



*Sveriges lantbruksuniversitet*  
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper

# Jämförelse av fertilitet tidigt respektive sent på betäckningssäsongen hos nio (sju) Svenska halvblodshingstar

Caroline Winblad

*Uppsala*

*2012*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697*  
*Examensarbete 2012:31*



# Jämförelse av fertilitet tidigt respektive sent på betäckningssäsongen hos nio (sju) Svenska halvblodshingstar

Caroline Winblad

*Handledare: Jane Morrell, Institutionen för Kliniska Vetenskaper avdelningen för reproduktion  
Bitr handledare: Anders Johannisson, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi  
Examinator: Bernt Jones, Institutionen för Kliniska vetenskaper*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2012  
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper  
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

*Nyckelord: hingst fertilitet säsong*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>  
ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2012:31*



## **Innehåll**

Sammanfattning .....	6
Summary .....	7
Introduktion .....	9
Litteraturstudie .....	9
Syfte .....	13
Material och metoder .....	13
Hingstmaterial.....	13
Utförande .....	14
Resultat .....	18
Diskussion.....	22
Tack .....	24
Referenser .....	25

## SAMMANFATTNING

Studien undersökte om det fanns något samband mellan årstid och resultat på ett antal test för fertilitetsfaktorer.

Att försöka förutse ett handjurs fertilitet är komplext, inte minst då spermieegenskaperna skiljer sig åt mellan hingstar och även mellan ejakulat från samma hingst. Det finns många funktioner som måste analyseras för att säkert bedöma en oprövad hingsts fruktsamhet. Forskningen på området är begränsad och består ofta av studier med litet underlag eller retrospektiva studier där skötsel faktorer och stoegenskaper kan inverka. Som fertilitetsmått används ofta dräktighetsprocent men detta värde kräver stort underlag för att kompensera för eventuella fertilitetsstörningar hos de ston som används och eventuell bristande gynekologisk diagnostik. Mer kontrollerade studier som fortfarande är representativa för populationen är svåra att genomföra då det är svårt att standardisera levnadsförhållanden för sporthästar. Hingstar som används i avel selekteras ofta på prestation varför det är vanligt att de tränas och tävlas parallellt med sin avelskarriär.

I studien analyserades ordinarie transportspermadoser från nio hingstar av halvblodsras. Prover samlades vid fyra tillfällen under två veckor i månadsskiftet april/maj samt vid fyra tillfällen under två veckor i augusti. Två hingstar exkluderades då de lämnade för få prover. Totalt analyserades 42 prover. Proverna analyserades med avseende på koncentration, progressiv motilitet, total motilitet, andel spermier med normal morfologi, viabilitet med SYBR-14 och Hoechst33258, produktion av superoxid ( $O_2^-$ ), produktion av väteperoxid ( $H_2O_2$ ) samt kromatinintegritet (SCSA). Signifikant effekt av årstid sågs för total motilitet ( $p = 0,0256$ ); och superoxidproduktion ( $p \leq 0,0246$ ). För väteperoxidproduktion sågs en svag effekt ( $p \geq 0,0716$ ). Motiliteten var högre i proverna från augusti jämfört med de tagna i april/maj medan superoxidproduktion var lägre.

Då man ser ökad motilitet i augusti jämfört med april/maj och motilitet har visat god korrelation till fruktsamhet kan man från studien anta att fertiliteten ökar senare på säsongen. Underlaget för studien var begränsat varför försiktighet bör vidtas då resultaten används, särskilt om de skall tillämpas för hingstar av annan ras.

## SUMMARY

The aim of the study was to determine the effect of season on sperm quality parameters.

The large number of factors influencing the outcome of a mating complicates fertility prediction. The studies available generally have one of two main weaknesses; they are either made retrospectively in which the effects of mare and management factors confound the results or they are made in a more controlled environment but with a limited number of stallions. Sperm quality varies greatly between stallions and even between ejaculates from the same stallion. A large amount of data is thus required to get results that are useful in practice. Most warmblood stallions are bred because of their good sport performance; they are therefore in training and competing during the breeding season which makes it difficult to standardize their management.

In this study chilled fresh semen from nine warmblood stallions was analyzed for known indicators of fertility. The aliquots used in the study were taken from commercial AI (Artificial Insemination) doses. Samples were collected at four times during two consecutive weeks in April and May, which is in the first third of the Swedish breeding season, and then again four times during two weeks in August which is the end of the breeding season. A total of 42 samples were analyzed. Two stallions were excluded because there were only five samples from each. The sperm concentration, total and progressive motility, normal morphology, viability with SYBR-14 and Hoechst 33258, production of superoxide ( $O_2^-$ ), production of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and chromatin integrity (SCSA) were evaluated. A significant effect of season was seen for total motility ( $p = 0,0256$ ) and production of superoxide ( $p \leq 0,0246$ ). For hydrogen peroxide production a low significance ( $p \geq 0,0716$ ) was seen. Motility increased in the August samples compared to the samples from April and May, the superoxide production decreased. Other parameters were not significantly affected by season.

The study shows that there is a significant increase in sperm motility by the end of the breeding season. Since motility has been closely linked to fertility one could conclude that stallion fertility may be higher by the end of the breeding season. However, only a restricted number of animals were studied and the result may not be valid for a larger stallion population, particularly for other breeds





## INTRODUKTION

Avel har engagerat människor i alla tider. Målen har varierat; från att försöka få fram starka draghästar för skogsarbete och stabila kavallerihästar till dagens lätta högblodiga sporthästar. En faktor har dock påverkat alla inriktningar: fertiliteten. Hästar kan bara få en avkomma per år och de har en begränsad parningsperiod. Det är alltså av högsta vikt att djuren blir dräktiga när de ska. Ett sto som inte blir dräktigt förrän sent på avelssäsongen kommer föla sent och därmed skjuta upp även nästkommande avelssäsong. En misslyckad inseminering eller betäckning är dessutom ekonomiskt kostsam för stoägaren. Priset för en betäckning varierar beroende på hingst men ligger för Flyinges hingstar på omkring 10 000 SEK (€100), stations- och veterinärvgift ej medräknat.

Hos andra djurslag lägger man stor vikt vid handjurens reproduktionsförmåga; bland tjurar finns till exempel dotterfruktsamhet med i avelsindex – något sådant finns inte med i ASVHs (Avelsföreningen för Svenska Varmblodiga Hästen) BLUP. Inom nötkreatursaveln har man länge haft bekymmer med låga dräktighetsresultat och svaga brunster hos hondjuren. När man inom hästaveln började använda artificiell insemination i större utsträckning fick man plötsligt lägre fruktsamhet. Traditionellt har man använt sig av naturlig betäckning vilket kan tänkas ha medgett större variationer i sexuellt beteende utan att minska dräktighetsprocenten då hingsten ändå kunnat avgöra brunst. Idag träffas ofta inte hingst och sto utan en människa ska bedöma när stoet är som mest fertilt. Denna bedömning har blivit mycket mer exakt sedan man började använda rektalultraljud och idag har man normaliserat dräktighetsresultatet.

Förutom ovan nämnda stofaktorer delas hingstens ejakulat upp i flera mindre doser för att öka vinsten. Vid naturlig betäckning deponeras en större mängd spermier vilket har kunnat kompensera för en eventuell sämre kvalitet. En hingst med sämre spermiekvalité bör alltså lämna fler spermier per dos varför det kan anses centralt att kunna förutse spermiekvalitén för att få goda dräktighetsresultat. Det kan noteras att de 213 hingstar som använts i avel 2010 hade en genomsnittlig dräktighetsprocent på 76,84 % varav 34 stycken hade  $\leq 50\%$  dräktighet (uträknat från uppgifter på ASVHs hemsida).

## LITTERATURSTUDIE

### **Vilka olika bedömningsmetoder finns det för att bedöma hanlig fruktsamhet?**

Studiens motiv var att undersöka skillnader i hingstars fertilitet över avelssäsongen. Det finns flera olika sätt att mäta fertilitet på. Att mäta fölningsprocenten ger ett slutfacit men räknar inte med fosterdöd i olika stadier. Metoden gör heller ingen skillnad på om det krävs upprepade parningar eller vilken av parterna som orsakar en eventuell förlorad eller utebliven dräktighet. För att kunna göra analyser med fölningsprocent som fertilitetsmarkör krävs därför ett mycket stort underlag. Man kan istället mäta dräktighetsprocent en given tid efter parning/insemination, detta sällar bort sen fosterdöd men ställer högre krav på diagnostik. Med denna metod kan man mäta dräktighet per cykel vilket kan vara användbart då även hingstar med låg fertilitet klarar att befrukta

ston om de få betäcka vid flera cykler. En hingst med en dräktighetsprocent på 35 % per cykel kan få 80 % av stona dräktiga om de betäcks under fyra cykler (Colenbrander et al. 2003). Även då man mäter dräktighet per cykel krävs ett stort underlag för att kompensera för stonas inverkan.

För att säkert veta hur hingsten påverkar dräktighetsresultatet försöker man bedöma kvalitén på spermier. Problemet är att spermier behöver en rad olika egenskaper för att lyckas med befruktningen, de ska vara motila, hållbara, svara på omgivningsfaktorer, mogna och penetrera ägget. De test som finns idag prövar en egenskap i taget och är därför mest lämpade att upptäcka subfertilitet (Colenbrander et al. 2003). Att en hingst producerar spermier som presterar bra i ett test betyder inte att de samtidigt besitter andra nödvändiga egenskaper; spermier med god motilitet kan till exempel vara oförmögna att binda korrekt till oocyter och därmed också inkapabla att befrukta stoet. Man har ännu inte hittat något test förutom dräktighetsprocent som kan bedöma den faktiska fertiliteten hos hingsten och forskningen fokuserar idag mer på vilka kombinationer av test som bäst kan förutsäga en hingsts fruktsamhet.

Det är känt att vissa parametrar som man ofta studerar vid så kallad breeding soundness evaluation, till exempel motilitet och morfologi, skiljer sig åt mellan olika hingstar och även mellan ejakulat från samma hingst (Pattie et Dowsett 1982, Rousset 1987). Detta försvårar givetvis bedömningen, speciellt som det kan vara svårt att få prover från ovana hingstar som inte tränats att ejakulera i artificiell vagina.

Stuterier som tar sperma för insemination bedömer i regel spermiekoncentration och -motilitet. Antalet spermier som produceras har inte visat sig ha särskilt stor inverkan på fruktsamheten (Parlevliet et. Colenbrander, 1999) men man har i vissa studier hittat korrelation (Dowsett et Pattie 1982). God motilitet har i vissa studier visat sig korrelera till fruktsamhet (Jasko et al. 1992; Love 2011), andra har inte fått något statistiskt samband (Morrell et al 2008). En studie visade stark positiv korrelation mellan motilitet och fruktsamhet hos färsk spermier men fick inga signifikanta värden för fruktsamhet och motiliteten hos fryst spermier (Samper et al. 1991). Motilitet kan uppskattas manuellt i mikroskop eller med hjälp av dator, Computer Assisted Sperm Motility Analysis (CASA) men man har inte sett någon större skillnad på de två metoderna som fertilitetsindikatorer (Samper et al. 1991; Jasko et al. 1992).

En annan sedan länge använd egenskap är spermimorfologi. De flesta studier visar en positiv korrelation mellan normal morfologi och fertilitet (Gravance et al. 1996; Casey et al.1997; Morrell et al. 2008; Love 2011).

HOS-test, hypoosmotiskt sväll-test, går ut på att se hur spermiers cellmembran svarar då det utsätts för en miljö med låg osmolaritet. Provet har upptäckt hingstar med låg fertilitet där andra test inte har gett utslag, speciellt för fryst spermier, men det är osäkert i vilken grad testresultatet korrelerar med fruktsamhet (Colenbrander et al. 2003).

Innan befruktning måste spermien nå slutlig mognad. Detta sker i honliga genitalia och kräver att akrosomen i spermien kan svara på zona pellucidas signaler (Yanagimachi 1994). Det finns test som undersöker antalet mogna spermier och andelen vars akrosom reagerat. De mogna spermier anses ha lägre

överlevnad och de som redan har reagerat anses oförmögna att befrukta oocyten. Man kan också tillsätta inducerande ämnen (till exempel progesteron) till sperman och se om spermerna svarar och mognar normalt (Colenbrander et al. 2003). Man har visat att subfertila hingstars spermier i lägre utsträckning genomgår akrosom-mognad då de exponeras för progesteron (Meyers et al. 1995). Dessa hingstars spermier har också ett lägre antal progesteronreceptorer på cellmembranet efter inducering än hingstar med god fruktsamhet (Rathi et al. 2000).

Det finns test som prövar spermens förmåga att binda till och penetrera äggceller. Goda resultat har erhållits från studier med hästoocyter som delats på hälften för att man ska kunna jämföra den man vill testa med en hingst med känd fertilitet (Fazeli et al. 1995). Denna metod begränsas dock av de krav den ställer på utföraren samt till viss del tillgången på äggceller från häst.

Det finns en studie som visar god korrelation mellan fruktsamhet och andel spermier som filtreras igenom gelfiltret Sephadex. Korrelationen kunde ökas ytterligare genom att även filtrera provet genom glasfiber,  $r = 0.93$  för fryst sperma (Samper et al. 1991).

Denna metod tycks dock inte ha någon omfattande användning i praktiken.

Hur stabilt DNA är tros påverka embryoöverlevnad. Man har noterat att hästar har hög andel tidig fosterdöd (Ball, 1988). En del av dessa kan bero på att kromatinet från hingsten eller stoet beter sig avvikande. Det vanligaste sättet att bedöma kromatinstabilitet är genom SCSA (Sperm Chromatine Structure Assay). Man har kunnat se skillnad i andelen denaturerat kromatin hos fertila och subfertila hingstar (Love et al. 2001) samt mellan hingstar av olika fruktsamhet (Love et Kenney, 1998; Morrell et al. 2008). På människa har SCSA haft hög sensitivitet men låg specificitet, 52% falskt positiva (Evenson et al. 1999)

Fria syreradikaler (ROS) verkar cytotoxiskt på de flesta somatiska celler genom att binda till fettsyror i cellmembranet som därmed blir instabilt (Halliwell & Gutteridge, 1989). Hingstspermier har visat sig relativt motståndskraftiga mot oxidativ stress (Neild *et al.* 2005); viss oxidation gynnar kapaciteringen (Leclerc *et al.* 1997) men alltför hög oxidativ stress minskar membranintegriteten och ger därmed lägre motilitet och försämrad spermiefunktion (Alvarez et al. 1987; Griveau et al., 1995; Baumber et al. 2000). Vid mätning av ROS fokuserar man generellt på väteperoxid ( $H_2O_2$ ) och superoxid ( $O_2^-$ ) där väteperoxid anses ha störst inverkan på spermimotilitet (Griveau et al. 1995; Baumber et al. 2000; Guthrie & Welch 2006; Awda et al. 2009).

### **Vad påverkar hingstens fruktsamhet?**

Studier har visat att förhöjd kroppstemperatur leder till försämrad spermiekvalité (Freidman et al. 1991). Huruvida detta är överförbart på tävlingssituationen ger litteraturen inget entydigt svar på. Tävlingar och varmt väder har visat sig öka temperaturen i testiklarna vilket stör spermio-genesen (Staempfli et al. 2006). Extra uttalad blev effekten om hingsten använde suspensorier under träning och tävling. Träning leder till ökad plasmanivå kortisol, testosteron och laktat och verkar negativt på spermiekvalitén (Janett et al 2006). En studie på finska travhästar visade dock att antalet lopp som travhingstar sprang under avelssäsongen inte hade någon effekt på dräktighetsresultatet men att de som inte

tävlande alls hade bättre resultat än de som tävlade (Sairanen et al. 2011). Tävlade i hoppning och dressyr behöver dock inte nödvändigtvis ge sämre fertilitet; i en studie på tyska ridhästar sågs ingen negativ inverkan av tävlingar på spermiekvalité. De som inte tävlade alls hade tvärtom lägst motilitet, dock fortfarande inom normalvariation (Lange et al. 1997).

### **Har man sett skillnad på ston?**

Litteraturen innehåller få studier kring hur stonas fertilitet förändras över säsongen. En vanlig uppfattning tycks vara att det är svårare att få stona dräktiga på sommaren jämfört med våren. Detta skulle kunna förklaras genom att många uppfödare vill ha fölen tidigt på våren och försöker därför betäcka tidigt på säsongen. Friska, fertila djur blir därmed dräktiga tidigt medan svårare ston inte ”tar sig” och blir kvar till sommaren där de syns mer i statistiken. Ston som har varit svåra att få dräktiga tidigare år följer också senare på säsongen vilket ger en sen första brunst. Ston som betäcks eller insemineras sent på säsongen har en lägre dräktighetsprocent per cykel jämfört med de som betäcks eller insemineras tidigt (Vidament 1997, Katila 2003, Langlois 2004). Vidament undersökte fryst sperma och såg en statistiskt signifikant skillnad på dräktighetsresultat om ston inseminerades före respektive efter den 15 maj. Bland de ston som ingick i studien inseminerades dubbelt så många innan den 15 maj vilket stämmer väl överens med hästens naturliga parningstid. Katila et al (2003) delade upp säsongen på före och efter första juni. Man såg en tydlig skillnad i dräktighetsresultat för kyld transportsperma (59.1% innan respektive 49.0 % efter första juni) men för fryst sperma blev dräktighetsprocenten istället högre senare på säsongen (28.4 % respektive 35.1%).

Man har visat att faktorer hos stoet och inseminationsstrategi har större inverkan på dräktighetsresultatet än faktorer hos hingsten (Palmer 1992).

### **Har man sett skillnad på hingstar?**

Man har visat att hingstars spermieproduktion är årstidsberoende. I en studie producerade hingstar hälften så många spermier per dag under vintern (november/december) som under avelssäsongen (Pickett 1989).

Några få mer omfattande studier på årstidsskillnader har utförts. Man har sett att hos varmbloodshingstar ökar volymen, totalantalet spermier och motiliteten under sommarmånaderna (Janett et al. 2003b). Koncentrationen var signifikant lägre under sommaren jämfört med övriga årstider. Andelen morfologiskt normala spermier var lägre på sommaren och andelen defekta ökade. Viabiliteten var lägst på sommaren. I en parallell studie undersöktes sperma från franchises-montagneshästar. Hos dem var volymen och motiliteten istället lägre på sommaren medan totalantalet spermier var signifikant högre än vid andra årstider. Under sommaren minskar både andelen morfologiskt normala och andelen defekta celler. Koncentrationen var på sommaren lägre än höst och vinter men signifikant högre jämfört med koncentrationerna på våren (Janett et al. 2003a). Tabell 10 i diskussionskapitlet ger en översikt över skillnaderna i resultat mellan dessa studier.

## **SYFTE**

Syftet med studien var att undersöka huruvida spermiekvalitén hos hingstar förändras under säsongen. Man valde klassiska kvalitetsmarkörer som motilitet, morfologi och koncentration men mätte också viabilitet genom färgning med SYBR-14/PI samt produktion av fria syreradikaler (ROS) genom färgning och undersökning i flödescytometer.

Studien kan ge indikation på huruvida sjunkande spermiekvalité kan förklara svårigheterna med att få ston dräktiga sent på säsongen. Om spermans kvalitét förändras över säsongen bör detta även beaktas vid kvalitets- och fertilitetsstudier. Utvärderingar av kvalitetsmarkörer skulle då kräva fertilitetsdata från den period då proverna togs vilket inte alltid är fallet idag. Informationen kan också användas för att bättre bestämma vid vilken tid man bör samla sperma för infrysning (TAI).

Sverige har ett klimat med utpräglade årstidsskiftningar vilket gör frågeställningen extra relevant här.

## **MATERIAL OCH METODER**

Då enbart dräktighetsresultat inte är helt tillförlitligt valdes andra indikationer på spermans kvalitét. Morfologi och progressiv motilitet är sedan länge kända faktorer med god korrelation till fruktsamhet. Membranintegritet och viabilitet mättes med SYBR-14 och produktionen av reaktiva syreföreningar mättes med ROS-test. Kromatinstabilitet mättes med SCSA.

### **Hingstmaterial**

Spermieproverna som användes i studien kom från nio hingstar på Flyinge AB. Hingstarna var mellan 4 och 15 år gamla. Samtliga var godkända i Avelsföreningen Svenska Varmblodiga Hästen (ASVH) och användes i avel under säsongen. Proven som analyserades var stuteriets ordinarie transportspermadoser; en miljard progressivt motila spermier spädda med INRA-96 (IMV Technologies, l'Aigle, Frankrike). I vilken utsträckning proverna skulle spädas för att uppnå denna dos bestämdes på stuteriet efter koncentrations- och motilitetsbedömning. Hingstarna samlades tre gånger per vecka. Totalt analyserades spermier från åtta samlingar, fyra tillfällen över två veckor på våren (april-maj) och likadant på sensommaren (augusti). Hingstarna lämnade sperma i artificiella vaginor, modell och tillvägagångssätt anpassades efter individen.

## Utförande

### Morfologi och progressiv motilitet

Koncentrations- och motilitetsbedömning utfördes av Jane Morrell, Sveriges lantbruksuniversitet. Koncentrationen bestämdes med hjälp av Nucleocounter SP-100 (Chemometec, Danmark) och motiliteten med SpermVision (Minitube GmbH, Tiefenbach, Tyskland)

Morfologibedömning utfördes av erfaren personal på Spermalaboratoriet, Sveriges Lantbruksuniversitet. Spermierna preparerades i ett fixerat utstryk i formalin-saltlösning och i ett ofixerat utstryk i Williamsfärgning. Bedömning av morfologin utfördes vid tre av fyra tillfällen på våren och på samtliga fyra prover från augusti.

### Kromatinstabilitet (SCSA):

Labbanalys utfördes med hjälp av Anders Johannisson, Sveriges Lantbruksuniversitet. Vid ankomst till laboratoriet buffrades en mindre mängd transportsperma med Tris-NaCl-ethylenediamine tetraacetisk syra (TNE; 0.15M NaCl, 0.01M Tris-HCl och 1mM EDTA (ethylenediaminetetra acetic acid), pH 7.4) varefter de frystes in. De förvarades sedan i frys fram till analys. Vid analystillfället tinades proverna på is och bereddes sedan omgående. Först inducerades DNA-denaturering genom att tillsätta en svag syra (0.17% Triton X-100, 0.15M NaCl och 0.08N HCl, pH 1.2). 30 sekunder efter induktion färgades provet med acridine orange (6µg/mL i 0.1M citric acid, 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 0.15M NaCl, pH 6.0). Analysen i flödescytometer (FACStarPLUS, standardoptik, Becton Dickinson, San José, CA, USA) genomfördes inom fem minuter efter färgning. Data samlades med programmet CellQuest, (version 3.3, Becton Dickinson, San José, CA, USA) och behandlades sedan med FCS Express (version 2, De Novo Software, Thornhill, Ontario, Canada).

### Membranintegritet, viabilitet och produktion av reaktiva syreföreningar (ROS):

Labbanalys utfördes med hjälp av Anders Johannisson, Sveriges Lantbruksuniversitet. Dessa undersökningar utfördes på samma sätt som tidigare studier vid samma laboratorie (Lundgren 2011).

Följande indikationsämnen användes i försöket

Prov 1 (viabilitet):

Propidiumjodid färgar in döda celler och SYBR-14 visar levande. Resultaten från testet bedöms därför enligt tabell 1.

	Döda	Döende	Levande
PI	+	+	-
SYBR-14	-	+	+

Tabell 1, schema för bedömning av celler vid färgning med SYBR14 och PI.

Prov 2 och 3 (produktion av ROS):

Hoechst 33258 markerar viabilitet i ROS proverna genom att färga in döda celler.

Divätedichloroflouresceindiacetat ( $H_2DCHFDA$ ) visar intracellulära halter av ROS, framförallt väteperoxid ( $H_2O_2$ ).

Hydroethidine (HE) indikerar närvaro av den reaktiva syreföreningen superoxid ( $O_2^-$ )

Menadione (M, endast i prov 3) inducerar produktion av ROS. Induktionen visar att spermerna i provet är kapabla att producera ROS och säkerställer därmed att man inte får falskt låga ROS-värden i analyserna för att spermerna saknar denna förmåga.

### Beredning:

*Grundprov* preparerades på följande sätt: 500 $\mu$ L transportsperma späddes med 2500 $\mu$ L Cellwash i ett provrör. Proven centrifugerades i 400x g under 10 minuter i 20 grader C. Supernatanten avlägsnades och 500 $\mu$ L Cellwash tillsattes.

Prov 1: 30 $\mu$ L av grundprovet tillsattes till 270 $\mu$ L Cellwash. Därefter tillsattes SYBR-14 och Propidiumjodid (Live/Dead® Sperm Viability Kit L-7011; Invitrogen™, Inc., Eugene, OR, USA). Provet analyserades direkt efter inkubation i 37-gradigt värmeskåp i 10 minuter.

Prov 2: 30 $\mu$ L av grundprovet tillsattes till 270 $\mu$ L Cellwash. Därefter tillsattes Hydroethidine (Invitrogen™), Divätedichloroflouresceindiacetat (Invitrogen™) och Hoechst 33258 (Invitrogen™) enligt schema. Provet inkuberades i 37 grader i värmeskåp i 30 min innan analys.

Prov 3: 30 $\mu$ L av grundprovet tillsattes till 270 $\mu$ L Cellwash. Därefter tillsattes Hydroethidine (Invitrogen™), Divätedichloroflouresceindiacetat (Invitrogen™), Hoechst 33258 (Invitrogen™) och Menadione (Sigma-Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA) enligt schema. Provet inkuberades i 37 grader i värmeskåp i 30 min innan analys.

Beredningen sammanfattas i tabell 2.

	Tillsats	Koncentration (µM)	Mängd (µl)
Prov 1	SYBR-14	0,4	0,6
	PI	24	3
Prov 2	Hoechst 33258	1,2	9
	HE	1,2	9
	DCFDA	60	9
Prov 3	Hoechst 33258	1,2	9
	HE	1,2	9
	DCFDA	60	9
	Menadione	200	3

Tabell 2, beredning av viabilitets- och ROS-prover

Proven analyserades sedan i flödescytometer. Beroende på hur cellerna färgade in kunde olika grupper urskiljas. Tabell 3 ger en överblick.

	Hoechst 33258	HE	DCFDA
ROS Döda	+	+/-	
ROS -	-	-	
ROS +	-	+/-	
Döda H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +	+		+
Levande H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +	-		+
Döda H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -	+		-
Levande H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -	-		-

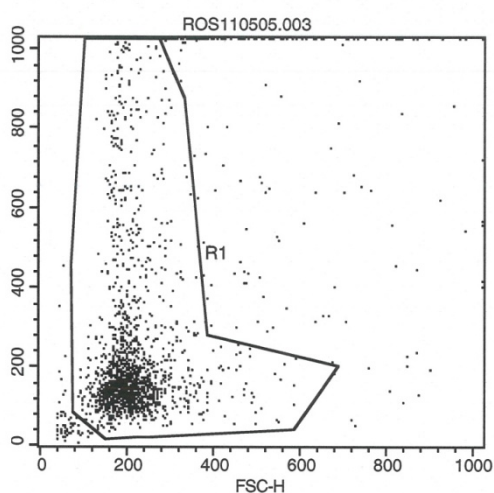
Tabell 3, bedömnig vid infärgning av ROS-prover



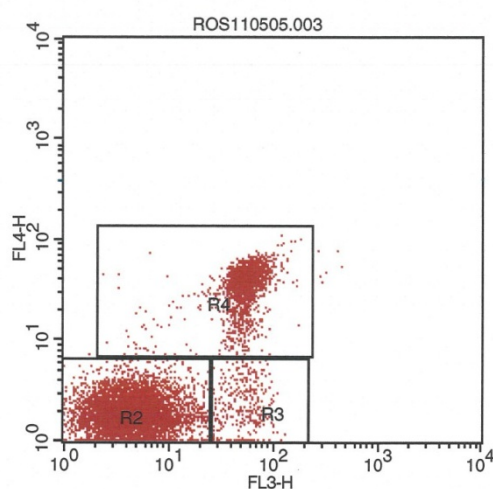
Flödescytometern registrerar fluorescerande celler vilket visualiseras med programmet CellQuest. Mellan 11000 och 46 000 spermier per prov undersöktes för ROS, 8 800 - 9 800 för SCSA. Data från försöket presenterades i grafer där användaren begränsar datagrupperna manuellt eller via en mall. Nedan följer en beskrivning på arbetsgång vid ROS-färgning, olika grafer används vid olika analyser.

I Figur 1 har man angett vilka datauppgifter som skall medverka i resultatet (R1). Enstaka punkter hamnar utanför upptagningsområdet, dessa representerar debris. Spermier ses ofta i tydliga ansamlingar vilket är fördelaktigt vid begränsning av datagrupper.

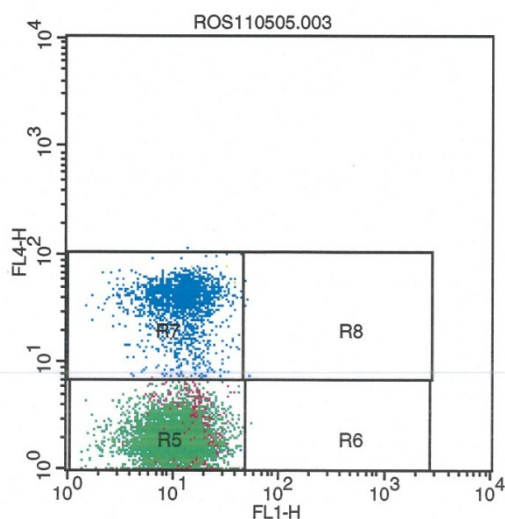
Figur 1, begränsning av dataunderlag



Figur 2, superoxidprover



Figur 3, väteperoxidprover



Figur 2 visar andelen icke superoxidproducerande spermier (R2) andelen superoxidproducerande (R3) samt andelen döda spermier (R4). Figur 3 visar väteperoxidprover; levande spermier som har respektive inte har producerat väteperoxid (R6 resp. R5) samt döda spermier som har respektive inte har producerat väteperoxid (R8 resp. R7). Denna figur visar ett prov där merparten av spermierna inte har producerat väteperoxid, på prover med menadione tillsatt var merparten av cellerna i grupp R6 och R8.

## RESULTAT

Nedan presenteras resultaten från studien. En variationsanalys ”mixed effects model” av data utfördes med programmet SAS 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). De olika analyserna användes som variabler och säsong och ejakulat som fasta effekter. Man inkluderade också den slumpmässiga effekten av de olika ejakulaten.

Variablerna har delats upp efter egenskaper; grundreproduktionsparametrar (koncentration, motilitet, morfologi), kromatinstabilitet (SCSA), viabilitet (SYBR-13/PI), produktion av superoxid samt produktion av väteperoxid.

I tabellerna anges signifikansen (p) för de olika variablerna. I de fall värdet för p är >0.1 anses värdet icke signifikant, detta anges ns (non signifikant). Nedan visas också grafer för signifikanta variabler med spridningen och de beräknade värdena för vår respektive sensommar.

Hingstarna representerades under bearbetningen av siffrorna 1-9. För att öka tillförlitligheten inkluderar resultaten endast hingstar som lämnat minst tre prov per årstid. Sex hingstar gav fyra prov per årstid. Hingst nummer två och nummer nio exkluderades då de gav färre än tre prov antingen på våren eller på hösten. Hingst nummer fem gav endast tre prov på våren men fyra på hösten. Statistisk analys utfördes på sju hingstar (1 samt 3-8). Ejakulat nummer två har uteslutits då detta saknades från hingst nummer fem. Resultaten baseras alltså på 42 prover.

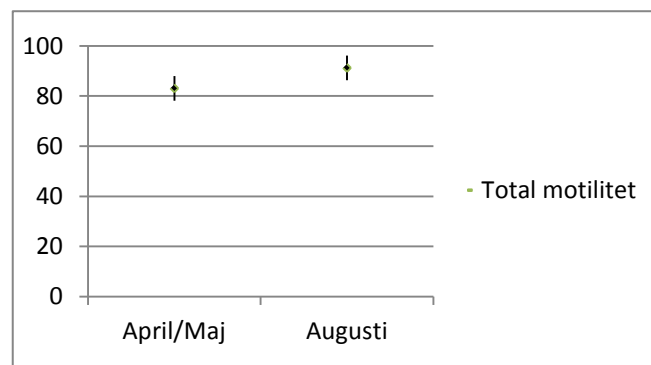
För många variabler sågs en signifikant skillnad mellan ejakulaten. Detta beror troligen på att man haft ett begränsat underlag samt att det finns en stor naturlig variation i spermans egenskaper mellan ejakulat. Hingstarna samlades tre gånger per vecka; måndag, onsdag och fredag. Av praktiska skäl utfördes studien på ejakulat som lämnats måndagar och onsdagar. Prov ett och tre togs på måndagen efter att hingstarna inte lämnat sperma på tre dagar medan prov två och fyra togs på onsdagen. Oliigheterna mellan ejakulaten stämmer dock inte överens med tiden mellan tidigare spermasamling och provtagning. Ingen annan förklaring till signifikans för effekt av ejakulatnummer kan ges. Effekten av ejakulatnummer redovisas inte och man valde att inte korrigera för denna då effekten av årstid analyserades.

I tabell 4 ser man att varken koncentrationen, den progressiva motiliteten eller andelen spermier med normal morfologi förändrades signifikant mellan årstiderna. Däremot sågs ett samband mellan säsong och total motilitet där motiliteten var högre i augusti. Figur 4 visar beräknade värden och spridning för total motilitet.

**Signifikans (p-värde) för effekten av säsong på grundreproduktionsparametrar**

Koncentration	ns
Progressiv motilitet	ns
Total motilitet	0,0256
% normal morfologi	ns

Tabell 4, Signifikans för effekten av säsong på grundreproduktionsparametrar, ej signifikanta resultat benämns ns, non significant.



Figur 4, Total motilitet

Resultaten från SCSA visas i tabell 5. Inget signifikant samband mellan kromatinstabilitet och årstid sågs.

**Signifikans (p-värde) för effekten av säsong på kromatinstabilitet (SCSA)**

DNA-fragmentationsindex	ns
variationskoefficient	ns
medelvärde normala	ns

Tabell 5, Signifikansvärden för effekten av säsong på kromatinstabilitet (SCSA)

Tabell 6 visar resultaten från viabilitetsproverna. Ingen signifikans ses för de undersökta parametrarna.

**Signifikans (p-värde) för effekten av säsong på viabilitetsparametrar**

SYBR Döda	ns
SYBR Dying	ns
SYBR Living	ns

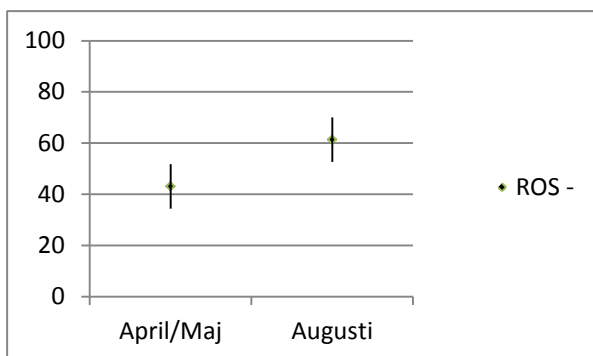
Tabell 6, Viabilitet/Membranintegritet (SYBR-14/PI)

Tabell 7 visar ROS-testets p-värden. Endast ROS - och ROS + skiljer sig signifikant mellan årstiderna (p = 0,005 respektive p = 0,025). Beräknat värde och spridning för dessa två parametrar illustreras i Figur 5 respektive Figur 6.

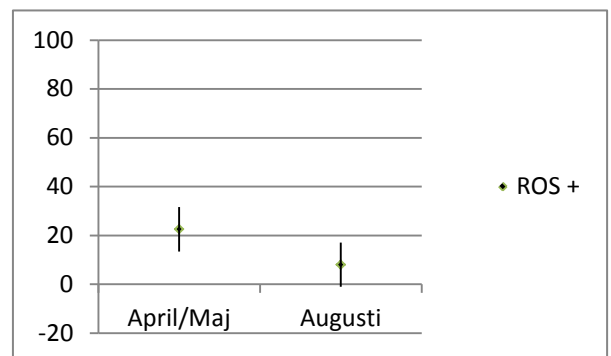
**Signifikans (p-värde) för effekten av säsong på superoxidproduktionsparametrar**

ROS D	ns
ROS DM	ns
ROS neg.	0.0053
ROS neg. M	ns
ROS pos.	0.0246
ROS pos. M	ns

Tabell 7, ROS



Figur 5, Icke superoxidproducerande



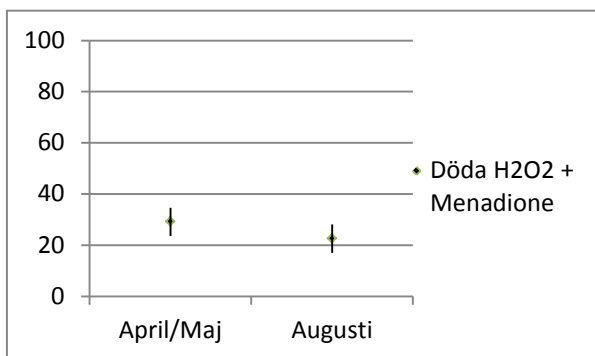
Figur 6, Superoxidproducerande

I tabell 8 ses p-värden för väteperoxidproverna. Viss årstidseffekt ses för döda väteperoxidproducerande celler inducerade med menadione ( $p = 0,072$ ) samt för döda icke väteperoxidproducerande celler inducerade med menadione ( $p = 0,072$ ). Figur 7 och 8 visar beräknat värde, maxvärde och minvärde för parametrar med signifikant effekt av årstid.

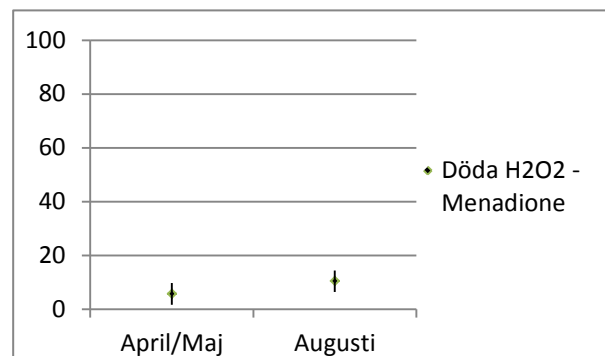
**Signifikans (p-värde) för effekten av säsong på väteperoxidproduktionsparametrar**

Döda H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +	ns
Döda H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + M	0,0720
Levande H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + M	ns
Levande H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +	ns
Levande H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - M	ns
Döda H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - M	0,0716
Döda H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -	ns
Levande H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -	ns

Tabell 8, Signifikans väteperoxidprover



Figur 7, Döda väteperoxidproducerande spermier inducerade med menadione



Figur 8, Döda icke väteperoxidproducerande spermier inducerade med menadione

## DISKUSSION

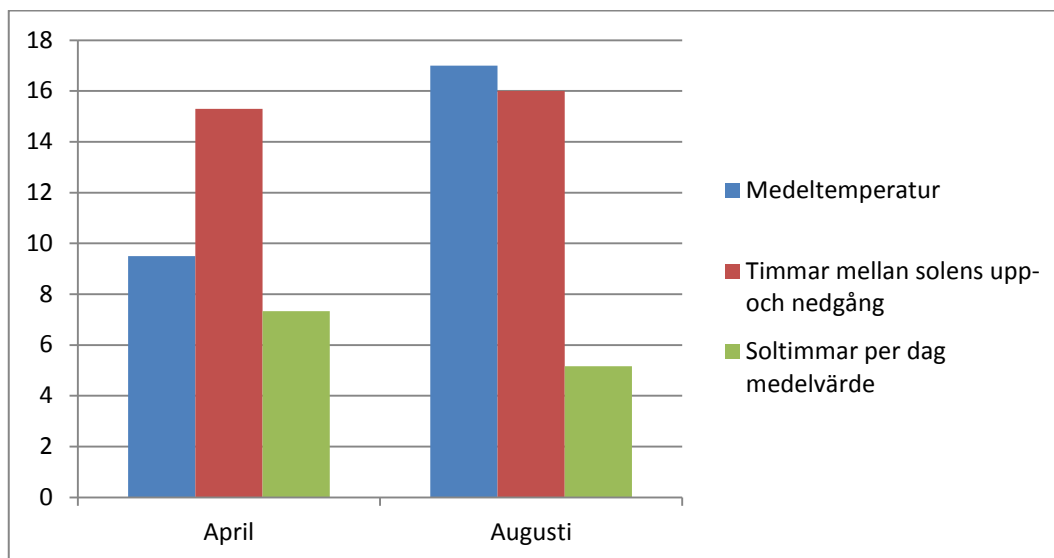
Resultaten från studien finns sammanfattade i tabell 9 nedan:

Värden som ökar på hösten	Värden som minskar på hösten
Total motilitet	
ROS –	ROS +
(Döda H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – Menadione)	(Döda H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Menadione)

Tabell 9, sammanfattning av resultat

Man kan utifrån dessa data konstatera att spermans egenskaper skiljer sig åt mellan provtillfällena i april/maj och de i augusti.

Vädret i den region hästarna mestadels befann sig fördelade sig under försöksperioden enligt följande (visas i figur 9); medeltemperaturen höjdes från april till augusti med ca 7,5 grader (9,5 - 17°C). Tiden mellan solens upp- och nedgång var ungefär lika, 15,3 timmar den 1 maj respektive 16 timmar den 1 augusti. I april hade man 220 soltimmar och i augusti 160 (Sveriges meteorologiska och hydrologiska institut (SMHI) a och b).



Figur 9, väderdata från de båda provtillfällena

Sommarsolståndet inträffade mellan provtagningarna, hingstarna hade därför utsatts för mest dagsljus inför provtagningarna på sensommaren. Vädret var dock molnigt i augusti vilket gav mindre direkt solljus. Hypofysens möjlighet att svara på GnRH och koncentrationen könshormon i blodet har tidigare visat sig variera med årstiderna så att aktiviteten ökar under parningssäsongen (Roser and Hughes, 1992). Stor skillnad i temperatur kunde uppmätas mellan säsongerna men maxtemperaturen under augusti var 25,9°C (27°C månaden innan) vilket inte kan

anses extremt. Hingstarna borde kunna reglera temperaturen i testiklarna vid dessa omgivningstemperaturer.

För motilitetsparametrarna tycks årstid endast ha effekt på den totala motiliteten. Därmed skall resultaten tolkas med försiktighet, troligen beror skillnaderna i total motilitet på förvaring och hantering av proven.

I en tidigare studie har man sett att motiliteten hos spermier går upp under sommarmånaderna (juni, juli, augusti) jämfört med andra säsonger (Janett et al. 2003 b). I samma studie sågs också att totalantalet spermier, ejakulatvolym och andelen defekta spermier ökade till sommaren. Författarna gjorde även en parallell studie på kallblod av rasen franchises-montagnes där man noterade att volymen, motiliteten, andelen spermier med normal morfologi och andelen defekta spermier var lägre på sommaren jämfört med våren. Viabilitet undersöktes inte på kallblodsperman (Janett et al. 2003a). Resultaten från dessa två studier jämförs med denna studie i Tabell 10.

	Janett et al. 2003a (Kallblod)	Janett et al. 2003b (Varmblod)	Denna studie (Varmblod)
Ejakulatvolym	Lägre	högre	-
Totalantal	Högre	högre	-
Motilitet färsk (kyld) sperma	Lägre	högre	högre
Normal morfologi	Lägre	lägre	ns
Defekta spermier	Lägre	högre	-
Koncentration	Högre	lägre	ns
Viabilitet	Ej undersökt	lägre	ns

*Tabell 10, grundreproduktionsparametrar, jämförelse med andra studier*

För motilitet hos färsk sperma, den enda egenskap med signifikant effekt av årstid som undersökts i alla studier, följer resultatet från denna studie den tidigare studien på varmblodiga hästar. Effekten av årstid skiljer sig åt mellan raserna på flera parametrar. Detta talar, om än försiktigt, för att effekten av årstid är rasspecifik.

Produktionen av superoxid minskar senare på avelssäsongen medan produktionen av väteperoxid inte tycks påverkas nämnbart. På våren ger den ökande dagslängden mycket stimuli i hypothalamus vilket bidrar till ökad spermieproduktion. Aktiva spermier producerar mer superoxid vilket skulle kunna förklara ROS-resultaten. Svag signifikans sågs för döda menadioneinducerade prover men då man inte såg någon säsongseffekt på de andra väteperoxidproverna anses detta resultat vara av mindre betydelse.

Bland möjliga orsaker till falska resultat bör nämnas att hingstarna användes i kommersiellt syfte och därför inte tappades på sperma om det inte fanns någon efterfrågan. Det skulle kunna innebära att det inför vissa provtagningar var olika länge sedan hingstarna senast lämnade sperma och hur ofta hingstarna ejakulerar kan inverka på spermiekvalitén. Efter en tid innehåller sperman naturligt fler döda och/eller döende celler. I början av säsongen betäcktes fler ston vilket kan ha lett till fler insamlingar under den tiden (max 3/vecka) jämfört med senare på säsongen. Denna risk bedöms dock som liten då det borde ha gett enstaka tillfällen med avvikande värden på framför allt viabilitetsproverna. Att det inte kom något prov med tydligt avvikande kvalitet minskar också risken för falska förändringar på grund av sjukdom eller annat som stressat hästarna. Hingstarna tränade och tävlades i olika utsträckning under försöksperioden, detta har tidigare visat sig ha varierande inverkan på fertilitet (Freidman et al. 1991; Janett et al 2006; Sairanen et al. 2011; Staempfli et al. 2006; Lange et al. 1997). Även den högre temperaturen på sommarhalvåret kan tänkas sänka spermiekvalitén (Freidman et al. 1991; Staempfli et al. 2006). Effekten av säsong tycks dock vara starkare då resultatet snarare tyder på ökad spermiekvalité under sommaren.

Färsk sperma är känslig för temperaturskillnader och viss risk fanns att transportererna inte skulle hålla samma temperatur mellan årstiderna. Projektets budget tillät inte monitorering av temperaturen under transport och man mätte heller inte temperaturen vid ankomst till laboratoriet då risken för avvikande temperatur ansågs låg. Hade spermerna skadats under transport borde detta upptäckas som avvikande värden i laborationsresultaten från enstaka eller tillsammans transporterade ejakulat och inga sådana avvikelser noterades.

Sammanfattningsvis kan noteras att resultaten för vissa parametrar visar att årstid har en tydlig effekt på spermiekvalité. Ökningen i motilitet har mycket hög signifikans medan produktionen av superoxid tycks sjunka under säsongen. Årstid tycks inte påverka viabiliteten hos spermerna.

Huruvida resultatet är överförbart på andra hingstar är oklart. Som tidigare noterats är kraftig individuell variation ett problem vid reproduktionsstudier på hingst. För att få mer tillförlitliga resultat krävs ett större underlag, antingen genom att upprepa experimentet på samma hingstar eller, företrädesvis, genom att utföra samma studie på en annan grupp hingstar.

## **TACK**

Stort tack till min handledare Jane Morrell för ovärderligt engagemang och stöttande genom hela projektet.

Tack också till min biträdande handledare Anders Johannisson som guidat mig på labbet och i skrivandet av detta arbete.

Tack till Patrice Humblot som med kort varsel hjälpt till med statistiken.

Flyinge AB skall också ha tack för alla spermadoser de skickat. Utan stuteriers bidrag skulle det vara mycket svårt att bedriva forskning inom hästreproduktion.



## REFERENSER

- Alvarez J.G., Touchstone J.C., Blasco L and Storey B.T. 1987. *Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity.* Journal of Andrology 8, 338-348.
- Awda B.J., Mackenzie Bell M. and Buhr M.M. 2009. *Reactive Oxygen Species and Boar Sperm Function.* Biology of Reproduction 81, 553-561.
- Ball B.A. 1988: *Embryonic loss in mares. Incidence, possible causes, and diagnostic considerations.* The Veterinary Clinics of North America Equine Practice, Aug 4(2) 263-290.
- Baumber J., Ball B.A., Gravance C.G., Medina V and Davies-Morel M.C. 2000. *The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation.* Journal of Andrology 21, 895-902.
- Casey P.J., Gravance G.C., Davis R.O., Chabot D.D. and Liu I.K.M. (1997) *Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions.* Theriogenology 47: 575-582
- Colenbrander B., Gadella B.M. and Stout T.A. (2003) *The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility.* Reprod Dom Anim 38, 305-311
- Dowsett K.F. and Pattie W.A. (1982) *Characteristics and fertility of stallion semen.* J Reprod Fertil Suppl. 32:1-8.
- Evenson D.P., Jost L.K., Marshall D., Zinaman M.J., Clegg E., Purvis K., de Angelis P. and Claussen O.P. (1999) *Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic.* Human Reprod 14, 1039-1049.
- Fazeli A.R., Steenweg W., Bevers M.M., van den Broek J., Bracher V., Parlevliet J. and Colenbrander B. (1995) *Relation between stallion sperm binding to homologous hemizona and fertility.* Theriogenology 44, 751-760.
- Freidman R., Scott M., Heath S.E., Hughes J.P., Daels P.F. and Tran T.Q., (1991). *The effects of increase testicular temperature on spermatogenesis in the stallion.* J. Reprod. Fertil. (Suppl. 44), 127-134.
- Gravance C.G., Liu I.K., Davis R.O., Hughes J.P. and Casey P.J. (1996): *Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa.* J Reprod Fert 108, 41-46.
- Griveau J.F., Dumont E., Renard P., Callegari J.P. and LeLannou D. 1995. *Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa.* Journal of Reproduction and Fertility 103, 17-26.
- Guthrie H.D. and Welch G.R. 2006. *Determination of intracellular reactive species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry.* Journal of Animal Science 84, 2089-2100.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M. 1989. Free radicals in Biology and Medicine, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.
- Janett F., Thun R., Bettschen S., Burger D. and Hassig M. (2003 a) *Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions.* Animal Reproduction Science 77 213-221
- Janett F., Thun R., Niederer K., Burger D. and Hässig M. (2003 b) *Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion.* Theriogenology Volume 60, 453-461
- Janett, F., Burkhardt, C., Burger, D., Imboden, I., Hässig, M. and Thun, R., (2006). *Influence of repeated treadmill exercise on quality and freezability of stallion semen.* Theriogenology 65, 1737-1749.
- Jasko D.J., Little T.V., Lein D.H. and Foote R.H. (1992). *Comparison of spermatozoa movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988).* J Am Vet Med Assoc 200:979-85
- Katila T. (2003) *Effects of hormone treatments, season, age and type of mares on ovulation, twinning and pregnancy rates of mares inseminated with fresh and frozen semen.* Pferdeheilkunde 19, 619-624
- Lange, J., Matheja, S., Klug, E., Aurich, C. and Aurich, J.E., (1997). *Influence of training and competition on the endocrine regulation of testicular function and on semen parameters in stallions.* Reprod. Domest. Anim. 32, 297-302

- Langlois B. and C. Blouin (2004) *Statistical analysis of some factors affecting the number of horse births in France*. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 583-595
- Leclerc P., de Lamirande E. and Gagnon C. 1997. *Interaction between Ca<sup>2+</sup>, cyclic 3',5'- adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human spermatozoa*. *Journal of Andrology* 19, 434-443.
- Love C.C., (2011) *Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions*. *Theriogenology* 76 547–557
- Love C.C., Thompson J.A., Lowry V.K. and Varner D.D (2001) *The relationship between chromatin quality and fertility of chilled stallion sperm*. *AAEP proceedings*, vol 47, 229-231
- Love C.C. and Kenney R.M. (1998). *The relationship of increased susceptibility of sperm dna to denaturation and fertility in the stallion*. *Theriogenology* 50:955--972
- Lundgren, A. (2011) *Förekomst av reaktiva syreföreningar i transportsperma från hingst*. Examensarbete, Uppsala, Sveriges Lantbruksuniversitet. ISSN 1652-8697
- Meyers S.A., Overstreet J.W., Liu I.K. and Drobnis E.Z. (1995) *Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone induced acrosome reactions in fertile and subfertile males*. *J Androl* 16, 47-54.
- Morrell J.M., Johannisson A., Dalin A-M., Hammar L., Sandebert T. and Rodriguez-Martinez H. (2008). *Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates*. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50:2
- Neild D.M., Brouwers J.F., Colenbrander B., Agüero A. and Gadella B.M.. 2005. *Lipid Peroxide Formation in Relation to Membrane stability of Fresh and Frozen thawed Stallion Spermatozoa*. *Molecular reproduction and development* 72, 230-238.
- Palmer E. and Magistrini M. (1992) *Automated analysis of stallion semen post-thaw motility*. *Acta Vet Stand* 88, 137-152
- Parlevliet J. and Colenbrander B. (1999) *Prediction of first season stallion fertility of 3-year-old Dutch Warmbloods with prebreeding assessment of percentage of morphologically normal live sperm*. *Equine vet J.* 31, 248-251.
- Pattie W.A. and Dowsett K.F. (1982) *The repeatability of seminal characteristics of stallions*. *J Reprod Fertil. (Suppl 32):* 9-13.
- Pickett B.W., Amann R.P., McKinnon A.O., Squires E.L. and Voss J.L. (1989) *Management of the stallion for maximum reproductive efficiency*. *Anim. Reprod. Lab. Bull.* 05 126.
- Rathi R., Nielsen M., Cheng F.P., van Buiten A. and Colenbrander B. (2000) *Exposure of progesterone receptors on the plasma membranes of stallion spermatozoa as a parameter for prediction of fertility*. *J Reprod Fert Suppl* 56, 87-91.
- Roser, J. and Hughes J. (1992) *Seasonal effects on seminal quality, plasma hormone concentrations and GnRH-induced LH response in fertile and subfertile stallions*. *Journal of Anthology*. vol. 13. No. 3.
- Rousset H.C., Chanteloube P.H., Magistrini M. and Palmer E. (1987) *Assessment of fertility and semen evaluations of stallions*. *J Reprod Fertil. (Suppl 35):* 25-31.
- Sairanen J., Katila T., Virtala A-M. and Ojalaa M. (2011) *Effects of racing on equine fertility*. *Animal Reproduction Science* 124 73-84
- Samper J.C., Hellander J.C. and Crabo B.G., (1991) *Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality*. *J Reprod Fertil Suppl* 44, 107-114
- Sveriges meteorologiska och hydrologiska institut (SMHI) a, *Klimatdata, månadens väder och vatten april 2011* [online] (05 maj 2011) Tillgänglig: <http://www.smhi.se/klimatdata/Manadens-vader-och-vatten/Sverige/Manadens-vader-i-Sverige/april-2011-en-riktig-rekordmanad-1.16086> [02 feb 2012]
- Sveriges meteorologiska och hydrologiska institut (SMHI) b, *Klimatdata, månadens väder och vatten augusti 2011* [online] (07 september 2011) Tillgänglig: <http://www.smhi.se/klimatdata/Manadens-vader-och-vatten/Sverige/Manadens-vader-i-Sverige/augusti-2011-himlen-oppnade-sig-och-regnet-foll-1.17409> [02 feb 2012]

Staempfli S., Janett F., Burger D., Kündig H., Imboden I., Hässig M. and Thun R. (2006) *Effect of exercise and suspensory on scrotal surface temperature in the stallion*. Theriogenology 66, 2120-2126.

Vidament M., Dupere A.M., Julienne P., Evain A., Noue P. and Palmer E. (1997) *Equine frozen semen, freezability and fertility field results*. Theriogenology volume 48, 907-917

Yanagimachi R, (1994) Mammalian fertilisation. Ur: Knobil E, Neill JD (eds), Physiology of Reproduction, 2nd edn. Raven Press Ltd., NewYork, 189-317.