

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 und Kryokonservierbarkeit bei Warmbluthengsten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde der Veterinärmedizinischen
Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von

KARIN NIEDERER

Tierärztin von Buchs SG

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

Zürich 2001

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	4
1.1.	Bedeutung der künstlichen Besamung beim Pferd	4
1.2.	Einflussfaktoren auf die Samenqualität	6
1.3.	Fragestellung	7
2.	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	9
2.1.	Tiere	9
2.2.	Versuchsordnung	9
2.3.	Samengewinnung	9
2.4.	Samenverarbeitung	10
2.5.	Untersuchungen im Frischsamen	12
2.5.1.	Volumen	12
2.5.2.	Dichte	12
2.5.3.	Gesamtpermienzahl	12
2.5.4.	Motilität	12
2.5.5.	Morphologie	14
2.6.	Untersuchungen im aufgetauten Samen	14
2.6.1.	Motilität	15
2.6.2.	Vitalität	15
2.6.3.	Hypoosmotischer Schwelltest (HOS)	16

Mis en forme

Mis en forme

2.7.	Statistik	17
3.	ERGEBNISSE	18
3.1.	Samenqualität im Frischsamen	18
3.1.1.	Jahreszeitliche Schwankungen	18
3.1.2.	Individuelle Schwankungen	23
3.1.3.	Einfluss von Hengst und Zeitpunkt	28
3.2.	Samenqualität im augetauten Samen	29
3.2.1.	Jahreszeitliche Schwankungen	29
3.2.2.	Individuelle Schwankungen	31
3.2.3.	Einfluss von Hengst und Zeitpunkt	33
3.3.	Saisonale Unterschiede und Korrelationen zwischen den verschiedenen Samenqualitätsparametern	34
4.	DISKUSSION	37
5.	ZUSAMMENFASSUNG	43
6.	SUMMARY	45
7.	APPENDIX	47
8.	LITERATURVERZEICHNIS	50
9.	LEBENS LAUF	56
10.	DANKSAGUNGEN	57

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

1.1. Bedeutung der künstlichen Besamung beim Pferd

Die Bedeutung der künstlichen Besamung (KB) in der Pferdezucht hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Gründe dafür sind vor allem die hohen Anforderungen in Bezug auf die Leistungsfähigkeit der Hengste im Sportbereich sowie die eingeschränkte Verfügbarkeit der Hengste während der Zuchtsaison. Die Nachfrage nach Samen von in- und ausländischen Hengsten mit sehr guten Sportleistungen ist besonders in der Warmblutzucht gestiegen. In Schweiz wird die künstliche Besamung vor allem beim Schweizer Warmblut und einigen, in der Schweiz wenige verbreiteten Pferderassen wie Araber, Achal Tekkiner, Friese und Quarter Horse, durchgeführt. Sofern möglich, wird Kühl- oder Frischsamen verwendet, da im Vergleich zu Tiefgefriersamen höhere Trächtigkeitsraten erzielt werden können. Aufgrund intensiver Betreuung weisen die mit Frisch- oder Kühltaschen belegten Stuten häufig sogar bessere Befruchtungsergebnisse auf als im Natursprung gedeckte Stuten.

Das erste Fohlen von einer mit tiefgefrorenem Samen belegten Stute wurde 1957 in Kanada geboren. In der Schweiz fanden erste KB-Versuche in den 60-er Jahren am Nationalgestüt Avenches statt und die Geburt des ersten Fohlens aus einer Gefriersamenübertragung erfolgte 1969. Aufgrund der damals schlechten Trächtigkeitsergebnisse stagnierte das Interesse an der Kryokonservierung von Hengstisamen während längerer Zeit, hat aber in den letzten Jahren im In- und Ausland immer mehr an Bedeutung zugenommen. Gründe dafür sind vor allem die weitgehend geographische und zeitliche Unabhängigkeit bezüglich Hengst- und Stutenstationierung. Dies ermöglicht eine grössere Anzahl Stuten an gleichzeitig verschiedenen Orten besamen zu können, ohne dass diese unter Stresseinwirkung über längere Distanzen

transportiert werden müssen. Zudem erlaubt der Einsatz von Gefriersamen eine bessere Selektion und zuchthygienische Überwachung wertvoller Hengste und bedeutet letztlich auch eine erhöhte Sicherheit für Mensch und Tier. Heute werden in der Schweiz rund zwei Drittel der Zuchtstuten durch KB gedeckt, ein Drittel davon mit Gefriersamen. Als Nachteil beim Einsatz von Tiefgefriersamen muss 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, 1995). Günstige Bedingungen bedeuten eine gute Qualität des aufgetauten Samens sowie eine geschlechtsgesunde Stute, die unter Follikel- bzw. Ovulationskontrolle zum richtigen Zeitpunkt besamt wird. Da 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.

Die Kryokonservierbarkeit des Samens schwankt individuell sehr stark. Nur ca. 25% der Hengste erreichen mit Gefriersamen Trächtigkeitsraten, die mit einer Frischsamenbelegung vergleichbar sind (Amann und Picket, 1987). Entscheidend für das Tiefgefrieren sind die Qualität des Frischsamens (insbesondere die Motilität und Dichte) und eine möglichst optimale Samenverarbeitung (Zentrifugation und Gefrierprozess).

1.2. Einflussfaktoren auf die Samenqualität

Aus zahlreichen Untersuchungen wissen wir, dass unterschiedliche Faktoren die Samenqualität beim Hengst beeinflussen können. Besonders wichtig ist das Management der Hengste, d.h. gute Haltungsbedingungen, eine adäquate Fütterung sowie genügend Bewegung und Pflege. Auch frequente und regelmässige Deckeinsätze bzw. Samenentnahmen wirken sich in der Regel positiv auf die Samenqualität aus. Diese wird ebenfalls von der Rasse beeinflusst, denn es ist bekannt, dass zum Beispiel Friesenhengste (Colenbrander et al., 1992) häufig eine schlechte Samenqualität aufweisen und viele Samenqualitätsparameter von der Rasse abhängig sind (Dowsett und Knott, 1996).

Neben Managementfaktoren wird die Fortpflanzungsfunktion beim Hengst auch durch jahreszeitliche Veränderungen der Lichtdauer (Photoperiodik) beeinflusst. 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 Blut zunehmen. Dies führt zu einer Steigerung von Libido und Spermatogenese sowie einer Stimulation der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Harris et al., 1982). Da dieser 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 eine Abnahme der Lichtdauer (Kurztag) stimuliert wird (Thun, 1995).

Während über jahreszeitliche Schwankungen der endokrinen Hodenfunktion beim Hengst umfangreiche Studien vorliegen (Harris et al., 1982; Byers et al., 1983; Nagata et al., 1998; Hoffmann und Landeck, 1999; Gerlach und Aurich,

2000), lassen sich bezüglich Samenqualität nur spärliche und zum Teil widersprüchliche Angaben (Johnson und Thompson, 1983; Magistrini et al., 1987; Jasko et al., 1991) finden. Hinsichtlich Qualitätseigenschaften spielt bei der Kühl- und Gefriersamenproduktion die Individualität des einzelnen Hengstes eine entscheidende Rolle. Obwohl einige Autoren (Amann und Pickett, 1987; Samper et al., 1994) berichten, dass sich gewisse Hengste unabhängig von der Qualität des Frischsamens für den Gefrierprozess besser eignen (good freezers) als andere (poor freezers), ist allgemein bekannt, dass beim Frischsamen vor allem die Dichte und Motilität auf die Qualität des Gefriersamens grossen Einfluss haben können (Samper et al., 1994). Der verwendete Verdünner soll nach Pickett und Amann (1992) die Gefrierbarkeit von Hengstsamen verbessern, während Samper und Morris (1998) dies in ihren Untersuchungen nicht bestätigen konnten. Weiter sind die Konfektionierung, die Geschwindigkeit und die Dauer der Zentrifugation sowie die Einfriergeschwindigkeit als wesentliche Einflussfaktoren schon länger bekannt (Cochran et al., 1984; Blach et al., 1989). Beim Auftauen verdienen Dauer und Temperatur sowie Material und Grösse der Pailletten besondere Beachtung (Pickett und Amann, 1993; Borg et al., 1997).

1.3. Fragestellung

Im Nationalgestüt Avenches wird Hengstsamen aus organisatorischen Gründen vor allem während der Wintermonate Dezember bis Februar tiefgefroren, dies obwohl die physiologische Fortpflanzungsperiode beim Pferd in die Monate April bis November fällt. Da eingehende Untersuchungen über jahreszeitliche Schwankungen der Samenqualität bei Warmbluthengsten in der Schweiz fehlen, ist das Ziel der vorliegenden Studie

Supprimé : Routinemässig werden vor allem folgende, schon oben erwähnte, Spermaparameter erhoben: Volumen (gelfrei), Dichte, progressive Motilität. ¶ Üblicherweise wird Hengstesperma bei uns, aus organisatorischen Gründen, vor allem im Winter (Dezember, Januar, Februar) kryokonserviert. Saisonale Qualitätsschwankungen könnten daher für die Kryokonservierung interessant sein. Es werden vor allem die Spermaparameter Volumen, Dichte und progressive Motilität verwendet. Es bestehen jedoch jedoch nur wenige Korrelationen zwischen den meisten Spermaqualitätsparametern und der Fruchtbarkeit eines Hengstes (*Lena Malmgren, 1997*). In Untersuchungen wurde gezeigt, dass Volumen und Dichte der Ejakulate eines Hengstes einer grossen Variation unterliegen. Es wurde aber ein signifikanter saisonaler Einfluss auf die progressive Motilität, die mittels computerassistierter Samenanalyse (CASA) ermittelt wurde, beobachtet (*D.J. Jakob, D.H. Lein, R.H. Foote, 1990*). ¶

Mise en forme : Pucés et numéros

1. die Qualität von Frisch- und Gefriersamen bei Schweizer Warmbluthengsten während der Dauer eines Jahres zu verfolgen und

2. den optimalen Zeitpunkt für die Kryokonservierung festzulegen.

Supprimé : <#>Bestehen Zusammenhänge zwischen den erhobenen Samenqualitätsparametern und der Fruchtbarkeit?¶

Mise en forme : Puces et numéros

2. TIERE, MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiere

Für die vorliegenden Untersuchungen standen 10 angehörte Schweizer Warmbluthengste, im Alter zwischen 5 und 19 Jahren zur Verfügung. Davon wurden 8 Hengste während des ganzen Jahres am Nationalgestüt gehalten. Die Fütterung bestand aus Heu (zweimal täglich 3 kg) und Hafer (dreimal täglich 1-2 Liter) sowie Pellets (täglich 1-2 Liter pro Tag). Einmal pro Woche erhielten die Hengste Mash (aufgebrühter Hafer, Weizenkleie, Leinsamen, Glaubersalz). Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Zur Aufrechterhaltung der Kondition wurden die Hengste jeden Tag bewegt (Weide oder Karussell) und/oder geritten bzw. im Springsport eingesetzt. Während der Zuchtsaison (1. März bis 30. Juni) standen die Hengste im KB - Einsatz.

2.2. Versuchsplanung

Vor Versuchsbeginn wurden die extragonadalen Spermareserven aller Hengste durch tägliche Samenentnahmen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen minimiert und die Tiere ans Phantom gewöhnt (Institut du Cheval, 1996). Von jedem Hengst wurden 26 Ejakulate im Abstand von zwei Wochen während eines Jahres gewonnen, untersucht und kryokonserviert. Der Frischsamen wurde unmittelbar nach der Gewinnung für die Kryokonservierung weiter verarbeitet.

2.3. Samengewinnung

Die Samengewinnung erfolgte am Phantom mittels künstlicher Scheide (Modell „Avenches“, Scheidentemperatur 38°C) in Anwesenheit einer ovarektomierten Stute.

Supprimé : 15

Supprimé : Zuchthengste der Freibergerrasse

Supprimé : 4

Supprimé : Während der Decksaison waren 5 im Jura (Le Crêt-du-Loche, Montfaucon, Les Breuleux), 6 im Kanton Bern (Bütschegg, Bärau, Sumiswald) und 4 im Eid. Gestüt in Avenches (VD) stationiert. Ausserhalb

Supprimé : der Decksaison waren alle Hengste im Eid

Supprimé : Gestüt aufgestellt.

Supprimé : 4-5

Supprimé :

Supprimé : Zwe

Supprimé : Von ursprünglich 113 Prüfstieren der Besamungsstation Bütschwil (SG) standen 78 Stiere der Rassen Schweizer Braunvieh, Holstein und Schweizer Fleckvieh im Alter zwischen 12 und 14 Monaten für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung. Die restlichen Tiere wurden aus Zuchttauglichkeitsgründen oder mangels ungenügender Pailletenzahl für das Projekt nicht berücksichtigt. Die Stiere wurden in den Stallungen der Besamungsstation Bütschwil (... [1])

Supprimé : täglichen

Supprimé : eingespannt

Supprimé : Samengewinnung (... [2])

Supprimé : Alle Versuche (... [3])

Supprimé : Hengste du (... [4])

Mis en forme

Mis en forme

Supprimé : Phase 1: (... [5])

Mis en forme

Mise en forme : Pucés et numéros (... [6])

Mis en forme

Supprimé : verarbeitung

Mis en forme

Mis en forme

2.4. Samenverarbeitung

Das gefilterte, unverdünnte Ejakulat wurde unmittelbar nach der Gewinnung zur Bestimmung von Volumen und Spermienkonzentration in ein Wasserbad (37°C) gestellt. Anschliessend wurde der Samen auf eine Konzentration von 100 Mio. Spermien/ml vorverdünnt (V1), wobei das Verdünnungsverhältnis mindestens 1:1 betrug. Es folgte die für jeden Hengst individuelle Zentrifugation des Samens bei Raumtemperatur (1000 x g, 80-105 Sek.). Nach Entfernung des Überstandes wurde dieser durch Zugabe des Gefrier- bzw. Endverdünners (V2) auf die Endkonzentration von 300 Mio. Spermien/ml verdünnt. Das Abkühlen des verdünnten Samens auf +4°C erfolgte während mindestens 20 Minuten (Rock'n Roller, Minitüb). Anschliessend fand die Konfektionierung (MRS1 Cassou, Frankreich) in 0.5 ml Pailletten sowie das Tiefgefrieren (Minidigitcool 700 ZB 290, IMV) mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 60°C/ Minute von +4°C auf -100°C und von 30°C/ Minute bis -140°C statt. Die tiefgefrorenen Pailletten wurden im Flüssigstickstoff bei -196°C bis zur Untersuchung gelagert.

Supprimé : -

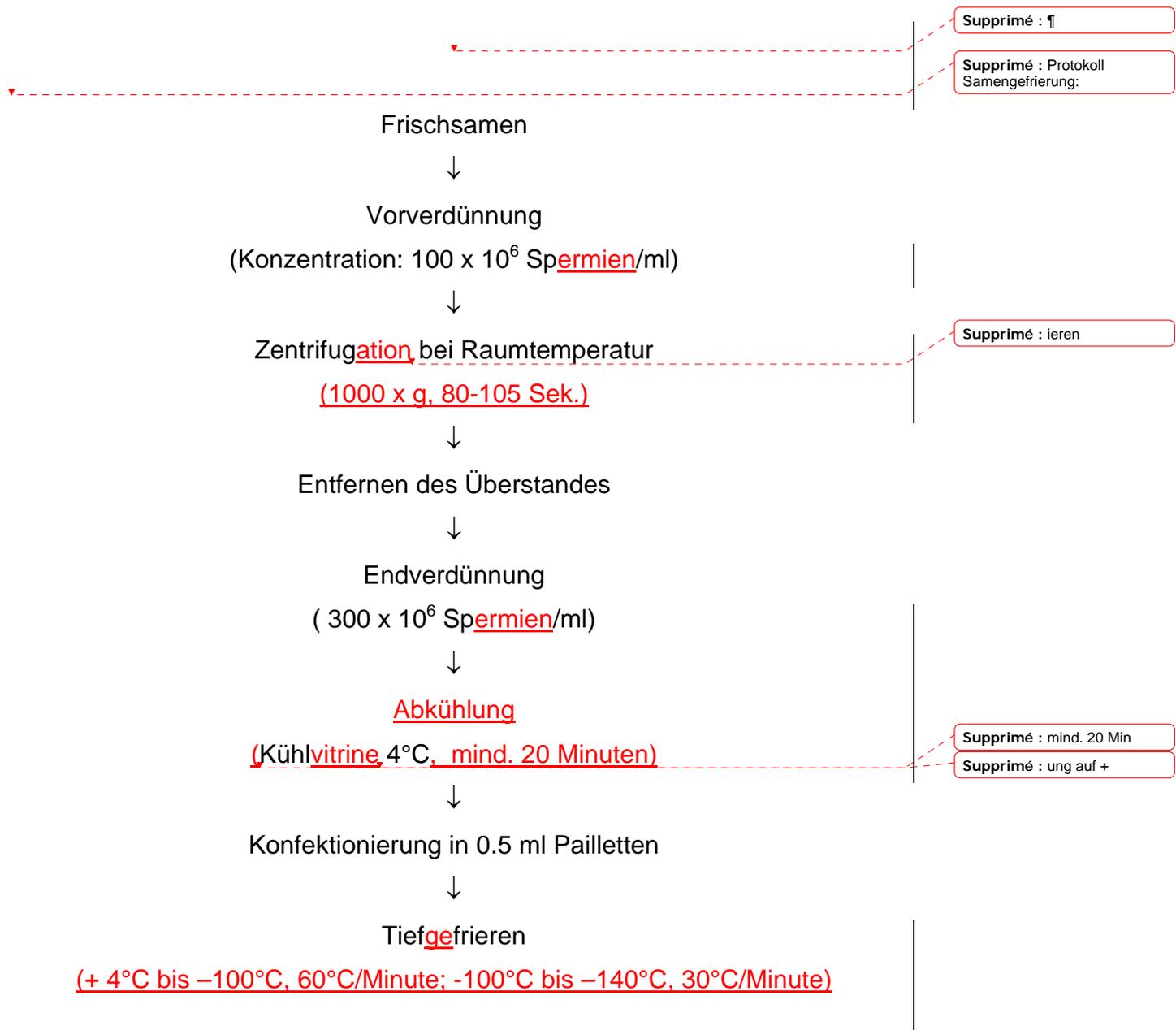


Abb. 1. Samenverarbeitung von der Gewinnung bis zum Tiefgefrieren.

2.5. Untersuchungen im Frischsamen

2.5.1. Volumen

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

2.5.2. Dichte

Die Spermienkonzentration des Frischsamens wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (Spermacue[®], Minitüb, Landshut, BRD) in Millionen Spermien/ml Ejakulat gemessen.

2.5.3. Gesamtpermienzahl

Die Gesamtpermienzahl (Ausbeute) stellt die absolute Anzahl Spermien im Ejakulat dar und ist das Produkt von Volumen und Dichte.

2.5.4. Motilität

Zur subjektiven Bestimmung der Motilität wurden 6 μ l des verdünnten Samens auf einen vorgewärmten Objektträger (Heiztisch bei 37°C) gegeben, mit einem Deckglas 24 x 24 mm versehen und bei 200facher Vergrößerung im Phasenkontrast unter dem Lichtmikroskop (Axiolab, Zeiss) beurteilt. Zur objektiven Bestimmung der Motilität diente ein Cell Motion Analyzer (SM-CMA-1074, MTM, Switzerland; Software für Microsoft Windows 95 & NT 4.0 Version 2.0), Die Messungen wurden folgendermassen durchgeführt:

Supprimé : ¶
¶

Mise en forme : Pucés et numéros

Supprimé : Fluoreszenzmikroskopische Vitalitätsuntersuchung und HOST-Test können nicht mit dem frischen Ejakulat durchgeführt werden, weil die Untersuchungen unmittelbar nach der Ejakulatentnahme durchgeführt werden müssten und relativ zeitaufwendig sind.¶

Mise en forme : Pucés et numéros

Supprimé : Das Volumen des filtrierten Ejakulates

Supprimé : <#>¶

Mise en forme : Pucés et numéros

Supprimé : n

Supprimé :

Supprimé : <#>4¶
<#>Volumen¶
<#>Das Volumen Nach einer Filtrierung des filtrierten Ejakulates (Milchfilterschläuche für Rohrmelkanlagen) wurde das Volumen in einem graduierten Messzylinder bestimmt.¶

Mise en forme : Pucés et numéros

Supprimé : von MTM, Schweiz

- die zum System gehörenden speziellen **Kammern (Mika Chamber MTM AG)** mit einer Tiefe von 0.01 mm wurden mit dem vorverdünnten Samen beschickt
- über eine am Mikroskop angeschlossene Videokamera wurden die zu messenden Objekte erfasst
- die von der Kamera aufgenommenen Bilder wurden anschliessend von der Computersoftware digitalisiert und als Sequenz im Speicher abgelegt. Das Videobild wurde auf dem Computerbildschirm in einem eigenen Fenster eingeblendet. Nach erfolgter Analyse wurden die Messergebnisse angezeigt und auf der Festplatte gespeichert.

Pro Samenprobe wurden 10 verschiedene Messfelder im Zentrum der Messkammer und mindestens 500 Spermien ausgewertet. Die Proben wurden mit folgenden für Hengstsamen standardisierten Einstellungen ausgewertet:

Supprimé : am Mikroskop vorbereitet
Am Mikroskop war eine Videokamera angeschlossen, welche direkt mit dem Computer (Programm MTM für Windows) verbunden war.

Tab. 1. Einstellungen des Cell Motion Analyzers für Hengstsamen.

Supprimé : ¶

ANALYSEEINSTELLUNGEN	WERT	EINHEIT
Anzahl der Bilder	32	
Minimale Fläche des Objektes	20	pix
Maximale Fläche des Objektes	299	pix
Geschwindigkeitsgrenze unbewegliche Objekte	9	µm/s
Geschwindigkeitsgrenze ortsbewegliche Objekte	15	µm/s

Mis en forme

Mis en forme

Mis en forme

Mit dem CMA kann sowohl die Motilität (unbewegliche, ortsbewegliche und vorwärtsbewegliche Spermien) als auch die Geschwindigkeit (lineare und nicht lineare Geschwindigkeit) gemessen werden. In unserer Studie wurde nur die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien (progressiv motile Spermien) berücksichtigt.

Supprimé : ¶

Supprimé : <#>Morphologie

Supprimé : <#>¶

2.5.5. Morphologie

Für die Morphologie wurden 5 Tropfen Frischsamen in 2 ml Hancock Lösung 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 anschliessend an der Luft getrocknet. Zur morphologischen Beurteilung wurden die so erhaltenen Ausstriche mit einem kleinen Tropfen Wasser versehen, ein Deckglas darübergelegt und mindestens 200 Spermien bei 1000facher Vergrösserung im Phasenkontrast-Mikroskop ausgezählt. Die Protokollierung der abweichenden Formen erfolgte gemäss Klassifikationsschema des andrologischen Labors (s. Appendix), wobei der Prozentsatz an normalen Spermien, Hauptdefekten, Vakuolen und Akrosomdefekten berechnet wurde.

Supprimé : ab

2.6. Untersuchungen im aufgetauten Samen

Für die Untersuchungen im aufgetauten Samen (Motilität, Vitalität, HOS-Test) wurden je 3 Pailletten im Wasserbad aufgetaut (37°C, 30 Sek.) und zu 3 ml vorgewärmtem Vorverdünner (V1) gegeben.

2.6.1. Motilität

Zur Bestimmung der Motilität im aufgetauten Samen (Auftaurate) wurde wie unter 2.5.4 vorgegangen.

2.6.2. Vitalität

Zur Bestimmung der strukturellen Membranintegrität wurde eine DNA-Doppelfärbung durchgeführt (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, Molecular Probes Europe, Leiden, NL). Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-14 durchdringt die Zellmembran und bindet sich an die DNA lebender und toter Zellen. Der zweite Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) kann die Plasmamembran lebender Zellen nicht penetrieren und färbt daher nur tote Zellen an (Garner et al., 1994). Durch die Kombination beider Farbstoffe lassen sich tote (PI) von lebenden Spermien (SYBR) unterscheiden.

SYBR-14 (Komponente A) wurde mit DMSO (100%) in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt (Komponente AL), während Propidiumjodid (Komponente B) in der von der Firma gelieferten Form verwendet wurde. Zwei μ l der Komponente AL wurden zu 1 ml verdünntem Samen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37°C wurden 5 μ l der Komponente B dazugegeben und während weiteren 5 Minuten inkubiert. Danach wurden zweimal je 5 μ l des gefärbten Samens auf einen Objektträger pipettiert, mit Deckgläser 24 x 24 mm versehen und bei 400facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Olympus BX50, U Plan Apo 40x/0.85 mit Fluoreszenzeinrichtung, Filtermodul FITC, Hochdruck-Hg-Lampe) untersucht. Über eine am Mikroskop angeschlossene Videokamera (Color CCD Camera, SANYO VCC-2972) konnten die emittierten Fluoreszenzen auf einen Monitor (SONY Trinitron Color Video Monitor, PVM-1440 QM) projiziert werden. Bei

Supprimé : Oregon

Supprimé : Haugland, 1996;

Supprimé : Thomas

Supprimé : 8

Supprimé :).

Supprimé : .

Supprimé : wurde

Supprimé : Form verwendet, wie sie

Supprimé : t

Supprimé : ir

Supprimé : Ein

Supprimé : 1

Supprimé : einer Samenmenge von

Supprimé : 5

Supprimé : 2

Supprimé :

einer Excitation durch sichtbares Licht (480 nm) liegen die maximalen Fluoreszenzemissionen für die Farbstoffe SYBR (grün) und PI (orange) bei Wellenlängen von 516 nm bzw. 617 nm.

Durch Verschieben des Objektträgers wurden verschiedene Bildsequenzen auf einer Videokassette aufgezeichnet. Mit abwischbaren Boardmarkern wurden pro Samenprobe mindestens 500 Spermien auf dem Monitor rot und grün markiert. Der prozentuale Anteil an grün fluoreszierenden Spermien wurde der Vitalität gleichgesetzt.

2.6.3. Hypoosmotischer Schwelltest (HOS)

Zur Ermittlung der funktionellen Membranintegrität wurde der hypoosmotische Schwelltest (HOS) durchgeführt. Intakte Membranen erlauben den Austausch von Ionen und Flüssigkeit zwischen intra- und extrazellulärem Raum. Werden Samenzellen in ein hypotones Milieu gegeben, schwellen sie bei intakter Membran aufgrund des Flüssigkeitseinstromes zur Erhaltung des osmotischen Gleichgewichtes an. Die Schwellung der Spermien ist durch typische morphologische Veränderungen des Spermenschwanzes (Aufrollen und Schlingenbildung) erkennbar.

Zur Durchführung des Tests wurden 100 µl des aufgetauten Samens zu 1 ml vorgewärmter (37°C) HOS-Lösung (s. Appendix) gegeben und während 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zwei Tropfen à je 5 µl wurden auf einen Objektträger gegeben, mit Deckgläser 24 × 24 mm versehen und bei 400facher Vergrößerung im Phasenkontrast untersucht. Nach Beurteilung von mindestens 200 Spermien wurde aufgrund der morphologischen

Supprimé : Die laufenden Videosequenzen wurden auf eine Videokassette aufgezeichnet. Dazu wurde am Mikroskop durch schnelles Drehen an der Mikrometerschraube die jeweilige Position des Objektträgers und damit die Einstellung immerzu geändert. Dies führt zu stärkerer Excitation und dadurch zu intensiverer Fluoreszenzemission. Das Aufzeichnen auf Videoband erlaubt ein Einfrieren der Bilder und somit eine Auszählung von Hand. Mit abwischbaren Boardmarkern wurden nun pro Samenprobe 500 Spermien auf dem Monitor rot und grün markiert. Der prozentuale Anteil an grün fluoreszierenden Spermien wurde der Vitalität gleichgesetzt. ¶

Mise en forme : Puces et numéros

Supprimé : Hypoosmolarität stest (HOST)

Veränderungen des Spermenschwanzes der prozentuale Anteil geschwollener (HOS-positiv) Spermien bestimmt (Jeyendran et al., 1984).

Mis en forme

Mis en forme

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 (random effect) 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.

Supprimé : In 1ml HOST-Lösung (auf 37°C vorgewärmt) wurden 100µl Samen gegeben. Bei 37°C wurden die Proben während 30 Minuten inkubiert (Caiza de la Cueva et al., 1996). 2 Tropfen zu 5µl wurden auf einen Objektträger gegeben, mit Deckgläser 24x24mm versehen und bei 400facher Vergrößerung untersucht. Pro Tropfen wurden jeweils 200 Spermien ausgezählt. Es gibt drei Gruppen sich verschieden verhaltender Spermien: <#>geschwollen-aktiv <#>geschwollen inaktiv <#>nicht geschwollen In dieser Studie wurde der Prozentsatz der geschwollen aktiven Spermien (HOST-aktive) bestimmt.

Blutentnahme

<#>Fruchtbarkeitsparameter

Stuten: Name, Besitzer, Alter, Status (mit / ohne Fohlen bei Fuss)

Diese Daten erhielten wir mit den Belegkarten

Belegungen: Datum, Zeit (in Zusammenarbeit mit den Hengsthaltern)

Anzahl Sprünge und Anzahl belegte Zyklen pro Hengst

Trächtigkeit Erstbelegungszeitpunkt und Nonreturn-Rate auf 30 Tage (in Zusammenarbeit mit den Hengsthaltern).

Mise en forme : Pucés et numéros

Mis en forme

Mis en forme

Mis en forme

3. ERGEBNISSE

3.1. Samenqualität im Frischsamen

3.1.1. Jahreszeitliche Schwankungen

Die während eines Jahres alle 2 Wochen erhobenen Qualitätsparameter im Frischsamen bei 10 Hengsten (26 Untersuchungen) sind in den Abbildungen 2-9 in Form von Boxplots graphisch dargestellt.

Während der ganzen Versuchsdauer schwankten die Medianwerte des Ejakulatvolumens zwischen 21 und 50 ml (Abb. 2), die der Spermiedichte zwischen 208 und 348 Mio. Spermien pro ml Ejakulat (Abb. 3) und die der Gesamtspermienzahl zwischen 7.3 und 10.6 Milliarden Spermien pro Gesamtejakulat (Abb. 4). Mittels multivariater Varianzanalyse konnten bei allen drei Parametern keine signifikanten ($P > 0.05$) Unterschiede (Tab. 2) beobachtet werden. Allerdings war eine deutliche Tendenz zu höheren Volumina und kleineren Dichten in den Sommermonaten Juni, Juli und August zu erkennen.

Bei allen übrigen Parametern (Abb. 5-9) variierten die Medianwerte der Motilität zwischen 60.4 und 85.8 %, beim Anteil morphologisch normaler Spermien zwischen 20.9 und 37.4 % und zwischen 49.5 und 68.6 % bei den Hauptdefekten. Bei den Akrosomdefekten und Kernvakuolen, die beide zu den Hauptdefekten gehören, schwankten die Medianwerte stets unterhalb von 10%. Alle letztgenannten Parameter zeigten jahreszeitlich signifikante ($P < 0.05$) Unterschiede (Tab. 2).

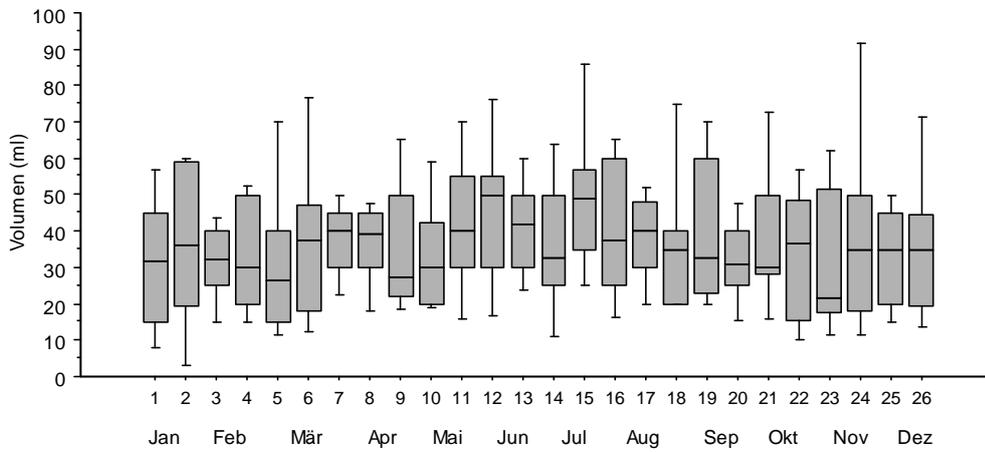


Abb. 2. Boxplot-Darstellung des Ejakulatvolumens bei 10 Warmbluthengsten während eines Jahres.

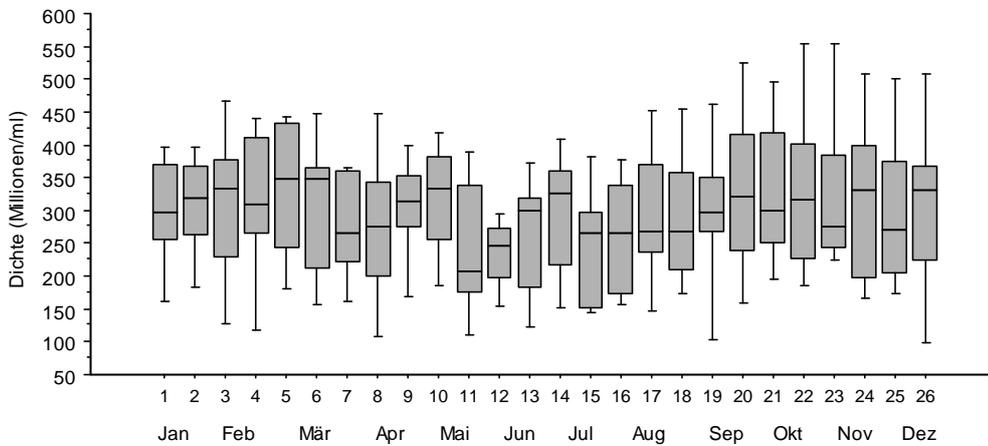


Abb. 3. Boxplot-Darstellung der Samendichte bei 10 Warmbluthengsten während eines Jahres.

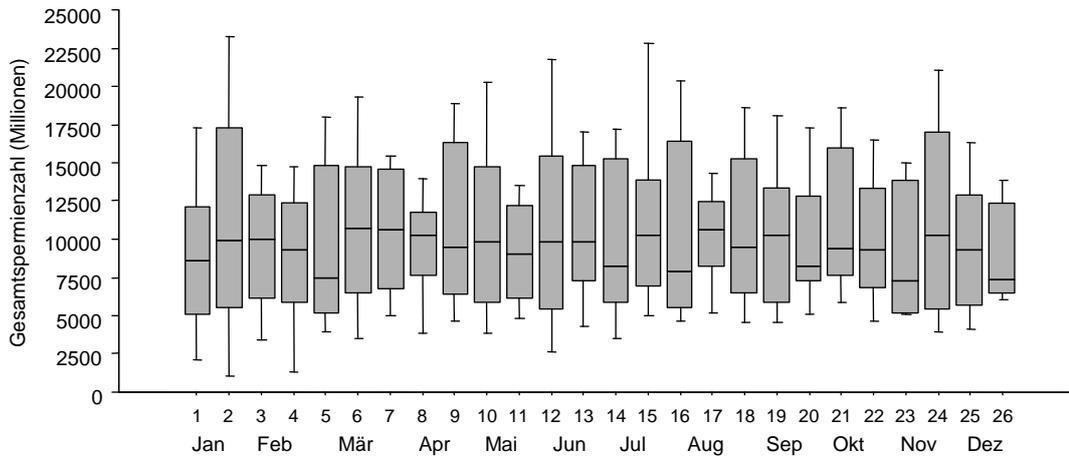


Abb. 4. Boxplot-Darstellung der Gesamtspermienzahl bei 10 Warmbluthengsten während eines Jahres.

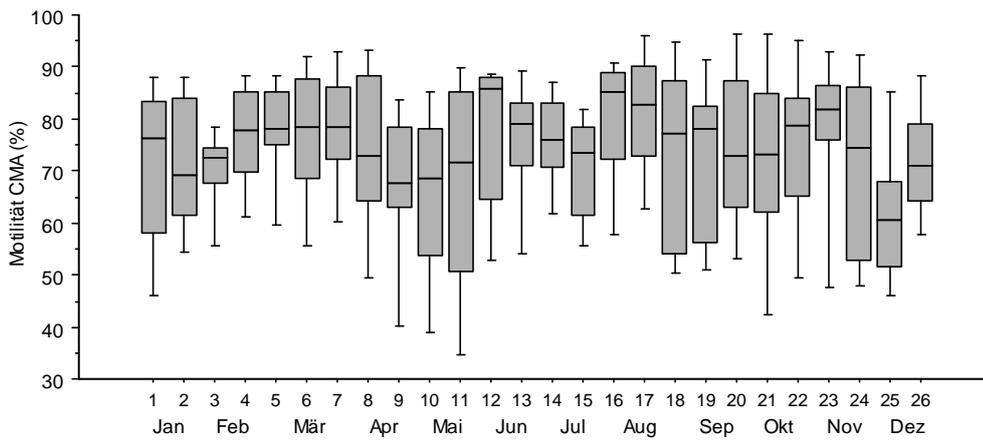


Abb. 5. Boxplot-Darstellung der progressiven Motilität (CMA) im Frischsamen bei 10 Warmbluthengsten während eines Jahres.

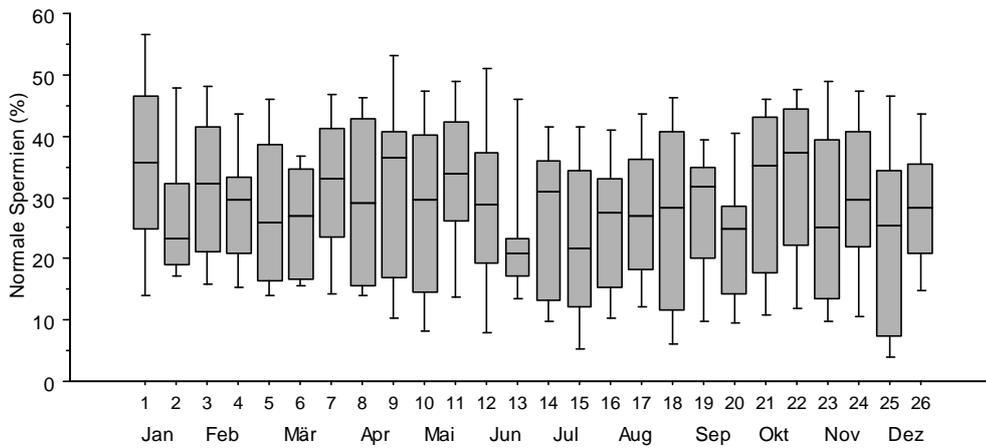


Abb. 6. Boxplot-Darstellung morphologisch normaler Spermien im Frischsamen bei 10 Warmbluthengsten während eines Jahres.

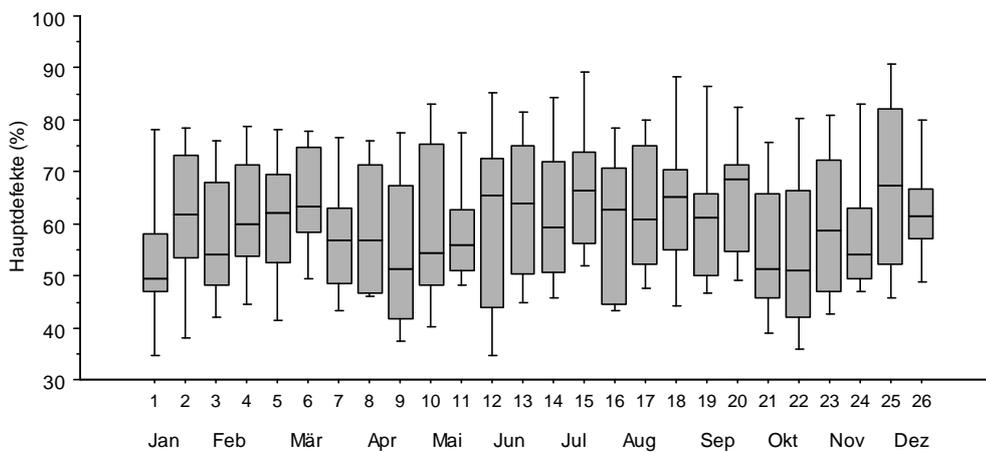


Abb. 7. Boxplot-Darstellung der Hauptdefekte im Frischsamen bei 10 Warmbluthengsten während eines Jahres.

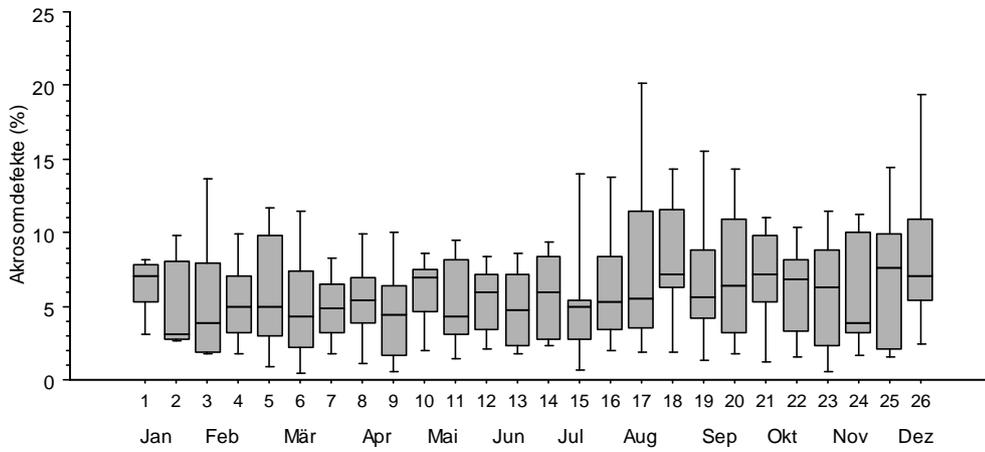


Abb. 8. Boxplot-Darstellung der Akrosomdefekte im Frischsamen bei 10 Warmblut-
hengsten während eines Jahres.

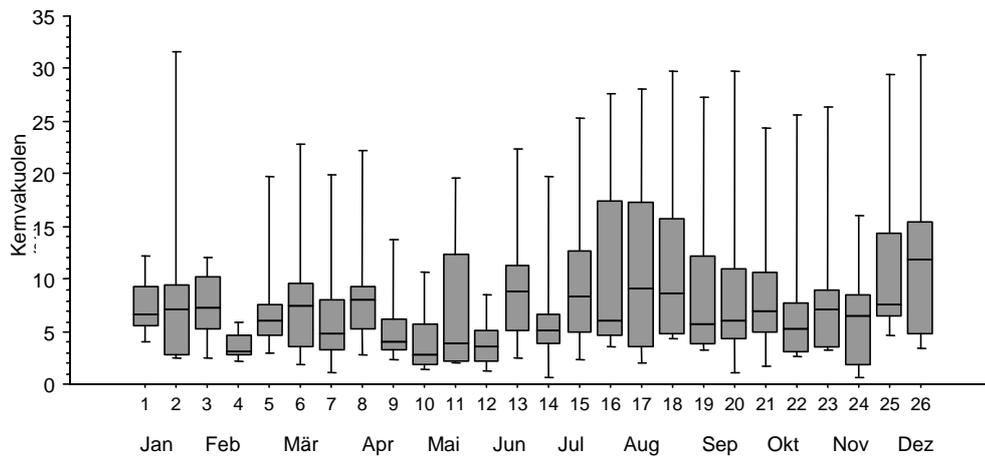


Abb. 9. Boxplot-Darstellung der Kernvakuolen im Frischsamen bei 10 Warmbluthengsten
während eines Jahres.

3.1.2. Individuelle Schwankungen

Die bei einzelnen Hengsten während eines Jahres im Frischsamen erhobenen Qualitätsparameter sind in den Abbildungen 10-17 als Boxplots graphisch dargestellt.

Die Medianwerte des Ejakulatvolumens einzelner Hengste schwankten zwischen 16.5 und 52.5 ml (Abb. 10), die der Spermiedichte zwischen 128 und 350 Mio. Spermien pro ml Ejakulat (Abb. 11), die der Gesamtspermienzahl zwischen 3.7 und 16.2 Milliarden Spermien (Abb. 12), die der Motilität zwischen 53.1 % und 89.9 % (Abb. 13), die des Anteils morphologisch normaler Spermien zwischen 10.9 und 44.4 % (Abb. 14) und die des Anteils an Hauptdefekten zwischen 44.6 und 84.3 % (Abb. 15).

Aus den Abbildungen 11 und 17 ist ersichtlich, dass bezüglich Spermiedichte und Anteil Kernvakuolen die Unterschiede zwischen den einzelnen Hengsten mit nur einer Ausnahme gering sind.

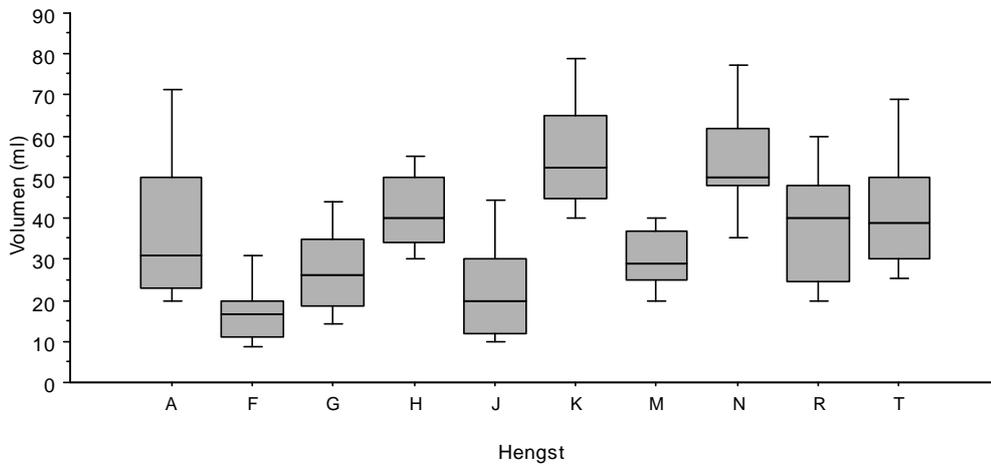


Abb.10. Boxplot-Darstellung des Ejakulatvolumens bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres (n=26).

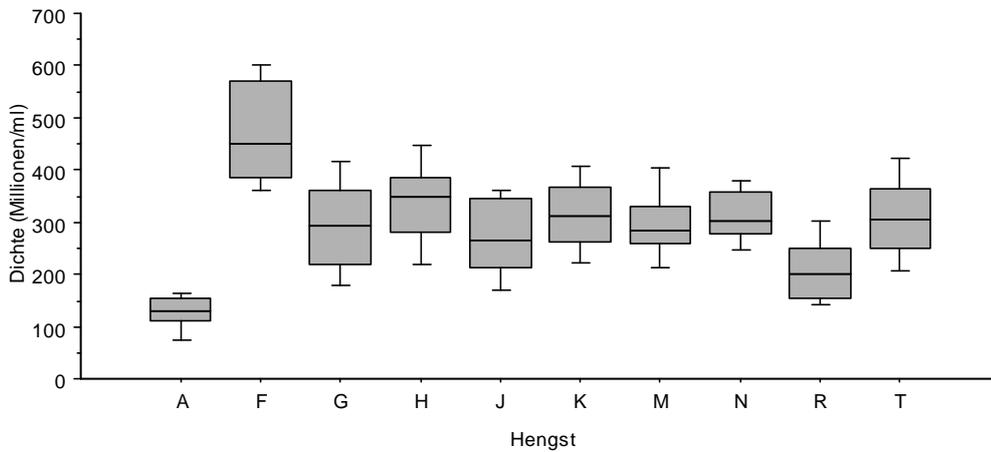


Abb. 11. Boxplot-Darstellung der Samendichte bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres (n=26).

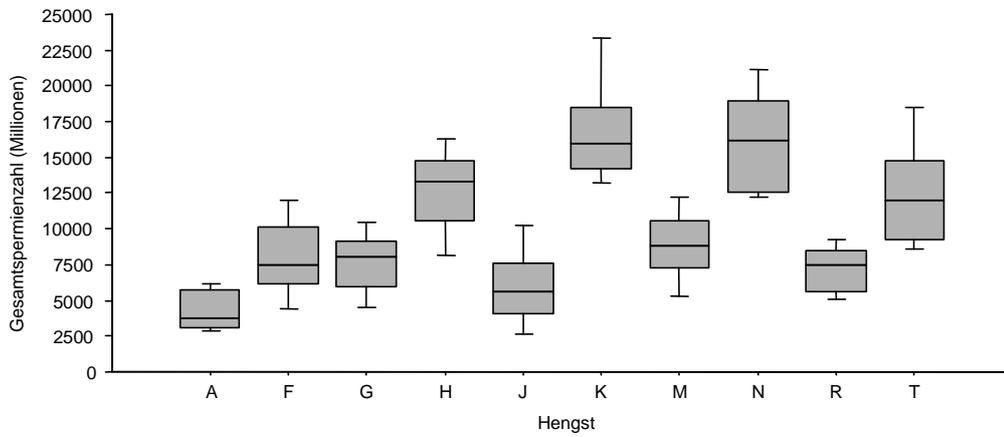


Abb. 12. Boxplot-Darstellung der Gesamtspermienzahl bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres (n=26).

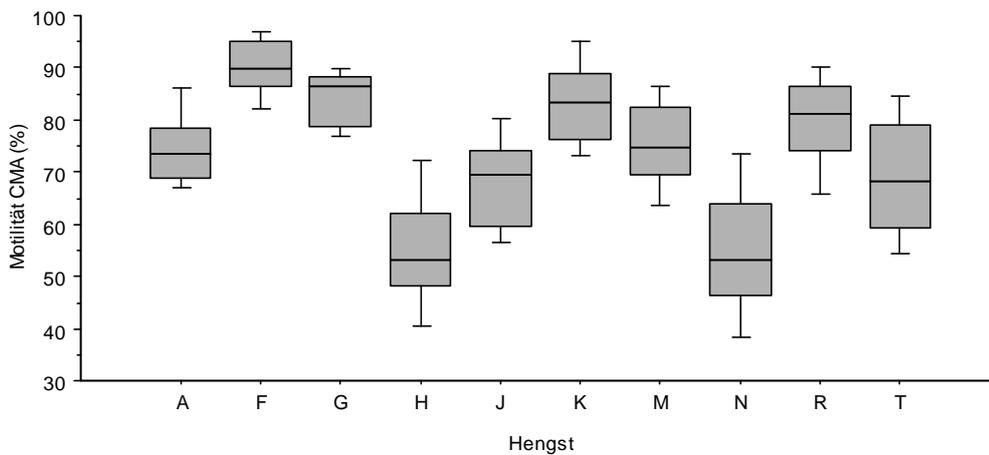


Abb. 13. Boxplot-Darstellung der progressiven Motilität (CMA) im Frischsamen bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres (n=26).

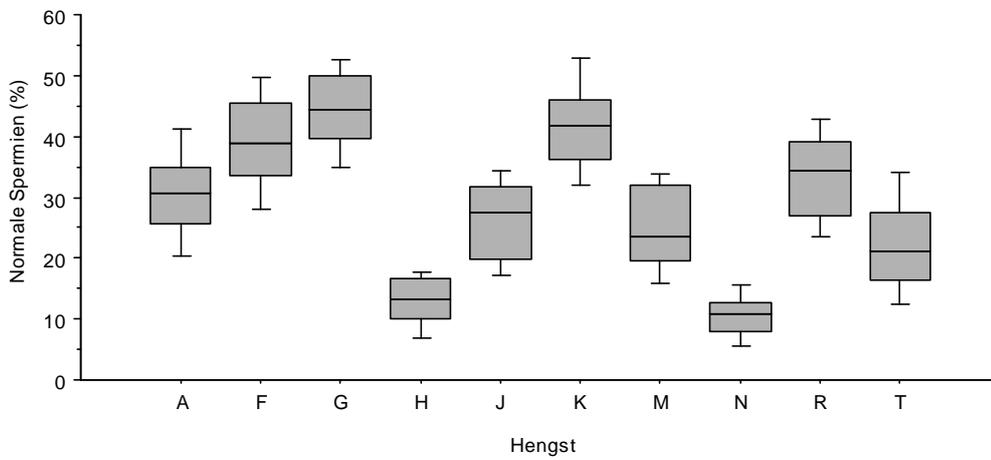


Abb. 14. Boxplot-Darstellung morphologisch normaler Spermien im Frischsamen bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres (n=26).

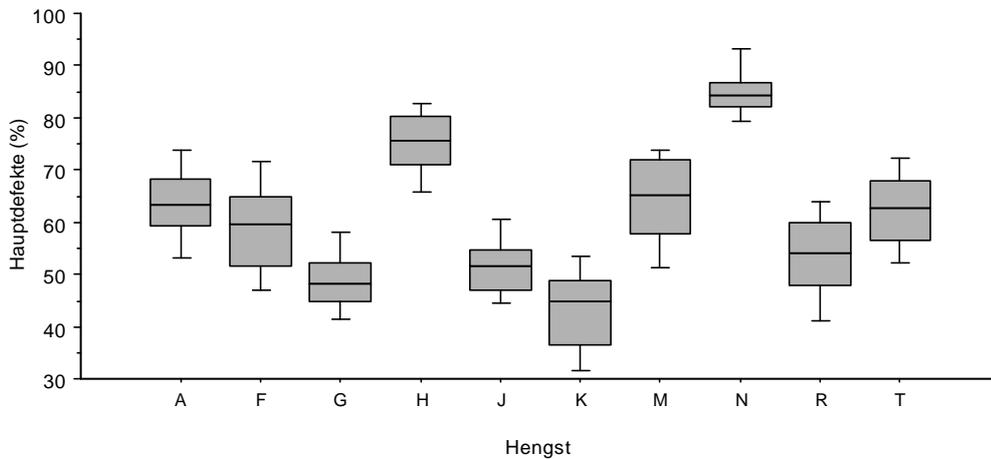


Abb. 15. Boxplot-Darstellung der Hauptdefekte im Frischsamen bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres (n=26).

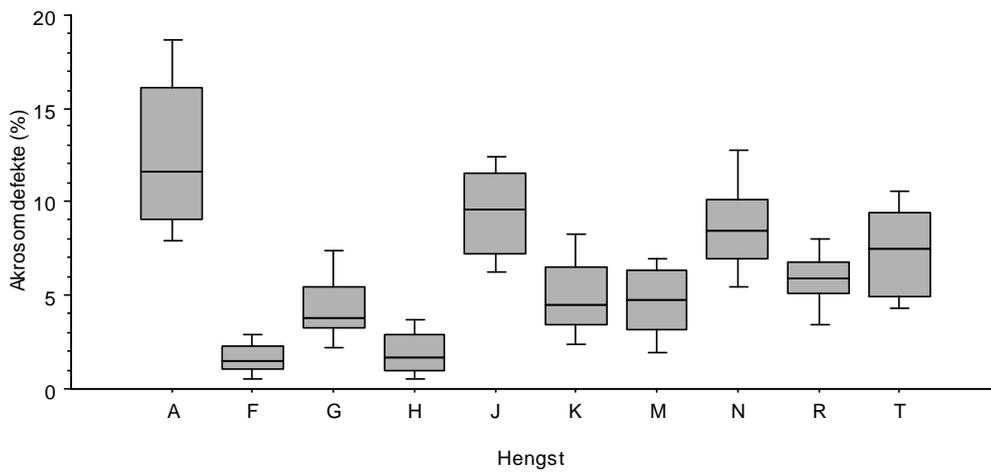


Abb. 16. Boxplot-Darstellung der Akrosomdefekte im Frischsamen bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres (n=26).

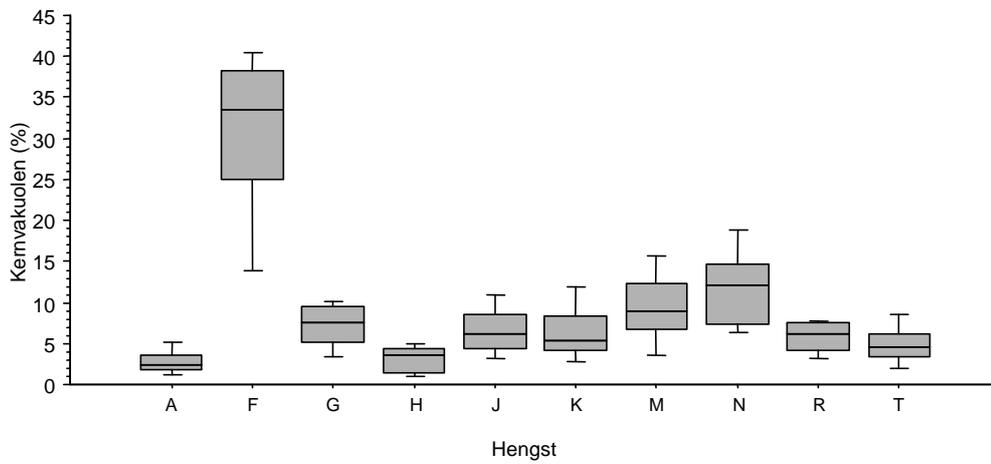


Abb. 17. Boxplot-Darstellung der Kernvakuolen im Frischsamen bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres (n=26).

3.1.3. Einfluss von Hengst und Zeitpunkt

Die Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses Zeitpunkt der Samengewinnung (P-Zeitpunkt) und Hengst (P-Hengst) auf die Samenqualität sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Daraus ist klar ersichtlich, dass alle Parameter mit Ausnahme von Volumen, Spermiedichte und Gesamtspermienzahl (P-Zeitpunkt > 0.05) während der Untersuchungszeit eines Jahres signifikante Unterschiede aufweisen. Der Einfluss des Hengstes (Individualität) auf alle Samenqualitätsparameter ist hochsignifikant ($P < 0.0001$).

Tab. 2. Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse (P-Werte) für die beiden Einflussfaktoren Hengst und Zeitpunkt der Samengewinnung auf die Qualität des Frischsamens bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres.

Parameter	P-Hengst	P-Zeitpunkt
Volumen	< 0.0001	0.5805
Spermiedichte	< 0.0001	0.2552
Gesamtspermienzahl	< 0.0001	0.6187
Motilität CMA	< 0.0001	0.0005
Normale Spermien	< 0.0001	0.0005
Hauptdefekte	< 0.0001	< 0.0001
Akrosomdefekte	< 0.0001	0.0069
Kernvakuolen	< 0.0001	< 0.0001

3.2. Samenqualität im aufgetauten Samen

3.2.1. Jahreszeitliche Schwankungen

Die während eines Jahres alle zwei Wochen erhobenen Qualitätsparameter im aufgetauten Samen sind in den Abbildungen 18-21 in Form von Boxplots graphisch dargestellt. Während der ganzen Versuchsdauer schwankten die Medianwerte der Motilität zwischen 23.3 und 54.4 % (Abb. 18), die der HOS-positiven Spermien zwischen 33.8 und 57 % (Abb. 19) und die der Vitalität zwischen 49.9 und 63.1 % (Abb. 20).

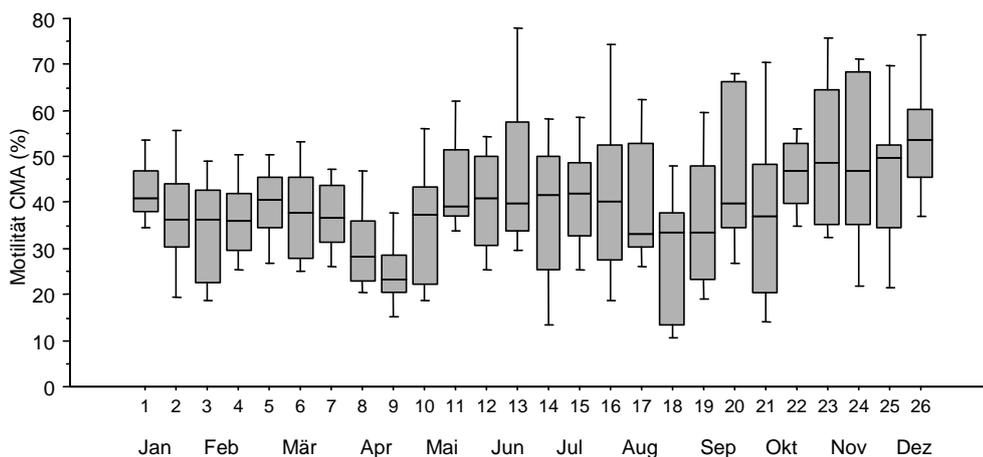


Abb. 18. Boxplot-Darstellung der progressiven Motilität (CMA) im aufgetauten Samen (Auftaurate) bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres.

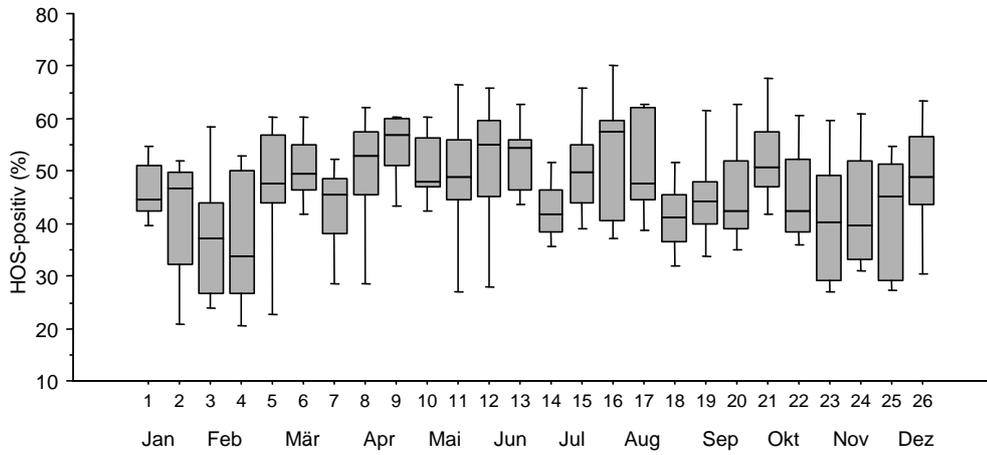


Abb. 19. Boxplot-Darstellung der HOS-positiven Spermien im aufgetauten Samen bei 10 Warmbluthengsten während eines Jahres.

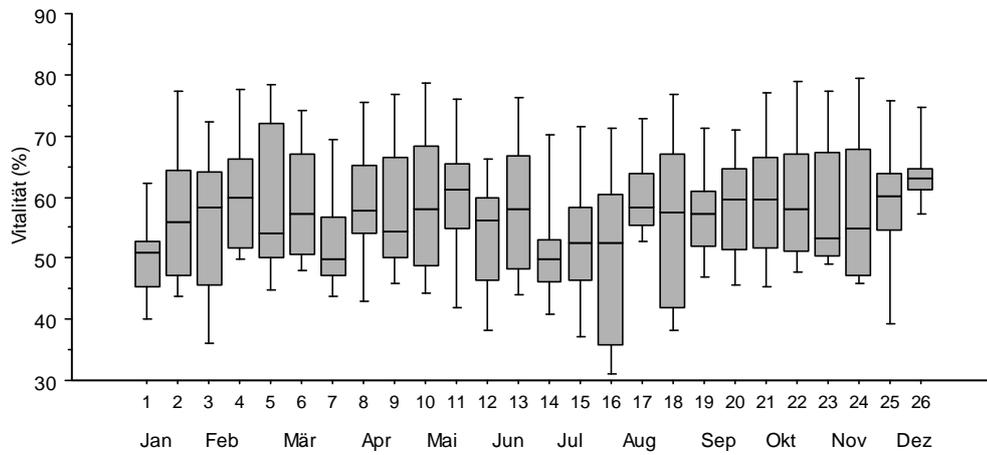


Abb. 20 Boxplot-Darstellung der Vitalität im aufgetauten Samen bei 10 Warmbluthengsten während der Dauer eines Jahres.

3.2.2. Individuelle Schwankungen

Die bei einzelnen Hengsten während eines Jahres erhobenen Qualitätsparameter im aufgetauten Samen sind in den Abbildungen 21-23 als Boxplots graphisch dargestellt.

Die Medianwerte der progressiven Motilität (CMA) einzelner Hengste schwankten zwischen 27.4 und 57.9 % (Abb. 21), die der HOS-positiven Spermien zwischen 38.8 und 56 % (Abb. 22) und die der Vitalität zwischen 47.1 und 81.3 % (Abb. 23).

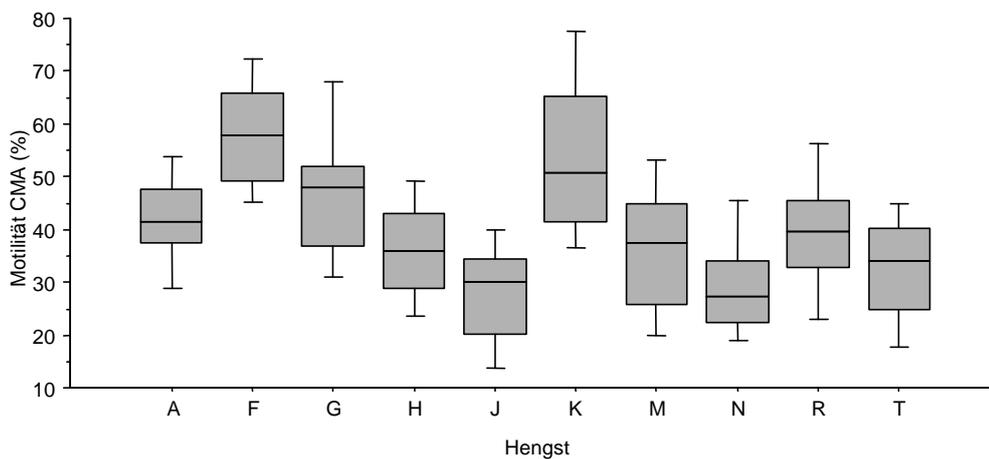


Abb. 21. Boxplot-Darstellung der progressiven Motilität (CMA) im aufgetauten Samen (Auftaufrate) bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres (n=26).

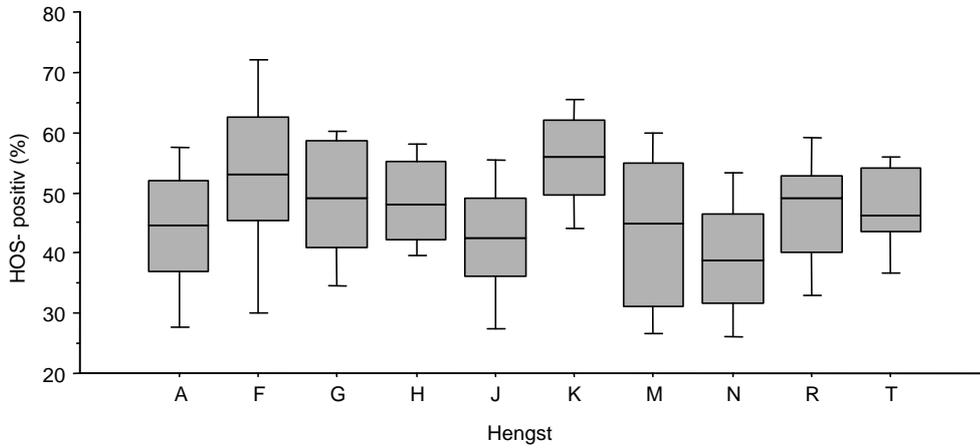


Abb. 22. Boxplot-Darstellung der HOS-positiven Spermien im aufgetauten Samen bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres (n=26).

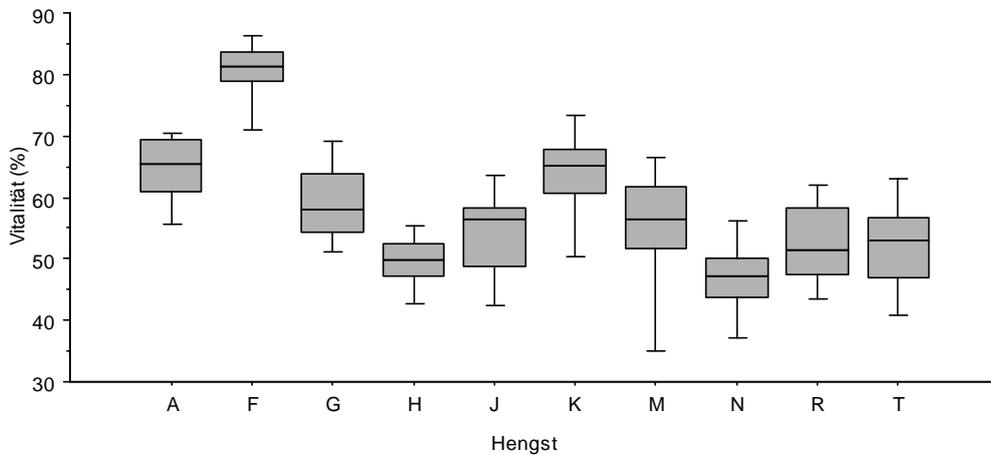


Abb. 23. Boxplot-Darstellung der Vitalität im aufgetauten Samen bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres (n=26).

3.2.3. Einfluss von Hengst und Zeitpunkt

Die Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses Zeitpunkt der Samengewinnung (P-Zeitpunkt) und Hengst (P-Hengst) auf die Samenqualität sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Daraus geht hervor, dass alle Parameter während der Untersuchungszeit eines Jahres signifikante Unterschiede aufweisen. Der Einfluss des Hengstes (Individualität) ist bei allen Samenqualitätsparametern hochsignifikant ($P < 0.0001$).

Tab. 3. Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse (P-Werte) für die beiden Einflussfaktoren Hengst und Zeitpunkt der Samengewinnung auf die Qualität des aufgetauten Samens bei 10 verschiedenen Warmbluthengsten während eines Jahres.

Parameter	P-Hengst	P-Zeitpunkt
Auftaurate CMA	< 0.0001	< 0.0001
Vitalität	< 0.0001	0.0250
HOS-positiv	< 0.0001	0.0002

3.3. Saisonale Unterschiede und Korrelationen zwischen den verschiedenen Samenqualitätsparametern

Um die einzelnen Samenqualitätsparameter auf saisonale Unterschiede zu prüfen, wurden dreimonatige Zeitabschnitte gebildet und die Herbst-, Winter-, Frühlings- und Sommerdaten miteinander verglichen (siehe Material und Methoden). Die Ergebnisse der Mittelwertsvergleiche der Qualitätsparameter im frischen und aufgetauten Samen bei 10 Hengsten zwischen Herbst, Winter, Frühling und Sommer sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Daraus kann entnommen werden, dass im Sommer die Frischsamenqualitätsparameter Volumen, Gesamtspermienzahl und Motilität signifikant ($P < 0.05$) höhere Werte zeigten als im Winter und die Dichte im Sommer signifikant ($P < 0.05$) niedriger war als in den übrigen Jahreszeiten.

Bei den morphologischen Untersuchungen konnten signifikant ($P < 0.05$) mehr normale Spermien im Herbst, Winter und Frühling als im Sommer beobachtet werden. Der Anteil an Hauptdefekten war im Sommer signifikant ($P < 0.05$) grösser als im Frühling und Herbst.

Im aufgetauten Samen erreichte die Motilität (Auftaurate) in den Herbstmonaten signifikant ($P < 0.05$) bessere Werte als im Frühling bzw. Sommer und die Vitalität war im Sommer signifikant ($P < 0.05$) tiefer als in den übrigen Jahreszeiten. Beim HOS-Test war der Anteil geschwollener Spermien im Winter deutlich ($P < 0.05$) geringer als im Frühling, Sommer und Herbst.

Tab. 4. Mittelwerte ($\bar{x} \pm$ Standardfehler) der verschiedenen Samenqualitätsparameter bei 10 Warmbluthengsten im Herbst, Winter, Frühling und Sommer.

Parameter	Herbst ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)	Winter ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)	Frühling ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)	Sommer ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)
Volumen (ml)	36.3 ^a ±2.0	33.9 ^a ±2.0	36.8 ^{ab} ±1.8	41.2 ^b ±1.8
Dichte (Mio/ml)	323.1 ^a ±9.7	305.2 ^{ab} ±9.6	293.8 ^b ±8.6	270.0 ^c ±8.6
Gesamtspermienzahl (Millionen)	10450.2 ^{ab} ±412.1	9512.2 ^a ±408.0	10118.1 ^{ab} ±367.1	10584.0 ^b ±367.1
Motilität Frischsamen (%)	74.1 ^{ab} ±1.3	70.2 ^c ±1.3	72.0 ^{ac} ±1.2	75.9 ^b ±1.2
Motilität aufgetauter Samen (%)	43.3 ^a ±1.6	42.4 ^{ac} ±1.5	35.7 ^b ±1.4	39.9 ^c ±1.4
Vitalität (%)	58.9 ^a ±1.0	58.3 ^a ±1.0	58.1 ^a ±0.9	55.0 ^b ±0.9
HOS-positiv (%)	45.8 ^a ±1.4	42.2 ^b ±1.4	49.0 ^a ±1.2	48.9 ^a ±1.2
Normale Spermien (%)	29.4 ^a ±1.0	28.9 ^a ±1.0	29.9 ^a ±0.9	26.1 ^b ±0.9
Hauptdefekte (%)	58.9 ^a ±1.0	61.0 ^{ab} ±1.0	59.3 ^a ±0.9	63.4 ^b ±0.9
Akrosomdefekte (%)	6.6 ^a ±0.3	6.4 ^a ±0.3	5.3 ^b ±0.3	6.4 ^a ±0.3
Kernvakuolen (%)	9.3 ^a ±0.6	8.7 ^{ab} ±0.6	7.5 ^b ±0.5	9.8 ^a ±0.5

^{abc}Mittelwerte mit unterschiedlichen Indizes sind signifikant verschieden ($P < 0.05$)

In Tabelle 5 sind die Korrelationen zwischen den verschiedenen Samenqualitätsparametern angegeben. Hohe gegenseitige Abhängigkeiten zeigen Volumen und Gesamtspermienzahl, subjektive und objektive Motilität, die Motilität und der Anteil normaler Spermien, die Motilität des aufgetauten Samens und die Vitalität sowie der Anteil normaler Spermien und die Vitalität. Eine geringe Korrelation ($r = 0.31$) konnte zwischen HOS-positiven Spermien und der Vitalität gefunden werden.

Tab. 5. Korrelationen zwischen verschiedenen Samenqualitätsparametern.

Volumen	1.000											
Dichte	-0.4050	1.000										
Gesamtspermienzahl	0.7011	0.2603	1.000									
Motilität subjektiv	-0.3123	0.0997	-0.3182	1.000								
Motilität CMA	-0.3050	0.1335	-0.2850	0.9440	1.000							
Motilität im aufgetauten Samen CMA	-0.0917	0.1193	-0.1089	0.3993	0.4513	1.000						
Vitalität	-0.2971	0.1975	-0.2874	0.4960	0.4883	0.5627	1.000					
HOS	-0.0425	0.1069	0.0501	0.2047	0.2100	0.3102	0.3123	1.000				
Normale Spermien	-0.1927	-0.0263	-0.2688	0.6173	0.6406	0.4564	0.5804	0.3145	1.000			
Hauptdefekte	0.1355	0.0607	0.1931	-0.5196	-0.5368	-0.2479	-0.3577	-0.2695	-0.8664	1.000		
Akrosomdefekte	0.1200	-0.4309	-0.1557	-0.1051	-0.1485	-0.2352	-0.1452	-0.2483	-0.1793	0.1365	1.000	
Kernvakuolen	-0.2581	0.4897	-0.0534	0.2772	0.2874	0.3394	0.4581	0.1166	0.0960	0.1215	-0.2240	1.000
	Volumen	Dichte	Gesamt- spermienzahl	Motilität subjektiv	Motilität CMA	Motilität im aufgetauten Samen CMA	Vitalität	HOS	Normale Spermien	Hauptdefekte	Akrosomdefekte	Kernvakuolen

4. DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass alle Qualitätsparameter sowohl im Frischsamen wie auch im aufgetauten Gefriersamen im Verlaufe eines Jahres deutliche Schwankungen aufweisen. Werden die einzelnen im Abstand von 2 Wochen erhobenen Werte zu 3-monatigen Jahreszeiten (Herbst, Winter, Frühling, Sommer) zusammengefasst und miteinander verglichen, können bei allen untersuchten Parametern signifikante saisonale Unterschiede festgestellt werden.

Die Gesamtspermienzahl und die Samendichte sind wichtige Faktoren bei der Produktion von Gefriersamen. Eine hohe Spermienausbeute pro Ejakulat senkt einerseits die Produktionskosten pro Besamungsdosis und andererseits ist bekannt (Graham, 1996; Samper und Morris, 1998), dass sich Ejakulate mit hoher Samendichte zur Kryokonservierung besser eignen als solche mit einer geringen Spermienzahl. Hohe Gesamtspermienzahlen wurden bei unseren Hengsten im Sommer und Herbst beobachtet, wobei die Werte im Sommer signifikant höher waren als im Winter. Dies entspricht den Ergebnissen von Picket (1976) und Jasko et al. (1991), welche die höchsten Werte im Juli bzw. August und die niedrigsten im Januar bzw. Dezember fanden. Hingegen konnten Magistrini et al. (1987) in ihren Untersuchungen kein deutliches saisonales Muster der Gesamtspermienzahl feststellen.

Im Bezug auf die Samendichte zeigten unsere Hengste, analog zu den Befunden von Magistrini et al. (1987), höchste Werte im Herbst und tiefste im Sommer. Zu gegenteiligen Ergebnissen kamen jedoch Picket et al. (1976) sowie Jasko et al. (1991), welche die höchste Samendichte im August und die niedrigste im Dezember fanden. Wie schon in früheren Untersuchungen beschrieben (Picket et al., 1976; Magistrini et al., 1987), verhielt sich das

gelfreie Volumen umgekehrt zur Dichte und war im Sommer signifikant höher als im Winter. Magistrini et al. (1987) beobachteten höchste Volumenwerte im Frühling, während Picket et al. (1976) und Jasko et al. (1991) höchste Werte im July bzw. März und tiefste im August bzw. Dezember registrierten. Diese teilweise voneinander abweichenden Ergebnisse dürften einerseits auf der unterschiedlichen geographische Lage, andererseits auf Abweichungen in der Absamungsfrequenz beruhen. Die von uns während der Sommermonate beobachtete Zunahme der Gesamtspermienzahl und des Volumens kann auf den photoperiodischen Effekt zurückgeführt werden. Beim Pferd wird mit zunehmender Tageslichtdauer die endokrine Aktivität der Geschlechtsorgane (Harris et al., 1982; Johnson und Thompson, 1983; Hoffmann et al., 1999) sowie die Sekretion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen stimuliert. Nach Untersuchungen von Johnson (1985, 1991) ist die erhöhte Spermienproduktion mit einer signifikanten Zunahme der Spermatogonienzahl während der Zuchtsaison verbunden.

Der Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien im Ejakulat ist neben der Gesamtspermienzahl und der Spermienmorphologie ein wichtiger Faktor zur Beurteilung der Zuchttauglichkeit (Hurtgen, 1992). So ist bekannt (Jasko et al., 1992), dass die Spermienmotilität von Hengsten mit reduzierter Fruchtbarkeit signifikant geringer ist als bei fertilen Hengsten. Die progressive Motilität im Frischsamen zeigte in unseren Untersuchungen signifikant höhere Werte im Sommer und Herbst als im Winter. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen von Magistrini et al. (1987) überein, nicht aber mit denjenigen von Picket et al. (1976) sowie Jasko et al. (1992), die keine saisonalen Unterschiede bzw. lediglich eine Tendenz zu schlechteren Motilitäten in den Wintermonaten beobachteten. Die Annahme, dass die Vorwärtsbeweglichkeit während der natürlichen Decksaison (bei uns im

Sommer) am höchsten ist, liess sich in unseren Untersuchungen bestätigen. In diesem Zusammenhang spielt auch der Einfluss des Seminalplasmas eine wichtige Rolle, dessen Zusammensetzung ebenfalls saisonale Schwankungen aufweist (Gebauer et al., 1976). Zudem berichteten Picket et al. (1975), dass die Spermienmotilität sowohl durch zu hohe wie auch zu geringe Mengen an Seminalplasma negativ beeinflusst werden kann.

Die am fixierten Frischsamen durchgeführten morphologischen Untersuchungen haben gezeigt, dass der Anteil morphologisch normaler Spermien im Sommer signifikant geringer war als in den übrigen Jahreszeiten und im Sommer deutlich mehr Hauptdefekte auftraten als im Frühling und Herbst. Klare Angaben über saisonale Schwankungen der Spermienmorphologie bei Hengsten sind in der Literatur kaum vorhanden. Lediglich Van der Holst (1975) berichtete, dass Spermienabnormalitäten während der Zuchtsaion (März bis August) weniger häufig auftraten als in den Herbst- und Wintermonaten. Über Zusammenhänge zwischen Morphologie und Fruchtbarkeit liegen Ergebnisse von Jasko et al. (1990) sowie Love et al. (2000) vor, 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 viele Defekte zu kompensieren vermag. Wird die Samendosis hingegen reduziert, wie dies im Rahmen der künstlichen Besamung angestrebt wird, kann sich die Trächtigkeitsrate pro Zyklus deutlich verschlechtern.

Ähnlich wie im Frischsamen konnten wir auch im aufgetauten Samen bei allen untersuchten Parametern jahreszeitliche Schwankungen feststellen. Ein

deutlich saisonales Muster zeigte die Vorwärtsbeweglichkeit, die als wichtigstes Qualitätskriterium nach dem Auftauen gilt. Höchste Werte wurden im Herbst und Winter gefunden, die tiefsten im Frühling. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen von Magistrini et al. (1987), dass der im Winter gefrorene Samen nach dem Auftauen eine bessere Motilität zeigte als der im Sommer gefrorene, obwohl die Motilität des Frischsamens im Sommer höher war als im Winter. Als mögliche Ursachen für die widersprüchlichen Ergebnisse zwischen der Motilität im frischem und aufgetautem Samen kommen saisonale Veränderungen in Menge und Zusammensetzung des Seminalplasmas sowie die damit verbundene Kryokonservierbarkeit (Picket et al., 1975; Gebauer et al., 1976) in Frage.

Zur Beurteilung der Vitalität (strukturelle Intaktheit der Zellmembran) aufgetauter Spermien, haben wir eine DNA-Doppelfärbung mit SYBR-14 und PI vorgenommen. Hohe Werte fanden wir im Herbst, Winter und Frühling, die schlechtesten im Sommer, obwohl hier die Vorwärtsbeweglichkeit im Frischsamen am höchsten war. Dies deutet darauf hin, dass die Kryokonservierung in den Sommermonaten zu einem erhöhten Anteil membrangeschädigter Spermien geführt hat, vermutlich wie bei der Motilität, als Folge saisonal bedingter Veränderungen in Menge und Zusammensetzung des Seminalplasmas (Gebauer et al., 1976).

Der hypoosmotische Schwelltest (HOS-Test) wurde zur Beurteilung der funktionellen Membranintegrität aufgetauter Samenzellen durchgeführt. Der Anteil an HOS-positiven Spermien war im Winter signifikant geringer als in den übrigen Jahreszeiten und zeigte eine Korrelation zur Motilität bzw. Vitalität im aufgetauten Samen (für beide $r = 0.31$).

Beim Hengst wurde der HOS-Test von verschiedenen Autoren sowohl im Frischsamen (Van Buiten et al., 1989; Caiza del la Cueva, 1997; Neild et al., 1999; Neild et al., 2000; Nie und Wenzel, 2001) als auch im aufgetauten Samen (Van Buiten et al., 1989; Neild et al., 1999) durchgeführt, wobei die Zusammensetzung der Testlösung nicht standardisiert waren. Die von uns verwendete HOS-Lösung stützte sich auf eine für Humanspermien etablierte Fruktose-Natriumzitratlösung (Jejendran et al., 1984) mit einer Osmolarität von 100 mOsm/L. Mit dieser Lösung, die auch für aufgetaute Bullen- (Correra und Zavos, 1994; Revell und Mrode, 1994) und Hengstspermien (Nie und Wenzel, 2001) getestet wurde, schwankten die saisonalen Mittelwerte zwischen 42% (Winter) und 49 % (Frühling). Diese Zahlen sind deutlich höher als diejenigen anderer Autoren (Van Buiten et al., 1989; Neild et al., 1999), die mit einer Laktoselösung von 150 mOsmol und 50 mOsmol pro Liter Werte von 36.4% bzw. 30.2% fanden. Aufgrund der unterschiedlichen Samenqualität und der verschiedenen HOS-Lösungen können die einzelnen Ergebnisse kaum miteinander verglichen werden.

Die Bedeutung des HOS-Tests für die Beurteilung der Hengstsamenqualität ist noch unklar. Neild et al. (2000) berichteten über eine geringe Abhängigkeit ($r = -0.40$) zwischen dem Anteil geschwollener Spermien im Frischsamen und der Anzahl Belegungen pro Trächtigkeit. Deshalb könnte der HOS-Test eine wertvolle Ergänzung zur Bestimmung der Samenqualität sein.

Neben der Photoperiodizität wird die Samenqualität auch entscheidend von der Individualität der Hengste beeinflusst. Dies geht deutlich aus den Tabellen 2 und 3 hervor, indem der Faktor Hengst auf alle untersuchten Qualitätsparameter einen deutlich stärkeren Einfluss ausübte als der Zeitpunkt der Samengewinnung. Diese Beobachtung, die mit den Ergebnissen von Magistrini et al. (1987) übereinstimmt weist darauf hin, dass

die Hengste für einen erfolgreichen KB-Einsatz vorgängig individuell geprüft werden sollten. Weiter soll auch die Rasse die Samenqualität entscheidend beeinflussen (Colenbrander et al., 1992; Dowsett und Knott, 1996). In unserer Studie können wir jedoch rassenbedingte Unterschiede ausschliessen, da allein Schweizer Warmbluthengste untersucht wurden. Inwieweit saisonale Veränderungen der Samenqualität von der Rasse abhängig sind, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Unter Berücksichtigung der saisonalen Schwankungen der von uns erhobenen Qualitätsparameter sowohl im Frischsamen wie auch im aufgetauten Samen, lieferten die im Herbst gewonnenen und eingefrorenen Ejakulate die beste Qualität. Da in der Literatur verschiedene, zum Teile stark voneinander abweichende Ergebnisse publiziert sind, erscheint eine allgemeingültige Aussage über das saisonale Muster der Samenqualität beim Hengst schwierig. Die unterschiedlichen Versuchsanordnungen machen aber deutlich, dass neben Rasse, Fütterung und Haltung besonders die Individualität der einzelnen Hengste aber auch die Saisonalität auf die Gefriertauglichkeit des Samens grossen Einfluss haben.

Aufgrund unserer Studie kann gefolgert werden, dass sich die Herbstmonate (Oktober, November, Dezember) für die Gefriersamenproduktion am besten eignen und deshalb mit dem Tiefgefrieren von Hengstsamen trotz organisatorischer Engpässe, wenn möglich schon im September begonnen werden sollte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Studie war es, die jahreszeitlichen Schwankungen der Samenqualität bei Schweizer Warmbluthengsten zu untersuchen und den optimalen Zeitpunkt für die Kryokonservierung festzulegen. Dazu wurden Ejakulate von 10 angehörten Hengsten alle 2 Wochen während eines Jahres (Januar bis Dezember 1999) am Nationalgestüt in Avenches gewonnen, untersucht und kryokonserviert.

Zur Berechnung saisonaler Unterschiede wurden je drei Monate des Jahres als Herbst (September, Oktober, November), Winter (Dezember, Januar, Februar), Frühling (März, April, Mai) und Sommer (Juni, Juli, August) zusammengefasst. Von allen Ejakulaten wurden Volumen, Dichte, Motilität und die Morphologie (normale Spermien, Hauptdefekte, Kernvakuolen, Akrosomdefekte) bestimmt. Im aufgetauten Samen erfolgte die Beurteilung von Motilität, Vitalität (SYBR-14/PI) sowie funktioneller Membranintegrität (HOS-Test).

Alle von uns ermittelten Samenqualitätsparameter liessen signifikante saisonale Schwankungen erkennen. Ejakulatvolumen, Gesamtspermienzahl und Motilität im Frischsamen zeigten im Sommer signifikant ($P < 0.05$) höhere Werte als im Winter, während die Dichte in den Sommermonaten signifikant ($P < 0.05$) niedriger war als in den übrigen Jahreszeiten.

Bei der morphologischen Untersuchung zeigte sich, dass der Anteil morphologisch normaler Spermien im Sommer signifikant ($P < 0.05$) geringer war als in den übrigen Jahreszeiten und der Anteil an Hauptdefekten während der Sommermonate signifikant ($P < 0.05$) grösser war als im Frühling und Herbst.

Im aufgetauten Samen erreichte die Motilität in den Herbstmonaten signifikant ($P < 0.05$) bessere Werte als im Frühling und Sommer. Die Vitalitätswerte waren im Sommer signifikant ($P < 0.05$) schlechter als in den

übrigen Jahreszeiten. Der HOS-Test ergab im Winter signifikant ($P < 0.05$) mehr membrangeschädigte Spermien als im Frühling, Sommer und Herbst. Aufgrund der hohen Samendichte, der grossen Gesamtspermienzahl, der geringsten Anzahl an Hauptdefekten sowie der besten Motilität und Vitalität im aufgetauten Samen empfehlen wir den Herbst (September, Oktober, November) als besten Zeitpunkt zur Kryokonservierung von Hengstsamen.

6. SUMMARY

The objective of this study was to investigate seasonal changes of stallion semen quality and to determine the best time for semen cryopreservation. Experiments were performed using 10 Swiss Warmblood stud stallions from the Swiss National Stud Farm in Avenches. Ejaculates were collected every 2 weeks during one year from January to December 1999 and the volume, concentration, motility and morphology (normal sperm, major defects, vacuoles and acrosome defects) determined. In all frozen-thawed semen samples the motility as well as the viability (fluorescence staining with propidium iodide/SYBR-14) and the hypoosmotic swelling test (HOS) were performed. To analyze 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 semen quality parameters showed a clear seasonal pattern. The volume, total sperm count and motility in fresh semen were significantly ($P < 0.05$) higher in summer than in winter, while sperm concentration was significantly lower in summer compared to the other seasons. Regarding morphology, normal sperm was significantly ($P < 0.05$) lower in summer than at any other time of the year and major defects showed higher ($P < 0.05$) values in summer than in spring and autumn.

In frozen-thawed semen samples motility was significantly ($P < 0.05$) improved when compared to spring and summer. Viability was lowest in summer and differed significantly ($P < 0.05$) from other seasons. The HOS test revealed significantly ($P < 0.05$) more membrane damaged spermatozoa in winter than during spring, summer or autumn.

Our results demonstrate that significant seasonal differences of semen quality parameters in fresh and frozen-thawed semen do occur and that deep freezing of stallion semen should be done in autumn during the months of September, October and November.

7. APPENDIX

Vorverdünner V1

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

1. Herstellung der Elektrolytlösung:

<u>Glukose wasserfrei (C₆H₁₂O₆)</u>	<u>50 g</u>
<u>Laktose-Monohydrat (C₁₂H₂₂O₁₁, H₂O)</u>	<u>3 g</u>
<u>Raffinose-Pentahydrat (C₁₈H₃₂O₁₆, 5H₂O)</u>	<u>3 g</u>
<u>Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C₆H₅Na₃O₇, 2 H₂O)</u>	<u>0.49 g</u>
<u>Tri-Kaliumcitrat-Monohydrat (C₆H₅K₃O₇, H₂O)</u>	<u>0.82 g</u>
<u>Hepes: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2Ethansulfonsäure</u> <u>(C₈H₁₈N₂O₄S)</u>	<u>9.25 g</u>

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.

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

Mis en forme

Mis en forme

Supprimé : 2

Supprimé : 4

Endverdünner V2

Herstellung von 100ml Endverdünner:

Lactoselösung 11%	75ml
(Lactose (C ₆ H ₁₂ O ₁₁ , H ₂ O) in Aqua ad injectionem aufgelöst)	
Eigelb	20ml
Glycerin wasserfrei, rein (C ₃ H ₈ O ₃)	5ml

Mis en forme

Hancock-Lösung

di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O)	6.19 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	2.54 g
Natriumchlorid (NaCl)	5.41 g
Formaldehydlösung 36-37%	125 ml
Aqua bidest.	Ad 1'000 ml

Supprimé : ¶
<#>V2 = Endverdünner,
Avenches¶
Lactoselösung . . . 11%¶
C₁₂H₂₂O₁₁, H₂O¶
Eigelb . . . 20%¶
Glycerin . . . 5%¶

Mis en forme

HOS-Lösung

Fructose	9.0 g
Trisodium Citrat	4.9 g
Aqua bidest.	1'000 ml
Osmolarität	100 mOsm/Liter

Supprimé : Lösungen¶
<#>Hancock-Lösung¶
di-Natriumhydrogenphosphat
Dihydrat (Na₂HPO₄ · 2 H₂O) . 6
g¶
Kaliumdihydrogenphosphat
(KH₂PO₄) 2.6 g¶
Natriumchlorid
(NaCl) 5.41 g¶
Formaldehydlösung 36-
37% 12.5 ml¶
Aqua bidest. ad
1'000 ml¶

Mise en forme : Pucés et
numéros

Mis en forme

SYBR-14-Lösung

SYBR-14	10µl
DMSO 99.8%	90µl

Mise en forme : Pucés et
numéros

8. LITERATURVERZEICHNIS

Amann RP, Picket BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J Equine Vet Sci 1987; 7: 145-173.

Mis en forme

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.

Byers SW, Dowsett KF, Glover TD. Seasonal and circadian changes of testosterone levels in peripheral blood plasma of stallions and their relation to semen quality. J Endocr 1983; 99: 141-150.

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.

Mis en forme

Supprimé : (1997)

Mis en forme

Supprimé : ¶
¶
Theriogenology 48: 531-536.¶

Mis en forme

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.

Supprimé : ..

Mis en forme

Supprimé : (1992)

Mis en forme

Mis en forme

Supprimé : .

Cochran JD, Amann RP, Froman DP, Pickett BW. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. Theriogenology 1984; 22: 25-38.

Mis en forme

Colenbrander B, Puyk H, Zandee AR, Parlevliet J. Evaluation of the stallion for breeding. *Acta Vet Scand* 1992; Suppl 88: 29-37.

Correa JR, Zavos PM. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the 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 assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J Androl* 1994; 15: 620-629.

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.

Gerlach T, Aurich EA. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram, and hamster. *Anim Reprod Sci* 2000; 58: 197-213.

Graham JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1996; 12: 131-147.

Mis en forme

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 the stallion for breeding soundness. Vet Clin North Am Equine Pract 1992; 8: 149-165.

Mis en forme

Institut du Cheval. Insemination Artificielle Equine. Guide Pratique, 2nd ed. Paris: Institut du Cheval 1996.

Irvine CHG, Alexander S. Importance of testicular hormones in maintaining the annual pattern of LH secretion in the male horse. J Reprod Fertil 1982; Suppl 32: 97-102.

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, 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.

Jasko DJ, Lein DH, and Foote RH. The reparability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion. Theriogenology 1991; 35: 317-327.

Mis en forme

Supprimé : ..

Mis en forme

Supprimé : (1991)

Mis en forme

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of 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. Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. *Biol Reprod* 1985; 32: 1181-1190.

Johnson L. Season 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.

Mis en forme

Nagata S, Tsunoda N, Nagamine N, Tanaka Y, Taniyama H, Taya K, Nambo Y, Watanake G. Testicular inhibin in the stallion: cellular source and seasonal changes in its secretion. *Biol Reprod* 1998; 59: 62-68.

Neild DM, Chaves MG, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 51: 721-727.

Neild DM, Weild DM, Chaves MG, Flores M, Mirgaya MH, Gonzalez E, Agüero A. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia* 2000; 32: 351-355.

Nie GJ, Wenzel JGW. Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology* 2001; 55: 1005-1018.

Pickett BW, Sullivan JJ, Byers WW, Pace MM, Remmenga EE. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertil Steril* 1975; 26: 167-174.

Supprimé : .

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. Cryopreservation of semen. In Mc Kinnon AO, Voss JL (eds), *Equine Reproduction* 1993: 769-789.

Mis en forme

Revell SG, 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. Equine Practice 1994; 41-43.

Samper JC. Stallion semen cryopreservation: Male factors affecting pregnancy rates. Proc society for Theriogenology, San Antonio, TX, 1995: 160-165.

Samper JC, Morris CA. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. Theriogenology 1998; 49: 895-903.

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

Mis en forme

Van Buiten A, Zhang JJ, Boyle MS. Integrity of plasma membrane of stallion spermatozoa before and after freezing. J Reprod Fertil 1989; Abstract series No 4: Abstr 18.

Van der Holst W. A study of the morphology of stallion semen during the breeding and non-breeding seasons. J Reprod Fertil 1975; Suppl. 23: 87-89.

Mis en forme

Supprimé : (1975)

Mis en forme

Supprimé : .

9. LEBENS LAUF

Karin Niederer

Geboren am 29. August 1973 in Grabs SG

Heimatort: Wolfhalden im Kanton AR

Supprimé : Stefan Bettschen

Supprimé : Geboren am 04.02.1970 in St. Gallen

Supprimé : Reichenbach i.K. (BE)

Supprimé : Primarschule Burgdorf

Mise en forme : Puces et numéros

Mise en forme : Puces et numéros

Supprimé : Sekundarschule Burgdorf

1981-87 Primarschule Buchs

1987-89 Sekundarschule Buchs

Supprimé : <#>Gymnasium Burgdorf¶¶

Mise en forme : Puces et numéros

1989-93 Kantonsschule Sargans

Supprimé : Kantonale Matur Typus C in Burgdorf

Mise en forme : Puces et numéros

1993 Maturität Typus E

Supprimé : Praktikum bei Dr.med.vet. H. Kilchenmann, Koppigen

1993-98 Studium der Veterinärmedizin an der Universität

Mise en forme : Puces et numéros

Bern

Supprimé : Sprachaufenthalt in England (Hampshire), arbeiten in einem Gestüt

1998 Schlussprüfung an der Universität Bern

Supprimé : ¶¶

Mise en forme : Puces et numéros

1999 Assistentenstelle an der Klinik des Nationalgestüts in Avenches und Dissertation

Supprimé : Studium der Veterinärmedizin Universität Bern

Supprimé : Staatsexamen II an der Universität Bern¶¶

¶¶ <#>Assistentenstelle bei Dr.med.vet. H. Kilchenmann, Gross- und Kleintierpraxis in Koppigen¶¶

2000

Assistentenstelle an der Ambulatorischen Klinik des Tierspitals Zürich

Supprimé : 8 .

Supprimé : Gestüts Avenches und Dissertation

10. DANKSAGUNGEN

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

Herrn Prof. Dr. R. Thun, Departement für Fortpflanzungskunde der Universität Zürich für die Überlassung des Themas, für die Hilfestellung beim Niederschreiben der Arbeit und die Übernahme des Referates.

Herrn Dr. F. Janett, Departement für Fortpflanzungskunde der Universität Zürich für die grosse Unterstützung, die fachliche Leitung und Betreuung der ganzen Arbeit und die Durchführung der morphologischen Untersuchungen.

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

Herrn Dr. P.A. Poncet, Direktor des Nationalgestüts für die Anstellung als Assistenztierärztin, für die Infrastruktur sowie zur Verfügungstellung der Hengste.

Herrn Dr. D. Burger, Reproduktionszentrum des Nationalgestüts für die Unterstützung und die Koordination der Arbeit.

Herrn Dr. M. Hässig, Institut für Fortpflanzungskunde der Universität Zürich für die Hilfsbereitschaft und die statistischen Auswertungen der Versuchsergebnisse.

Herrn ~~H. Schwab, W. Schwab und J.P. Duc~~, Mitarbeiter des Nationalgestütes Avenches, danke ich herzlich für ihre tatkräftige Mithilfe bei der Samengewinnung und Samenverarbeitung und ihrer Kollegialität.

Herrn S. Keo, Departement für Fortpflanzungskunde der Universität Zürich

Supprimé : H.

Supprimé :

Supprimé :

für die Mithilfe im Labor.

Supprimé : Allen Hengsthaltern für ihre Mitarbeit während der Untersuchungsphase.

Supprimé : lebenslauf¶
Stefan Bettschen¶
¶
Geboren am 04.02.1970 in St. Gallen¶
Heimatort: Reichenbach i.K. (BE)Um die Qualität des frisch gewonnenen Ejakulates zu prüfen, wurde es grobsinnlich (Menge, Farbe, Fremdpartikel) sowie mikroskopisch (Dichte, Massenbewegung, Motilität, direkte Morphologie) untersucht, wobei die in Tabelle 1 angegebenen¶
¶
Primarschule Burgdorf¶

Supprimé : 1981-83 .

Supprimé : Sekundarschule Burgdorf¶
Gymnasium Burgdorf¶
Kantonale Matur Typus C in Burgdorf¶
Praktikum bei Dr.med.vet. H. Kilchenmann,Koppigen¶
Sprachaufenthalt in England (Hampshire), arbeiten in einem Gestüt¶
Studium der Veterinärmedizin Universität Bern¶
Staatsexamen II an der Universität Bern¶
Assistentenstelle bei Dr.med.vet. H. Kilchenmann, Koppigen¶
1998 . Assistentenstelle an der Klinik des Eidg. Gestüts Avenches und Dissertation¶

Mise en forme : Puces et numéros

Von ursprünglich 113 Prüfstieren der Besamungsstation Bütschwil (SG) standen 78 Stiere der Rassen Schweizer Braunvieh, Holstein und Schweizer Fleckvieh im Alter zwischen 12 und 14 Monaten für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung. Die restlichen Tiere wurden aus Zuchttauglichkeitsgründen oder mangels ungenügender Paillettenzahl für das Projekt nicht berücksichtigt. Die Stiere wurden in den Stallungen der Besamungsstation Bütschwil in Einzelanbindung auf Stroh gehalten und erhielten täglich Heu, Mais und wenig Kraftfutter;

Samengewinnung

Alle Versuchstiere wurden zwei- bis dreimal in der Woche mittels künstlicher Vagina (Scheideninnentemperatur 40°C-42°C) abgesamt. Vor der Absamung wurden die Stiere im Sprungsaal sexuell stimuliert (sog. Leersprünge), wobei der Aufsprung in der Regel am....

Hengste durch Samenentnahmen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen entleert und ans Phantom gewöhnt. Abgesamt wurden alle Versuchstiere mittels einer künstlichen Scheide Modell „Avenches“, die auf 37°C temperiert war. Die sexuelle Stimulation erfolgte über eine ovariectomierte Freiburgerstute, die mittels Oestrogenen in Oestrus gebracht wurde. Auf den Hengststationen erfolgte die Absamung statt auf dem Phantom auf dieser Stute.

Phase 1: (14.10.1997 – 03.02.1998)

Ejakulate wurden in wöchentlichen Abständen mittels Phantom gewonnen, untersucht und kryokonserviert.

Phase 2: (17.03.1998 – 04.08.1998)

Die 15 beteiligten Hengste wurden auf den Stationen und im Gestüt mit Hilfe der immer gleichen, ovariectomierten Stute alle 4 Wochen abgesamt. Anschliessend wurden vor Ort die üblichen Spermaparameter untersucht. Zusätzlich wurden Blutproben gewonnen, welche am Tierspital Zürich auf den Testosterongehalt untersucht wurden.

Phase 3: (12.08.1998 – 01.09.1998)

Zu dieser Zeit befanden sich die Hengste im Eidgenössischen Gestüt und wurden 4 mal in wöchentlichen Abständen mittels Phantom abgesamt. Die Ejakulate wurden untersucht und kryokonserviert.

Phase 4: (22.09.1998)

Zum letzten Mal wurden die Hengste mittels Phantom abgesamt. Die Ejakulate wurden untersucht und zusätzlich wurden wiederum Blutproben gewonnen und untersucht.

Phase 1: (14.10.1997 – 03.02.1998)

Ejakulate wurden in wöchentlichen Abständen mittels Phantom gewonnen, untersucht und kryokonserviert.

Phase 2: (17.03.1998 – 04.08.1998)

Die 15 beteiligten Hengste wurden auf den Stationen und im Gestüt mit Hilfe der immer gleichen, ovariectomierten Stute alle 4 Wochen abgesamt. Anschliessend wurden vor Ort die üblichen Spermaparameter untersucht. Zusätzlich wurden Blutproben gewonnen, welche am Tierspital Zürich auf den Testosterongehalt untersucht wurden.

Phase 3: (12.08.1998 – 02.09.1998)

Zu dieser Zeit befanden sich die Hengste im Eidgenössischen Gestüt und wurden 4 mal in wöchentlichen Abständen mittels Phantom abgesamt. Die Ejakulate werden untersucht und kryokonserviert.

