisen (Hurtgen et al. 1992). Diese Anforderungen erfüllte keiner der untersuchten Freibergerhengste, obwohl sie im Natursprung Abfohlraten von 60-90% aufwiesen. Über Zusammenhänge zwischen Morphologie und Fruchtbarkeit berichten Jasko et al. (1990) und Love et al. (2000), die eine negative Abhängigkeit zwischen Anzahl Hauptdefekten und Fruchtbarkeit feststellen konnten. Hier gilt jedoch zu berücksichtigen, dass Hengste mit einem hohen Anteil abnormaler Spermien (Teratozoospermie) nicht zwingend eine schlechte Fruchtbarkeit aufweisen müssen, da nämlich eine grosse Gesamtspermienzahl (Graham, 1996) viele Defekte zu kompensieren vermag. Wird die Samendosis hingegen reduziert, wie dies im Rahmen der künstlichen Besamung praktiziert wird, kann sich die Trächtigkeitsrate pro Zyklus deutlich verschlechtern. Obwohl das Freibergerpferd als sehr fruchtbare Pferderasse gilt, sollte in Zukunft eine Verbesserung der Samenqualität angestrebt und die Fruchtbarkeit als wichtiges Zuchtziel verankert werden.

Im Herbst und Winter wurden die gewonnenen Ejakulate auch kryokonserviert. Als Qualitätsparameter des aufgetauten Samens wurden die progressive Motilität, die Vitalität und die osmotische Resistenz (ORT) bestimmt. Die Motilität des aufgetauten Samens wurde wie diejenige des Frischsamens sowohl vom einzelnen Hengst als auch vom Zeitpunkt der Samengewinnung hochsignifikant beeinflusst. Der Vergleich im aufgetauten Samen zeigt weiter, dass die im Herbst tiefgefrorenen Ejakulate eine deutlich höhere Motilität aufwiesen als die im Winter kryokonservierten. Dieses Ergebnis erstaunt, da im Winter die Motilität im Frischsamen tendenziell höher war als im Herbst. Als mögliche Ursachen für die widersprüchlichen Ergebnisse zwischen Motilität im frischen und aufgetauten Samen kommen wiederum saisonale Veränderungen in Menge und Zusammensetzung des Seminalplasmas sowie die damit verbundene Kryokonservierbarkeit (Pickett et al., 1975; Gebauer et al., 1976) in Frage.

Die Motilitätsbestimmung mittels computergestütztem Cell Motion Analyzer (CMA) im aufgetauten Samen ist problematischer als im Frischsamen, da die ohnehin erniedrigte Motilität im aufgetauten Samen während der Beurteilung rasch abnimmt und die Messungen in sehr kurzer Zeit durchgeführt werden müssen. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Arbeit von Wiedermann (1992), in der die Untersuchungszeit ebenfalls als kritischer Faktor und Ursache für inkonstante Ergebnisse angegeben wird.

Die Bestimmung der Vitalität zur Erfassung des Anteils lebender und toter Samenzellen wurde bei Hengstsamen mit einer DNA-Doppelfärbung durchgeführt. Obwohl bei der Fluoreszenzmessung von SYBR-14 und Propidiumjodid (PI) die Anweisung des Herstellers genau befolgt wurde, waren die lebenden grün fluoreszierenden (SYBR-14) Spermien häufig schlecht sichtbar, während die toten mit PI gefärbten Spermien intensiv rot fluoreszierten. Nach Garner et al. (1994) soll jedoch beim Stierensamen gerade das Gegenteil der Fall sein, d.h. die mit PI angefärbten toten Spermien fluoreszierten in seinem Experiment deutlich schwächer

als die lebenden grün gefärbten Samenzellen. Eine stärkere Emission von SYBR-14 bei Hengstspermien wurde in einer anderen Studie (Niederer, 2002) durch Verdoppelung der SYBR-14 Konzentration erreicht. Anhand unserer Ergebnisse konnte kein signifikanter saisonaler Einfluss auf die Vitalität im aufgetauten Samen festgestellt werden. Zu einem ähnlichem Resultat gelangten auch Magistrini et al. (1987), welche die Vitalität mittels einer Eosin-Nigrosin Färbung bestimmten.

Als Parameter zur Überprüfung einer intakten Membranfunktion haben wir beim aufgetauten Samen den osmotischen Resistenz-Test (ORT) durchgeführt und den prozentualen Anteil an geschwollenen und zugleich aktiven Samenzellen bestimmt. Wie bei der Vitalität konnten wir auch beim ORT keinen signifikanten Unterschied zwischen Herbst und Winter feststellen. Die Bedeutung des ORT zur Beurteilung der Hengstsamenqualität ist noch unklar. Beim Stier wurde eine hohe Korrelation ( $r = 0.79$ ) zwischen ORT im aufgetauten Samen und der Non-Return-Rate (NRR) gefunden. Ob der ORT oder ähnliche Tests wie der hypoosmotische Schwelltest (HOS) eine Aussage über die Befruchtungsfähigkeit von kryokonserviertem Hengstsamen erlauben, bleibt zusätzlichen Untersuchungen vorbehalten.

Die hohe Korrelation zwischen der subjektiv geschätzten und der objektiv gemessenen Motilität ist mit Vorsicht zu interpretieren, da beide Bestimmungen von der gleichen Person erhoben wurden. Obwohl die subjektive Bestimmung mit dem Phasenkontrastmikroskop zuerst vorgenommen wurde, kann eine mögliche Beeinflussung der nachfolgenden Messungen nicht ausgeschlossen werden. Die ebenfalls in unseren Untersuchungen beobachtete deutliche Abhängigkeit zwischen der Motilität im Frisch- und aufgetauten Samen bestätigt die Beobachtung von Samper et al. (1994), dass bei einem frischen Ejakulat mit guter Motilität auch eine entsprechend hohe Auftaurate erwartet werden kann, sofern sich der Hengst für die Samengefrierung eignet. In Übereinstimmung mit Ergebnissen von Januskauskas et al. (1996) beim Stier, haben wir eine gute Korrelation zwischen Vitalität und

---

Motilität gefunden, während zwischen ORT-aktiven Spermien und der Motilität bzw. Vitalität im aufgetauten Samen die Abhängigkeiten gering waren. Im Gegensatz dazu fanden Correa und Zavos (1994) eine gute Korrelation ( $r = 0.73$ ) zwischen dem HOS und der Motilität im aufgetauten Stierensamen.

Die Ergebnisse unserer Studie lassen den Schluss zu, dass die Samenqualität von Freiburgerhengsten deutliche individuelle wie auch saisonale Schwankungen aufweist. Die im Herbst gewonnenen Ejakulate zeigten eine gute Qualität, insbesondere was die Spermienmorphologie betrifft und eignen sich aufgrund der hohen Motilität im aufgetauten Samen besser zur Kryokonservierung als im Winter gewonnene Ejakulate.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Studie wurden verschiedene Samenqualitätsparameter während eines Jahres im Frischsamen untersucht und die Kryokonservierbarkeit im Herbst und Winter verglichen. Die Untersuchungen wurden mit 15 gekörnten Freibergerhengsten des Nationalgestüts in Avenches durchgeführt. Die Hengste wurden dazu während eines Jahres einmal im Monat abgesamt und die gewonnenen Ejakulate untersucht. In den Monaten September bis Februar wurden die Ejakulate zusätzlich tiefgefroren.

Im Frischsamen wurde von allen Ejakulaten Volumen, Spermiedichte, Gesamtspermienzahl, Motilität (subjektiv und objektiv) und die Spermienmorphologie (normale Spermien, Hauptdefekte, Akrosomdefekte, Kernvakuolen) bestimmt. Im aufgetauten Samen prüften wir die Motilität, Vitalität (SYBR-14/PI) und Membranintegrität (ORT-Test).

Alle von uns erhobenen Qualitätsparameter im Frischsamen wurden vom jeweiligen Hengst als auch vom Zeitpunkt der Samengewinnung signifikant beeinflusst. Um saisonale Unterschiede festzustellen, haben wir unsere Ergebnisse in dreimonatige Zeitabschnitte (Frühling, Sommer, Herbst, Winter) zusammengefasst. Das Ejakulatvolumen war im Frühling und Sommer signifikant ( $P < 0.05$ ) höher als im Herbst und Winter und die Dichte im Frühling signifikant ( $P < 0.05$ ) tiefer als in den übrigen Jahreszeiten. Im Sommer wurden signifikant ( $P < 0.05$ ) höhere Gesamtspermienzahlen und eine signifikant ( $P < 0.05$ ) geringere Motilität als im Herbst, Winter und Frühling gemessen. Der Anteil morphologisch normaler Spermien war im Herbst signifikant ( $P < 0.05$ ) höher als im Winter und Sommer und Hauptdefekte kamen im Herbst deutlich seltener ( $P < 0.05$ ) vor als in den übrigen Jahreszeiten. Im aufgetauten Samen wurden alle Qualitätsparameter vom jeweiligen Hengst signifikant ( $P < 0.05$ ) beeinflusst. Die Motilität der im Herbst tiefgefrorenen Ejakulate war signifikant ( $P < 0.05$ ) höher als im Winter, während Vitalität und ORT keine deutlichen Unterschiede zeigten.

---

Aufgrund unserer Ergebnisse kann gefolgert werden, dass die Samenqualität von Freiburgerhengsten deutliche individuelle wie auch saisonale Schwankungen aufweist. Die im Herbst gewonnenen Ejakulate zeigten eine gute Qualität, insbesondere was die Spermienmorphologie betrifft und eignen sich aufgrund der hohen Motilität im aufgetauten Samen weit besser zur Kryokonservierung als im Winter gewonnene Ejakulate.

## 6. SUMMARY

The objective of this study was to investigate seasonal changes of Franches-Montagnes stallion semen quality parameters and to compare the freezability of ejaculates collected in autumn and winter. Experiments were performed using 15 Franches-Montagnes stallions from the National Stud Farm in Avenches. Ejaculates were collected and evaluated every month during one year as well as cryopreserved in autumn and winter (September to February). In fresh semen the gel-free volume, concentration, motility and morphology (normal sperm, major defects, vacuoles and acrosome defects) were evaluated and in frozen-thawed semen the motility as well as the viability (SYBR-14/PI) and the osmotic resistance (ORT) were performed. To analyse seasonal differences 4 periods of 3 months each were defined as autumn (September, October, November), winter (December, January, February), spring (March, April, May) and summer (June, July, August). During the one-year experiment all fresh semen quality parameters demonstrated a clear seasonal and individual pattern. The gel-free volume was significantly ( $P < 0.05$ ) higher in spring and summer compared to autumn and winter while sperm concentration was significantly ( $P < 0.05$ ) lower in spring than at any other time of the year. Total sperm number was significantly ( $P < 0.05$ ) higher and sperm motility significantly ( $P < 0.05$ ) lower in summer than in other seasons. Regarding sperm morphology, normal sperm was significantly ( $P < 0.05$ ) higher in autumn than in winter and summer and major defects were lowest ( $P < 0.05$ ) in autumn. In frozen-thawed semen motility was significantly ( $P < 0.05$ ) improved in the ejaculates collected in autumn compared to winter, while viability and ORT showed no seasonal differences. Our results clearly demonstrate that individual and seasonal differences occurred in semen quality of Franches-Montagnes stallions. Ejaculates collected in autumn (September, October, November) exhibited best quality, especially when sperm morphology is considered

and were more suitable for cryopreservation because of better motility in frozen-thawed semen collected during autumn than in winter.

## 7. APPENDIX

### Vorverdünner V1

Der Vorverdünner besteht aus gleichen Teilen Elektrolytlösung und Magermilch sowie 2% Eigelb.

#### 1. Herstellung der Elektrolytlösung:

Glukose wasserfrei (  $C_6H_{12}O_6$  ) 50 g

Laktose-Monohydrat (  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ,  $H_2O$  ) 3 g

Raffinose-Pentahydrat (  $C_{18}H_{32}O_{16}$ ,  $5H_2O$  ) 3 g

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (  $C_6H_5Na_3O_7$ ,  $2 H_2O$  ) 0.49 g

Tri-Kaliumcitrat-Monohydrat (  $C_6H_5K_3O_7$ ,  $H_2O$  ) 0.82 g

Hepes: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2Ethansulfonsäure  
(  $C_8H_{18}N_2O_4S$  ) 9.25 g

ad 1 Liter Aqua ad injectionem

#### 2. Herstellung der Eidotterlösung

40 ml Elektrolyt / Magermilchlösung mit 50 ml Eigelb (frische Eier) im Rührer während mindestens 10 Minuten gut mischen und anschliessend zentrifugieren (600 x g, 10 Min.). 80 ml des Überstandes zu 1920 ml Elektrolyt / Magermilchlösung geben, mischen und pH kontrollieren (pH = 6.8).

Haltbarkeit des Vorverdünners: max. 5 Tage bei 4°C (pH-Kontrolle)

**Endverdünner V2**

Herstellung von 100ml Endverdünner:

Lactoselösung 11%      75 ml

(Lactose ( $C_6H_{12}O_{11}$ ,  $H_2O$ ) in Aqua ad injectionem aufgelöst)

Eigelb      20 ml

Glycerin wasserfrei, rein ( $C_3H_8O_3$ )      5 ml

**Hancock-Lösung**

di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ( $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ )      6.19 g

Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )      2.54 g

Natriumchlorid ( $NaCl$ )      5.41 g

Formaldehydlösung 36-37%      125 ml

Aqua bidest. Ad 1'000 ml

**ORT-Lösung**

Fructose      9.0 g

Trisodium Citrat      4.9 g

Aqua bidest. 1'000 ml

Osmolarität 100 mOsm/Liter

**SYBR-14-Lösung**

SYBR-14      10 $\mu$ l

DMSO 99.8%      90 $\mu$ l



---

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

BLACH EL, AMANN RP, BOWEN RA, FRANTZ D. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: Plasma membrane integrity and motion characteristics. *Theriogenology* 1989, 31: 283-298.

BORG K, COLENBRANDER B, FAZELI A, PARLEVLIET J, MALMGREN L. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1997, 48: 531-536.

BRAUN J, MUTO Y, SATO K, SCHALLENBERGER E. Der Einfluss von Jahreszeit und sexueller Beanspruchung auf die Konzentration von Testosteron und Östradiol-17 $\beta$  im Seminalplasma beim Hengst. *Tierärztl. Praxis* 1996, 24: 577-580.

BYERS SW, DOWSETT KF, GLOVER TD. Seasonal and circadian changes of testosterone levels in the peripheral blood plasma of stallions and their relation to semen quality. *J. Endocrinol.* 1983, 99: 141-150.

CAIZA DE LA CUEVA FI, RIGAUD T, BONET S, MIRÓ J, ERIZ M, RODRÍGUEZ-GIL JE. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: Effects of Ouabain. *Theriogenology* 1997, 47: 765-784.

CLAY CM, CLAY JN. Endocrine and testicular changes associated with season, artificial photoperiod, and the peri-pubertal period in stallions. *Equine Practice* 1992, 8: 31-55.

COCHRAN JD, AMANN RP, FROMAN DP, PICKETT BW. Effects of centrifugation,

glycerol level, cooling to 5<sup>0</sup>C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology* 1984, 22: 25-38.

COLENBRANDER B, PUYK H, ZANDEE AR, PARLEVLIET J. Evaluation of the stallion for breeding. *Acta Vet. Scand.* 1992, 88: 29-37.

CORREA JR, ZAVOS PM. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 1994, 42: 351-360.

DOWSETT KF, KNOTT LM. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 1996, 46: 397-412.

GARNER DL, JOHNSON LA, YUE ST, ROTH BL, HAUGLAND RP. Dual DNA staining assessmant of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J. Androl.* 1994, 15: 620-629.

GARNER DL, JOHNSON LA. Viability assessmant of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.* 1995, 53: 276-284.

GEBAUER MR, PICKETT BW, FAULKNER LC, REMMENGA EE, BERNDTSON WE. Reproductive physiology of the stallion. VII. Chemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 1976, 43: 626-632.

GRAHAM JK. Cryopresevation of stallion spermatozoa. *Equine Practice* 1996, 12: 131-147.

---

HARRIS JM, IRVINE GHG, EVANS MJ. Seasonal changes in serum levels of FSH, LH and testosterone and in semen parameters in stallions. *Theriogenology* 1982, 19: 311-321.

HOFFMANN B, LANDECK A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Anim. Reprod. Sci.* 1999, 57, 89-98.

HURTGEN JP. Evaluation of stallion for breeding soundness. *Equine Practice* 1992, 8: 149-165.

IRVINE CHG, ALEXANDER S. Importance of testicular hormones in maintaining the annual pattern of LH secretion in the male horse. *J. Reprod. Fertil.* 1982, 32: 97-102.

JANUSKAUSAS A, GIL J, RODRIGUEZ-MARTINEZ H, SOEDERQUIST L, LUNDEHEIM N. Effects of a brief elevation of scrotal temperature on the post-thaw viability of bull semen. *Reprod. Dom. Anim.* 1995, 30: 271-277.

JASKO DJ, LEIN DH, FOOTE RH. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1990;197: 389-394.

JASKO DJ, LEIN DH, FOOTE RH. The reparability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion. *Theriogenology* 1991, 35: 317-327.

JASKO DJ, LITTLE TV, LEIN DH, FOOTE RH. Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1992, 200: 979-985.

JEYENDRAN RS, VAN DER VENT HH, PEREZ-PELAEZ M, CRABO BG, ZANEVELD LJD. Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fert. 1984, 70: 219-228.

JOHNSON L, THOMPSON DL. Age-related and seasonal variation in the sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. Biol. Reprod. 1983, 29: 777-789.

JOHNSON L. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. Biol. Reprod. 1991, 44: 284-291.

LOVE CC, VARNER DD, THOMPSON JA. Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. J. Reprod. Fert. 2000, 56: 93-100.

MAGISTRINI M, CHANTELOUBE PH, PALMER E. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. J. Reprod. Fert. 1987, 35: 127-133.

MALMGREN L. Assessing the quality of raw semen: A review. Theriogenology 1997, 48: 523-530.

NIEDERER K. Jahreszeitliche Schwankungen der Samenqualität und Kryokonservierbarkeit bei Warmbluthengsten. Dissertation, Universität Zürich, 2002.

---

PICKETT BW, FAULKNER LC, SEIDEL GE, BERNDTSON WE, VOSS, JL. Reproductive physiology of the stallion. VI. Seminal and behavioral characteristics. *J. Anim. Sci.* 1976, 43: 617-625.

PICKETT BW, AMANN RP, MCKINNON AO, SQUIRES EL, VOSS JL. Management of the stallion for maximum reproductive efficiency. *Season. Anim. Reprod. Lab. Bulletin* 1989, 03: 39-58.

PICKETT BW. Factors affecting sperm production and output. In: *Equine Reproduction*, Eds. A Mc Kinnon and J Voss, Lea & Febiger, 1993: 689-704.

PICKETT BW. Reproductive evaluation of the stallion. In: *Equine Reproduction*, Eds. A Mc Kinnon and J Voss, Lea & Febiger, 1993: 755-768.

PICKETT BW, AMANN RP. Cryopreservation of semen. In: *Equine Reproduction*, Eds. A Mc Kinnon and J Voss, Lea & Febiger, 1993: 769-789.

REVELL SG AND MRODE RA. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 1994, 36: 77-86.

SAMPER JC, HEARN P, GANHEIM A, CURTIS E. Pregnancy rates and effect of extender on motility and acrosome status of frozen thawed stallion spermatozoa. *Proc. 40th Annual AAEP Convention, Vancouver 1994*: 41-43.

SAMPER JC. Artificial Insemination. In: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, Ed. JC Samper, WB Saunders Company, 2000.

THUN R. Physiologie und Pathophysiologie der Fortpflanzungsregulation. In: Fruchtbarkeitskontrolle bei Gross- und Kleintieren, Eds. W Busch und K Zerobin, Gustav-Fischer-Verlag 1995: 19-39.

VAN DER HOLST W. A study of the morphology of stallion semen during the breeding and non-breeding seasons. J. Reprod. Fert. 1975, 23: 87-89.

WIEDERMANN J. Erfahrungen mit dem computergestützten Bildanalyse-System von Mika-Strömberg (SM-CMA) bei der Beurteilung von aufgetautem Rindersperma. Dissertation, Universität Bern, 1992.

## 9. DANKSAGUNG

Hier möchte ich allen danken, die mir bei dieser Arbeit geholfen haben, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. R. Thun, Departement für Nutztiere, Klinik für Fortpflanzungsmedizin der Universität Zürich, für die grosszügige Unterstützung und die Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. E. Scharrer, Departement für Veterinär-Physiologie und Tierernährung der Universität Zürich, für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. F. Janett, Departement für Nutztiere, Klinik für Fortpflanzungsmedizin der Universität Zürich, für die fachliche Leitung und umfassende Betreuung der ganzen Arbeit.

Herrn Dr. P.A. Poncet, Direktor des Nationalgestüt Avenches, für die Anstellung als Assistenztierarzt.

Herrn Dr. D. Burger, Leiter des Reproduktionszentrums am Nationalgestüt Avenches, für die grosszügige Unterstützung.

Herrn Dr. M. Hässig, Departement für Nutztiere der Universität Zürich, für die statistischen Auswertungen.

Herrn H. Schwab, W. Schwab und allen Mitarbeitern des Reproduktionszentrums des Nationalgestüts für ihre Kollegialität und tatkräftige Mithilfe bei der Gewinnung und Verarbeitung der Ejakulate.

Allen Hengsthaltern für ihre Mitarbeit während der Untersuchungsphase.

## 10. LEBENSLAUF

Stefan Bettschen

Geboren am 04.02.1970 in St. Gallen

Heimatort: Reichenbach i.K. (BE)

1977-89	Primarschule bis Gymnasium in Burgdorf
1989	Kantonale Matur Typus C in Burgdorf
1989	Praktikum bei Dr. med. vet. H. Kilchenmann, Koppigen
1990	Praktikum in einem Gestüt in Hampshire (England)
1990-95	Studium der Veterinärmedizin Universität Bern
1995	Schlussprüfung an der Universität Bern
1995-97	Assistentenstelle bei Dr. med. vet. H. Kilchenmann, Gross- und Kleintierpraxis in Koppigen
1998	Assistent/Doktorand am Reproduktionszentrum des Nationalgestüts in Avenches
1999	Assistent bei H.R. Reusser, Gross- und Kleintierpraxis in Rapperswil BE
2001	Leiter Reproduktionsstation NPZ Bern