Tiefgefrieren von Ebersperma : ein Vergleich zweier Methoden

Autor(en): **Schuler, D. / Küpfer, U. / Zimmermann, F.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **121 (1979)**

PDF erstellt am: **29.04.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-590584>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Tiefgefrieren von Ebersperma: Ein Vergleich zweier Methoden

von D. Schuler, U. Küpfer und F. Zimmermann¹

1. Einleitung

In den letzten Jahren wurden mehrere Methoden zum Tiefgefrieren (TG) von Ebersperma beschrieben (*Pursel und Johnson, 1975; Westendorf et al., 1975; Larsson et al., 1977; Paquignon und Courot, 1975*). Unterschiedliche Versuchsbedingungen verunmöglichen aber einen direkten Vergleich der Resultate. Aus diesem Grund wurde in einem Split-sample-Versuch die Methode von *Pursel und Johnson (1975)* mit einer leicht modifizierten Hülsenberger Pailletten-Methode (*Westendorf et al., 1975*) anhand von Labor- und Besamungsresultaten verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Tiermaterial

Von 4 Ebern des Basiszuchtbetriebes der Firma Optigal SA in Chesalles wurde in den Monaten Dezember 1977 bis Juni 1978 Sperma tiefgefroren und zur Besamung von 214 pluriparen Sauen desselben Betriebes verwendet. Diese Zuchttiere der Rasse Edelschwein werden einheitlich gehalten und gehören zu einer der Basisherden für ein Kreuzungsprogramm. Bedingt durch die einseitige Selektion auf hohe Mast- und Schlachtleistung sind die Fruchtbarkeitsergebnisse unterdurchschnittlich. Nach den bisherigen Erfahrungen in dem Zuchtbetrieb hat die künstliche Besamung mit Frischsperma im Vergleich mit der natürlichen Paarung keinen negativen Einfluss auf die Fruchtbarkeit.

2.2. Spermaverarbeitung

Von den 4 Ebern wurden je 11 Ejakulate mit der Handdruckmethode am Phantom gewonnen, sofort halbiert und nach den folgenden zwei Methoden tiefgefroren:

Methode A: nach *Pursel und Johnson (1975)* verarbeitet und in Form von Pellets tiefgefroren.

Methode B: Hülsenberger Pailletten-Verfahren nach *Westendorf et al. (1975)*, modifiziert: das Sperma wurde sofort mit «Kiew»-Hauptverdünner (*Haeger und Mäcke, 1971*) im Verhältnis 2:3 verdünnt und innert 6 Stunden auf 15 °C abgekühlt. Nach Zentrifugation (8 Minuten bei 800 g) und Entfernen des Überstandes wurde das Sperma mit TG-Verdünner «Co» (*Westendorf et al., 1975*) im Verhältnis 1:1 resuspendiert. Das Sperma wurde innert 2 Stunden auf 5 °C abgekühlt, je nach Dichte noch mit TG-Vorverdünner «Co» (5 °C) ergänzt und dann im Verhältnis 2:1 mit TG-Nachverdünner «C+» (*Westendorf et al., 1975*) verdünnt. Sofort erfolgte das Abfüllen des Spermas (6 ml pro Dosis, enthaltend insgesamt 6 Mia Spermien) in Polyamid-Pailletten (Aussendurchmesser 7 mm, Innendurchmesser 6 mm, Länge 30 cm), welche beidseitig mit einer Edelstahlkugel geschlossen wurden. Die Pailletten wurden in einer Styrofoamkiste 5 cm über dem flüssigen Stickstoff in horizontaler Lage tiefgefroren und nach 20 Minuten in den flüssigen Stickstoff umgelagert.

¹ Korrespondenzadresse: Postfach 2735, CH-3001 Bern.

2.3. Auftauen und Besamungen

Methode A: nach Pursel und Johnson (1975).

Methode B: die Pailletten wurden während 52 Sekunden in 52 °C warmem Wasser aufgetaut und zum Besamen direkt auf das Besamungsinstrument gesteckt. Als Nachspülflüssigkeit wurden 80 ml 25 °C warme OLEP-Auftaulösung (Larsson und Einarsson, 1976a) verwendet.

Die Besamung erfolgte bei beiden Methoden sofort nach dem Auftauen durch einen Melrose-Katheter. Die Sauen wurden alle in der ersten Brunst nach dem Absetzen der Ferkel besamt, und zwar je zur Hälfte mit Sperma, das nach Methode A bzw. Methode B tiefgefroren und aufgetaut worden war. Es wurden Doppelbesamungen im Abstand von 20 Stunden durchgeführt.

Die Beurteilung der Besamungsergebnisse erfolgte anhand der Anzahl trächtig gewordener Sauen und der Wurfgrösse. Für alle vier Eber standen Vergleichszahlen über Besamungen mit Frischsperma zur Verfügung.

2.4. Beurteilung der Spermaqualität

Die Beurteilung der Spermaqualität erfolgte nach den üblichen Kriterien. Folgende Parameter wurden für die vorliegende Arbeit berücksichtigt: Motilität des Frischspermas, Motilität und Akrosom-morphologie (nach Pursel und Johnson, 1974) des aufgetauten Spermas. Da die Motilität der Spermien 15 Minuten nach dem Auftauen aussagekräftiger ist als unmittelbar danach (Luder, 1979), wurde sie zu diesem Zeitpunkt sowie nach 3- und 5stündiger Aufbewahrungszeit bei 37 °C (Thermoresistenztest) beurteilt.

3. Resultate

3.1. Laborresultate (Tabelle 1)

Die nach Methode A tiefgefrorenen Spermien wiesen ausser bei Eber 3 signifikant häufiger einen normalen apikalen Rand (NAR) auf als die nach Methode B verarbeiteten Spermien. Die Motilität 15 Minuten nach dem Auftauen war mit Methode A bei allen Ebern signifikant bzw. hochsignifikant besser. Nach 3 Stunden wurden geringere Unterschiede gefunden. Nach 5 Stunden jedoch erwies sich die Motilität der nach Methode B tiefgefrorenen Spermien der Eber 3 und 4 als signifikant besser.

Die Proben der Eber 1 und 2 wiesen sowohl unmittelbar nach der Gewinnung als auch nach dem Auftauen und im Thermoresistenztest bei beiden Methoden meist bessere Motilitäten auf als das Sperma der Eber 3 und 4. Bezüglich Akrosom-morphologie waren indessen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ebern feststellbar.

3.2. Trächtigkeitsergebnisse (Tabelle 2)

Eber 1 erzielte unabhängig von der TG-Technik eine hohe Konzeptionsrate und grosse Würfe. Auch bei Eber 3 schien die Methode des Tiefgefrierens die Resultate nicht stark zu beeinflussen. Allerdings lag bei diesem Eber der Anteil trächtiger Sauen bei Methode B deutlich ($p < 0,05$) unter dem Gesamtdurchschnitt. Bei Besamungen mit nach Methode B tiefgefrorenem Sperma des Ebers 2 wurde eine signifikant höhere Konzeptionsrate erzielt als mit Methode A. Das Sperma des Ebers eignete sich offensichtlich nicht zum Tiefgefrieren nach der Methode A; die Konzeptionsrate fiel signifikant geringer ($p < 0,05$) aus als diejenigen der anderen Eber. Mit Methode B jedoch konnten für diesen Eber durchschnittliche Resultate erzielt werden.

Tabelle 1 Vergleich zweier Tiefgefriermethoden für Ebersperma. Laborresultate

Eber-Nr.	Anzahl Ejakulate	Methode	Frischsperma	Aufgetautes Sperma	Motilität %						
					Motilität %	Morphologie %NAR ¹ unmittelbar nach Auftauen	1/4 Std.		3 Std.		5 Std.
			$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
1	11	A	80,5 ± 3,3	30,1 ± 5,2*	54,1 ± 6,0***	28,6 ± 9,3	12,5 ± 6,8				
		B		23,6 ± 8,1*	36,4 ± 10,7	22,0 ± 9,9	17,2 ± 6,9				
2	11	A	81,8 ± 3,2	26,1 ± 5,2*	49,6 ± 6,2**	32,7 ± 4,9***	16,3 ± 6,5				
		B		20,3 ± 5,4*	40,5 ± 8,4	20,2 ± 5,5***	15,2 ± 4,5				
3	11	A	77,3 ± 3,9	21,6 ± 7,3	37,3 ± 7,2***	13,1 ± 6,0	3,7 ± 2,9				
		B		17,3 ± 7,2	23,4 ± 7,7	13,7 ± 7,2	10,7 ± 5,2				
4	11	A	76,4 ± 4,3	25,6 ± 6,1**	42,7 ± 6,5***	19,0 ± 7,7	6,0 ± 3,5***				
		B		16,1 ± 5,7	29,1 ± 6,0	14,7 ± 3,7	11,9 ± 3,4				
Alle Eber	44	A	79,0 ± 4,3	27,4 ± 5,2***	45,9 ± 9,1***	23,4 ± 10,6**	9,6 ± 7,2**				
		B		19,3 ± 7,3	32,1 ± 10,6	17,5 ± 7,8	13,8 ± 5,8				

t-Test: * p < 0,05

** p < 0,01

*** p < 0,001

A = Methode nach Pursel und Johnson (1975)

B = modifizierte Methode nach Westendorf et al. (1975)

¹ Prozentualer Anteil der Spermien mit normalem apikalem Rand

Tabelle 2 Vergleich zweier Tiefgefriermethoden fr Ebersperma. Trchtigkeitsresultate nach Doppelbesamung

Eber-Nr.	Methode	Besamte Sauen	davon tr�chtig	Wurfgrösse		
		n	n	% ¹	$\bar{x}$	$\pm s$
1	A	28	22	79	8,82	$\pm 2,77$
	B	27	22	81	9,27	$\pm 2,11$
2	A	29	18	62	7,94	$\pm 2,63$
	B	30	26*	87	8,04	$\pm 2,78$
3	A	24	14	58	6,71	$\pm 2,37$
	B	28	15	54	6,80	$\pm 2,10$
4	A	26	8	31	6,25	$\pm 3,03$
	B	22	15**	68	7,67	$\pm 3,30$
Alle Eber	A	107	62	58	7,76	$+ 2,86$
	B	107	78*	73	8,08	$+ 2,74$

χ^2 -Test: * $p < 0,05$

** $p < 0,01$

A = Methode nach Pursel und Johnson (1975)

B = modifizierte Methode nach Westendorf et al. (1975)

¹ Bei der Wertung der Prozentzahlen ist der Bestand (n) zu bercksichtigen

Gesamthaft war die mit Methode B erreichte Abferkelrate von 73% signifikant besser als diejenige mit Methode A von 58%. Bezglich der Wurfgrssen liessen sich zwischen den Methoden A und B keine signifikanten Unterschiede errechnen. Je hher die Konzeptionsrate war, desto mehr Ferkel pro Wurf wurden erzielt (Korrelationskoeffizient $r = +0,84$, $p < 0,01$). Im selben Betrieb betrug whrend der gleichen Zeit die Konzeptionsrate bei Doppelbesamungen mit Frischsperma 81,5%. Die durchschnittlichen Wurfgrssen der Eber bei Verwendung von Frischsperma betrugen fr Eber 1 9,1 (166 Wrfe); fr Eber 2 8,8 (105); fr Eber 3 8,3 (84) und fr Eber 4 7,6 (44). Die kleinen Wrfe sind fr diesen Betrieb als normal anzusehen.

4. Diskussion

Die einheitlichen Haltungsbedingungen der Tiere sowie die Versuchsanordnung erlauben einen direkten Vergleich der zwei TG-Verfahren.

Methode A erzielte im Labor gesamthaft bessere Werte; die Motilitt 15 Minuten und 3 Stunden sowie der Anteil Spermien mit normalem apikalem Rand (NAR) nach dem Auftauen waren signifikant besser. Dies steht in gewissem Widerspruch zu den Untersuchungen von Schrader et al. (1977). Diese Autoren stellten, im Vergleich mit der Methode A, im Originalverfahren nach Westendorf et al. (1975) eine deutlich bessere Motilitt nach dem Auftauen fest. Die Motilitt 5 Stunden nach dem Auftauen war als einziger im Labor untersuchter Parameter bei

Methode A signifikant schlechter. Da mit Methode A geringere Konzeptionsraten und durchschnittlich kleinere Würfe erzielt wurden, scheint es somit, dass beim Vergleich von TG-Methoden die Überlebensfähigkeit der Spermien im Thermoresistenztest am ehesten Hinweise auf das Befruchtungsvermögen gibt. Ähnliches beobachteten *Larsson* und *Einarsson* (1976b) und *Richter et al.* (1975) beim Vergleich einzelner Eber. In unserem Material jedoch hat dies für die einzelnen Vatertiere nur beschränkt Gültigkeit.

Hervorzuheben ist, dass die guten Eber 1 und 2 für alle im Labor untersuchten Parameter bei beiden Methoden im allgemeinen bessere Werte zeigen als die Eber 3 und 4. Die Besamungsergebnisse der erstgenannten Eber waren ebenfalls besser.

Die Gefriertauglichkeit und Befruchtungsfähigkeit des Spermias der verschiedenen Eber unterscheiden sich deutlich. Die Beeinträchtigung der Spermaqualität hängt nicht nur von der verwendeten TG-Methode, sondern auch vom Eber selbst ab. So zeigten Eber 1 und 3 bei beiden Methoden ungefähr gleiche Konzeptionsraten und Wurfgrößen. Bei Methode A erwiesen sich bei Eber 2 die Konzeptionsrate, bei Eber 4 Konzeptionsrate und Wurfgrösse als geringer.

Wie schon *Larsson* und *Einarsson* (1976b) und *Schuler* (1979) beobachteten, gibt es Eber, die bei Verwendung von Frischsperma gute Konzeptionsraten aufweisen, beim Einsatz von tiefgefrorenem Sperma jedoch auffällig schlechte Resultate erzielen. Dies bestätigt die Konzeptionsrate des Ebers 4, der mit nach Methode A tiefgefrorenem Sperma nur bei 8 von 26 besamten Sauen Trächtigkeit erzielte. Auch Eber 3 wies bei Verwendung von tiefgefrorenem Sperma bei beiden Methoden deutlich schlechtere Resultate auf als mit Frischsperma.

Aus unserer Arbeit geht hervor, dass die im Labor gemessenen Parameter nur eine sehr beschränkt gültige Aussage über das Befruchtungsvermögen von tiefgefrorenem Ebersperma zulassen. Besonders der Vergleich verschiedener TG-Methoden sollte nicht nur anhand des Labors geschehen; Besamungsversuche mit Sperma mehrerer Eber sind dazu unbedingt erforderlich. Andererseits zeigt der Versuch, dass mit geeigneten Ebern nahezu gleiche Resultate wie mit Frischsperma zu erreichen sind.

Zusammenfassung

Die Pellet-Methode nach *Pursel* und *Johnson* (1975) (= Methode A) wurde anhand von Labor- und Besamungsergebnissen in einem Split-sample-Versuch mit einer modifizierten Pailletten-Methode nach *Westendorf et al.* (1975) (= Methode B) verglichen. Währenddem sich Methode A bezüglich der im Labor untersuchten Parameter gegenüber Methode B als überlegen erwies, wurden mit Methode B signifikant bessere Besamungsergebnisse erzielt:

Methode A: Konzeptionsrate 58% (n = 107), durchschnittliche Wurfgrösse 7,76 Ferkel

Methode B: Konzeptionsrate 73% (n = 107), durchschnittliche Wurfgrösse 8,08 Ferkel

Als aussagekräftigster Parameter stellte sich die Motilität im Thermoresistenztest bei 37 °C 5 Stunden nach dem Auftauen heraus. Zwischen den 4 eingesetzten Ebern wurden grosse Unterschiede beobachtet.

Résumé

La méthode des pellets selon *Pursel* et *Johnson* (1975) (= méthode A) a été comparée à la méthode modifiée des paillettes selon *Westendorf et al.* (1975) (= méthode B) en tenant compte des résultats de laboratoire et des inséminations. Concernant les paramètres examinés en laboratoire, la

méthode A s'est avérée supérieure à la méthode B, en revanche les résultats de l'insémination par la méthode B étaient bien meilleurs.

Méthode A: Taux de conception 58% (n = 107), nombre moyen de porcelets par portée: 7,76.
Méthode B: Taux de conception 73% (n = 107), nombre moyen de porcelets par portée: 8,08.

La motilité dans le test de thermorésistance à 37 °C 5 heures après la décongélation est le paramètre le plus fiable. On a observé de fortes variations entre les quatre verrats utilisés.

Riassunto

Sulla base dei risultati del laboratorio e della fecondazione il metodo dei pellet di *Pursel e Johnson* (1975) (= metodo A) viene confrontato in una ricerca con split-sampling con un metodo modificato delle paillettes di *Westendorf et al.* (1975) (= metodo B). Mentre il metodo A appare superiore al metodo B si sono ottenuti risultati significativamente migliori nella fecondazione:

Metodo A: percentuale di concepimento 58% (n = 107), consistenza media della figliata: 7,76 suinetti.

Metodo B: percentuale di concepimento 73% (n = 107), consistenza media della figliata: 8,08 suinetti.

Il più significativo parametro risultava essere la motilità nel test di termoresistenza a 37 °C 5 ore dopo lo scongelamento. Sono state rilevate notevoli differenze tra i 4 verri utilizzati.

Summary

Split samples of boar semen were processed by the pellet-freezing method of *Pursel and Johnson* (1975) (= method A) and by a modified straw-(paillet)-freezing method of *Westendorf et al.* (1975) (= method B). Method A was superior regarding laboratory findings whereas the insemination results were significantly better for method B:

Method A: conception rate (107 sows) = 58%, average litter size = 7.76

Method B: conception rate (107 sows) = 73%, average litter size = 8.08

The motility 5 hours post thawing and incubation at 37 °C seemed to be the most valuable parameter. Large differences were observed between the 4 boars.

Verdankung

Wir danken der Firma Optigal SA für die Ermöglichung dieser Arbeit in ihrem Betrieb. Unser besonderer Dank gilt Herrn W. Egli, Chesalles, für die technische Mitarbeit.

Literatur

Haeger O. und *Mäckle N.*: Ein Zweiphasen-Verdüner in der Praxis der Schweinebesamung. Dtsch. tierärztl. Wschr. 78, 395–397 (1971). – *Larsson K.* and *Einarsson S.*: Fertility of deep frozen boar spermatozoa. Acta vet. scand. 17, 43–62 (1976a). – *Larsson K.* and *Einarsson S.*: Influence of boars on the relationship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. Acta vet. scand. 17, 74–82 (1976b). – *Larsson K., Einarsson S.* and *Swensson T.*: The development of a practicable method for deepfreezing of boar spermatozoa. Nord. Vet.-Med. 29, 113–118 (1977). – *Luder S.*: Untersuchungen zur Tiefgefrierung von Ebersperma mit der Beltsville-Methode. Diss. med. vet., Bern 1979. – *Paquignon M.* et *Courot M.*: Fertilité et prolificité de truies inséminées avec du sperme congelé. Ann. Zootech. 24, 645–650 (1975). – *Pursel V. G.* and *Johnson L. A.*: Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. Theriogenology 1, 63–68 (1974). – *Pursel V. G.* and *Johnson L. A.*: Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. J. Anim. Sci. 40, 99–102 (1975). – *Richter L., Romeny E., Weitzer K. F.* und *Zimmermann F.*: VII. Mitteilung: Weitere Labor- und Besamungsversuche mit dem Verdüner Hülsenberg VIII. Dtsch. tierärztl. Wschr. 82, 155–162 (1975). – *Schrader R., Treu H.* und *Hahn R.*: Zur Tiefgefrierkonservierung von Ebersamen in Kunststoffrohren. Dtsch. tierärztl. Wschr. 84, 9–12 (1977). – *Schuler D.*: Tiefgefrieren von Ebersperma: Labor- und Besamungsversuche mit der Beltsville-Methode. Diss. med. vet., Bern (in Vorbereitung). – *Westendorf P., Richter L.* und *Treu H.*: Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten-Verfahren. Dtsch. tierärztl. Wschr. 82, 261–267 (1975).