

**Einfluss von Puffermedien auf Spermaqualität und
Fruchtbarkeit bei high-volume-Besamung beim Rind**

von Magdalena Fuchs

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Einfluss von Puffermedien auf Spermaqualität und
Fruchtbarkeit bei high-volume-Besamung beim Rind**

von Magdalena Fuchs
aus Sankt Johann in Tirol

München 2022

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Mitbetreuung durch: Dr. Christiane Otzdorff

Angefertigt an der Bayern-Genetik GmbH, Kumhausen

Mentor: Dr. Jakob Scherzer

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Ivica Medugorac

Tag der Promotion: 30.07.2022

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
1.	Spermatologie des Bullen.....	3
1.1.	Physiologie der Spermatogenese.....	3
1.2.	Morphologie des Spermiums.....	3
1.2.1.	Plasmamembran.....	4
1.2.2.	Mitochondrien und Mitochondrienmembranpotential.....	4
2.	Qualitätsuntersuchung von Bullenejakulaten.....	5
2.1.	Konventionelle Analyse eines Ejakulats.....	5
2.2.	Moderne spermatologische Testverfahren.....	6
2.2.1.	Computergestützte Spermienanalyse (CASA = computer assisted/aided sperm analysis).....	6
2.2.2.	Durchflusszytometrische Spermienuntersuchung.....	7
2.2.2.1.	Untersuchung der Plasmamembranintegrität mittels SYBR [®] 14/PI-Färbung.....	8
2.2.2.2.	Untersuchung des Mitochondrienmembranpotentials mittels JC-1-Färbung.....	9
2.3.	Einflussfaktoren auf die Qualität von Bullensperma.....	9
2.3.1.	Individuumsfaktoren.....	10
2.3.2.	Umweltfaktoren.....	10
2.3.3.	Einflussfaktoren bei Spermagewinnung und -prozessierung.....	11
3.	Künstliche Besamung beim Rind.....	14
3.1.	Physiologie des Spermientransports im weiblichen Genitaltrakt.....	15
3.2.	Die intrauterine Besamung als Standardbesamungsmethode.....	17
3.3.	Der optimale Ort der Spermadeposition im Rahmen der künstlichen Besamung beim Rind.....	17
3.4.	Spermienkonzentration in Besamungsportionen.....	19
3.5.	Alternative Besamungstechniken beim Rind.....	20
3.6.	Embryotransfer beim Rind.....	23
3.7.	Geschlechterverteilung bei Kälbern.....	25

III.	MATERIAL UND METHODEN.....	29
1.	Spermaproben.....	29
1.1.	Bullen.....	29
1.2.	Spermagewinnung und Spermabeurteilung.....	29
1.3.	Spermaverarbeitung.....	30
2.	Qualitätskontrolle hergestellter Spermaportionen – Standardprotokolle.....	31
2.1.	Computergestützte Spermienanalyse (CASA)	32
2.2.	Durchflusszytometrie.....	33
2.2.1.	Vorbereitungen am Durchflusszytometer und im Labor	33
2.2.2.	Probenvorbereitung für die durchflusszytometrische Analyse einschließlich Vorverdünnung.....	33
2.2.3.	Plasmamembranintegrität	35
2.2.4.	Mitochondrienmembranpotential	35
2.2.5.	Konzentration	36
3.	Laboruntersuchungen	37
3.1.	Computergestützte Spermienanalyse (CASA)	37
3.2.	Durchflusszytometrie.....	38
4.	Künstliche Besamungen (KB).....	40
4.1.1.	Standardbesamung.....	40
4.1.2.	High-volume-Besamung (HVB).....	40
4.2.	Routinemäßige Besamungen im Rahmen der natürlichen Brunst.....	42
4.3.	Routinemäßige Besamungen im Rahmen des Embryotransfers.....	43
4.3.1.	Spendertiere	43
4.3.2.	Superovulation und Besamung	43
4.3.3.	Embryonengewinnung und Beurteilung	44
5.	Statistische Auswertung	46
IV.	ERGEBNISSE.....	47
1.	Einfluss der Puffermedien auf die Spermaqualität	47
1.1.	Einfluss der Puffermedien auf die progressive Spermienmotilität.....	48
1.2.	Einfluss der Puffermedien auf durchflusszytometrische	

Spermaqualitätsparameter	49
1.2.1. Plasmamembranintegrität	49
1.2.2. Mitochondrienmembranpotential	50
2. Einfluss der Besamungsmethode auf das Ergebnis routinemäßiger KB und ET	51
2.1. Einfluss der Besamungsmethode auf das Ergebnis der routinemäßigen KB.....	51
2.1.1. Konzeptionsraten	52
2.1.1.1. Konzeptionsraten in Abhängigkeit von der Anzahl vorangegangener Besamungen.....	53
2.1.1.2. Konzeptionsraten in Abhängigkeit vom Paritätsstatus	54
2.1.2. Non-Return-Raten	55
2.1.3. Geburtenrate	56
2.1.4. Geschlechterverteilung der geborenen Kälber.....	56
2.2. Einfluss der Besamungsmethode auf das Ergebnis des routinemäßigen ET	58
2.2.1. Transfertaugliche Embryonen	58
2.2.2. Embryonenqualität.....	60
2.3. Kostengegenüberstellung Standardbesamung – HVB.....	62
V. DISKUSSION.....	63
1. Untersuchungen zur Eignung verschiedener Puffermedien als Trägermedium für die HVB	63
1.1. Das Puffermedium hat Einfluss auf die progressive Motilität der Spermien.....	64
1.2. Einfluss der Puffermedien auf PMI und MMP der Spermien	65
1.3. Die Medien unterscheiden sich in ihrer Eignung als Trägermedium	66
2. Die HVB ist kein Ersatz für die Standardbesamungsmethode	67
2.1. Für die praktische Anwendung der high-volume-Besamungsmethode waren Anpassungen notwendig	67
2.1.1. Besamungskatheter für die HVB	67
2.1.2. Auswahl des Trägermediums für die high-volume-Besamung	68
2.2. Der Besamungserfolg der high-volume-Besamung zeigte keinen	

	Unterschied zum Besamungserfolg der Standardbesamungsmethode	69
2.3.	HVB und Standard-KB unterscheiden sich kaum in der Embryonenqualität superovulierter Rinder	71
2.4.	Herausforderungen bei der praktischen Anwendung der HVB	73
2.5.	Einfluss der Besamungsmethode auf das Geschlecht des Kalbes	74
3.	Fazit für Wissenschaft und Praxis	77
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	79
VII.	SUMMARY	83
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	85
IX.	ANHANG	105
1.	Puffermedien	105
2.	Geräte, (Verbrauchs)Materialien und Medikamente	107
2.1.	Geräte.....	107
2.2.	(Verbrauchs)Materialien.....	109
2.3.	Medikamente	111
3.	Fluorochrome.....	111
4.	AndroVision® Setup-Einstellungen.....	112
5.	Mindestanforderungen an native Bullenejakulate	115
6.	Stationsspezifische Definition von Erst-, Zweit- und Drittbesamungen	115
7.	Superovulationprotokolle	116
8.	Ergebnistabellen	117
8.1.	Ergebnisse der Laboruntersuchungen.....	117
8.2.	Ergebnisse von routinemäßiger KB und ET.....	118
X.	DANKSAGUNG	121

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

®	registered (registrierte Marke)
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ADR	Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e. V.
AETA	American Embryo Transfer Association
ALH	seitlicher Spermienkopfausschlag (amplitude of lateral head displacement)
AR	Akrosomreaktion
ATP	Adenosintriphosphat
BCF	Anzahl der Kreuzungspunkte zwischen tatsächlicher und gemittelter Strecke (beat cross frequency)
BIVF	BO-IVF TM
bSPP	bovine Seminalplasmaproteine
BSPREP	BO-SemenPrep TM
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Calciumchlorid-Dihydrat
CASA	computergestützte Spermienanalyse (computer-assisted/aided-sperm-analysis)
CETA (ACTE)	Canadian Embryo Transfer Association (Association Canadienne de Transfert d'Embryons)
DAP	gemittelte Strecke (distance average path)
DCL	tatsächliche Strecke (distance curve line)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSL	direkte Strecke (distance straight line)
EB	Erstbesamung
EBB	EasyBuffer B
EBE	Erstbesamungserfolg
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
ET	Embryotransfer
et al	et alii
etc.	et cetera
Fa.	Firma

FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
HAC	zeitlich gemittelter Richtungswechsel des Spermienkopfes (head activity change)
hMMP	hohes Mitochondrienmembranpotential
HVB	high-volume-Besamung
HVI	high-volume-insemination
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheit(en)
IETS	internationale Embryotechnologiegesellschaft (International Embryo Technology Society)
IKZ	Inkubationszeit
IVF	In-Vitro-Fertilisation
JC-1	5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbo- cyanin Iodid
KB	Künstliche Besamung
KCl	Kaliumchlorid
KI	Konfidenzintervall
KR	Konzeptionsrate
LIN	Linearität der tatsächlichen Strecke (linearity)
MAD	zeitlich gemittelter Richtungswechsel des Spermienkopfes (mean angular displacement)
Max.	Maximum
MB	Massenbewegung
mFert-TALP	modifiziertes Fert-TALP
mg	Milligramm
MgCl ₂ · 6H ₂ O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
Min.	Minimum
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Mitochondrienmembranpotential
MOPs Puffer	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mosmol	Milliosmol
mV	Millivolt

NaC ₃ H ₅ O ₃	Natriumlactat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
NRR	Non-Return-Rate
NRR 30	Non-Return-Rate am Tag 30
NRR 56	Non-Return-Rate am Tag 56
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline)
PHE	Penicillin-Hypotaurin-Epinephrin
PI	Propidiumiodid
PMAI	Plasmamembran- und akrosomintakte Spermien
PMI	Plasmamembranintegrität/Plasmamembranintaktheit
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
rad	Radiant
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
STR	Linearität der gemittelten Strecke (straightness)
TALP	Tyrodé's-Albumin-Laktat-Pyruvat-Medium
TG-	Tiefgefrier-
™	trade mark (angemeldete Marke)
VAP	Geschwindigkeit bezogen auf die gemittelte Strecke (velocity average path)
VB	Vorwärtsbeweglichkeit
VCL	Geschwindigkeit bezogen auf die tatsächliche Strecke (velocity curvilinear line)
vgl.	Vergleiche
VSL	Geschwindigkeit bezogen auf die direkte Strecke (velocity straight line)
WOB	Abweichung der tatsächlichen von der gemittelten Strecke (wobble)
\bar{x}	Mittelwert
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Die künstliche Besamung (KB) ist auf Grund ihrer Einfachheit, Wirtschaftlichkeit und Effizienz eine der bedeutsamsten Reproduktionstechnologien und stellt ein wichtiges Werkzeug bei der Verbreitung und Verbesserung der Genetik im Rinderbestand dar (VISHWANATH, 2003). Sie ist definiert als Einbringen von gewonnenem Sperma in den weiblichen Reproduktionstrakt unter Verwendung eines Instruments und ist die älteste Methode unter den assistierten Reproduktionstechnologien (BOLS et al., 2009). Lag zu Beginn der KB der Fokus auf der Eindämmung von durch den natürlichen Deckakt übertragenen Infektionskrankheiten (Deckseuchen), sind es heute vor allem tierzüchterische Aspekte. Mit der KB wurde die Möglichkeit zur zeitlich und örtlich unabhängigen Anpaarung von ausgewählten Elterntieren geschaffen (BUSCH und WABERSKI, 2007). Ziel der KB ist es, zum Zeitpunkt der Ovulation ein Reservoir an befruchtungsfähigen, also kapazitierten und motilen Spermien im kaudalen Eileiteristhmus zu schaffen und damit die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Befruchtung zu erhöhen (DISKIN, 2018). Als Standardbesamungsmethode hat sich dabei die bereits in den 1940er Jahren entwickelte tiefe zervikale oder intrauterine Besamung durchgesetzt, bei der die Zervix über das Rektum fixiert wird (LÓPEZ-GATIUS, 2000).

Mit der Einführung der genomischen Zuchtwertschätzung im Jahre 2010 wurde auch in der Rinderzucht das Generationsintervall erheblich verkürzt. Auf Grund ihrer genomischen Zuchtwerte interessante Jungbullen werden bereits mit Eintritt in die Geschlechtsreife an Besamungsstationen für die Spermagewinnung eingestellt (STROTHMEYER, 2013), in der KB eingesetzt und, ebenso wie zuchtwertstarke, weibliche Jungtiere, über den Embryotransfer genutzt. Um jedoch die steigende Nachfrage nach Sperma von Top-Bullen bedienen zu können, ist seitens der Zuchtorganisationen eine Optimierung des Samenproduktionsprozesses bezüglich Spermaqualität und Anzahl der produzierten Portionen bei gleichbleibenden oder verbesserten Befruchtungsergebnissen im Rahmen der KB erstrebenswert. Obwohl der Fruchtbarkeit ein multifaktorielles Geschehen zu Grunde liegt, wird mit Hilfe von modernen spermatologischen Testverfahren versucht, Korrelationen zwischen Spermienfunktionsparametern und der Fertilität festzustellen, um Bullen mit reduzierter Spermaqualität und/oder schlechter Befruchtungsfähigkeit möglichst frühzeitig im Produktionszyklus ausfindig zu machen (UTT, 2016; MORRELL et al.,

2017; BUCHER et al., 2019).

Studien zu neuen Besamungstechniken, mit dem Ziel, die Besamung noch wirtschaftlicher zu machen und Bullen dadurch noch effizienter nutzen zu können, lieferten bisher nur bedingt bessere Ergebnisse und konnten sich bis heute nicht gegen die Standardbesamungsmethode behaupten. Die Idee, Spermapailletten von begrenzt verfügbaren oder züchterisch interessanten Bullen vor der Besamung zu teilen, um mehrere Kälber aus einer Besamungsportion zu erzeugen, stellt auf Grund des bereits geringen Besamungsvolumens von 0,25 bis 0,5 ml und der praktischen Umsetzung eine Herausforderung dar. Eine high-volume-Besamung (HVB), bei der das Sperma vor der Besamung mit einem spermienfreundlichen Medium verdünnt wird, könnte die Lösung für dieses Problem sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es einerseits, den Einfluss von vier verschiedenen Puffermedien auf Qualitätsparameter boviner Spermien zu untersuchen, um daraus Rückschlüsse auf ihre potentielle Eignung als Trägermedium für die HVB zu ziehen. Andererseits wurde die HVB sowohl bei der routinemäßigen Besamung im Rahmen der natürlichen Brunst als auch bei der routinemäßigen Besamung von superovulierten Rindern angewendet und mit der Standardbesamungsmethode in Bezug auf die Besamungs- und Befruchtungsergebnisse sowie die Praktikabilität verglichen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Spermatologie des Bullen

1.1. Physiologie der Spermatogenese

Die Spermatogenese beschreibt die kontinuierliche Bildung von Spermatozoen aus undifferenzierten Keimzellen, den Typ A-Spermatogonien, die in den Tubuli seminiferi des Hodens stattfindet und mit Beginn der Geschlechtsreife einsetzt (HOLSTEIN et al., 2003). Die Geschlechtsreife erreichen Bullen der Art *Bos taurus* mit 6 bis 12 Monaten (BRITO, 2015b). Die Spermatogenese kann in drei Phasen – Spermatozytogenese (Proliferation), Meiose und Spermiogenese (Differenzierung) – untergliedert werden, die beim Rind 21, 23 und 17 Tage, also insgesamt 61 Tage dauern (STAUB und JOHNSON, 2018). Ihr schließt sich als letzter Reifungsschritt die beim Rind etwa 14-tägige Nebenhodenpassage an (SINOWATZ, 2001), bei der die Spermien verschiedene biochemische (Modulation und Reorganisation von Plasmamembran und Akrosom) und morphologische (Abstreifung des Zytoplasmatröpfchens) Reifungsprozesse durchlaufen und ihre gerichtete Vorwärtsbeweglichkeit und vorläufige Befruchtungsfähigkeit erlangen (IGBOELI und FOOTE, 1968; SINOWATZ, 2001; TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001; TÖPFER-PETERSEN, 2007). Bis zur Ejakulation erfolgt die Speicherung im Nebenhodenschwanz, wo die Spermien auf Grund des sauren Milieus in ihrer Beweglichkeit gehemmt werden (LIEBICH, 2004).

1.2. Morphologie des Spermiums

Eine morphologisch intakte, ausgereifte Säugetierspermienzelle wird in zwei Abschnitte unterteilt: Kopf und Schwanz (GERTON und VADNAIS, 2018). Elektronenmikroskopisch lässt sich der Schwanz zusätzlich in ein kurzes Verbindungsstück, die Halsregion, sowie Mittel-, Haupt- und Endstück gliedern (SINOWATZ, 2001; LIEBICH, 2004; GERTON und VADNAIS, 2018). Das gesamte Spermium wird von einer Plasmamembran ummantelt (FAWCETT, 1975; WU, 2005). Der bilateral abgeflachte Spermienkopf besteht aus dem Kern, der mit dem hochkondensierten Chromatin die paternale Erbinformation enthält und von einer Kernmembran umgeben ist (WABERSKI, 2007; BERRUTI und PAIARDI, 2011). Im vorderen Abschnitt ist der Nukleus zu etwa zwei Drittel vom Akrosom bedeckt, das den Spermienkopf in einen akrosomalen und postakrosomalen Abschnitt unterteilt

(FAWCETT, 1975; SCHNABEL, 2009). Das auf das distale Zentriol zurückzuführende Axonem (AVIDOR-REISS et al., 2020) durchzieht als zentrale Struktur den Spermenschwanz bis in das Endstück und ist mit seinen auf Adenosintriphosphat (ATP)-Hydrolyse basierenden Krümmungen der Motor der Spermienzelle (FAWCETT, 1975; ROVAN, 2001; WABERSKI, 2007). Die im Mittelstück das Axonem und die äußeren Mantelfasern umgebenden Mitochondrien werden im Hauptstück von einer Proteinschicht abgelöst (SINOWATZ, 2001). Das abschließende Endstück besteht nur noch aus dem Axonem (ROVAN, 2001).

1.2.1. Plasmamembran

Die Plasmamembran ist eine Doppellipidschicht mit Phospholipiden, in die Moleküle und Membranproteine eingelagert sind, und besitzt damit die molekulare Bauweise von Biomembranen (ROVAN, 2001). Sie wirkt als physiologische Barriere. Ihre Intaktheit ist Voraussetzung für die Lebensfähigkeit der Spermienzelle und steht in direktem und indirektem Zusammenhang mit zahlreichen Zellfunktionen. Dazu zählen die Zellhomöostase der Spermienzelle selbst sowie Interaktionen mit anderen Zellen und der Spermienumwelt, wie der Epithelschicht im weiblichen Genitaltrakt und den die Eizelle umgebenden Kumuluszellen (HOSSAIN et al., 2011; PETRUNKINA und HARRISON, 2013).

1.2.2. Mitochondrien und Mitochondrienmembranpotential

Die im Mittelstück spiralförmig, bei bovinen Spermien in 65–75 Windungen angeordneten, längsovalen Mitochondrien sind durch ihre ATP-Produktion das energetische Kraftwerk der Spermienzelle und für die Vorwärtsbewegung der Spermien verantwortlich. Bei ihrem Aufbau unterscheidet man eine äußere, glatte und eine innere, stark gewundene Membran, die die Mitochondrienmatrix umschließt. Zwischen den beiden Membranen befindet sich der Membranzwischenraum (SINOWATZ, 2001; AMARAL et al., 2013).

Für die ATP-Synthese stehen der Spermienzelle grundsätzlich zwei Stoffwechselprozesse zur Verfügung: Die Glykolyse, die im Spermienkopf sowie im Hauptteil abläuft und die sehr viel effizientere oxidative Phosphorylierung, die an der inneren Membran der Mitochondrien erfolgt (PAOLI et al., 2011; LUO et al., 2013). Bei letztgenannter wird im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette über eine Elektronentransportkette ein Protonengradient generiert, der sich aus einer chemischen Komponente, dem pH-Gradienten und einer elektrischen Komponente, auch als

Mitochondrienmembranpotential (MMP) bezeichnet, zusammensetzt. Die dabei aktiv über Protonenpumpen aus der Matrix in den Intermembranraum geschleusten Protonen gelangen beim folgenden Ausgleich des Ladungs- und Konzentrationsunterschiedes über die ATP-Synthase, einem Kanalprotein der inneren Mitochondrienmembran, wieder zurück in die Mitochondrienmatrix. Es kommt zur Phosphorylierung von Adenosindiphosphat zu ATP (SADAVA et al., 2011; AMARAL et al., 2013). Die Gesamtenergie des elektrochemischen Gradienten umfasst bei funktionellen Mitochondrien circa -240 mV, wovon der Hauptteil, -180 bis -200 mV, auf das MMP zurückzuführen ist (REERS et al., 1995; COSSARIZZA et al., 1996). Die Messung der Höhe des MMP gibt Auskunft über die Aktivität von Atmungs- und Elektronentransportkette und erlaubt eine Beurteilung des Energiestatus der Spermienzellen (REERS et al., 1995; PAOLI et al., 2011). Innerhalb eines Ejakulats lassen sich dabei anhand des MMP verschiedene Spermienpopulationen unterscheiden (SOUSA et al., 2011; AGNIHOTRI et al., 2016).

2. Qualitätsuntersuchung von Bullenejakulaten

2.1. Konventionelle Analyse eines Ejakulats

Die sich in der Regel direkt an die Spermagewinnung anschließende konventionelle Ejakulatanalyse beinhaltet die makroskopische und mikroskopische Spermienbeurteilung sowie physikalisch-chemische Analysen.

Bei der makroskopischen Untersuchung wird das Volumen des Ejakulats bestimmt sowie Aussehen (Farbe, Konsistenz, Beimengungen) und Geruch beurteilt (WABERSKI und PETRUNKINA, 2007). Natives Bullensperma weist physiologisch eine elfenbeinfarben bis weißlich-gelbliche Farbe auf, ist in seiner Konsistenz rahmig bis milchig, frei von jeglichen Beimengungen und geruchsneutral. Das Mindestejakulatvolumen liegt bei 2 ml (Jungbullen, ≤ 2 Jahre) bzw. 4 ml (Altbullen, > 2 Jahre) (ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2006a). Pathologisch sind Rot-, Braun-, Grau- und Grünfärbungen (Blut, Verunreinigungen, Eiter), eine molkige oder wässrige Konsistenz (Oligospermie, Aspermie) sowie urinartiger oder fauliger Geruch (WEITZE, 2001c; WABERSKI und PETRUNKINA, 2007). Im Rahmen der mikroskopischen Untersuchung werden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops die Einzelbewegung der Spermien sowie Fremdzellgehalt, Auftreten von Agglutination und Spermienmorphologie beurteilt (WEITZE, 2001c). Die Beurteilung der Massenbewegung (MB) der

Spermien (keine MB [-] bis sehr gute MB [++]) erfolgt im Hellfeld. Qualitativ hochwertige Ejakulate weisen eine Vorwärtsbeweglichkeit (VB) von mindestens 70 % auf, enthalten weniger als 20 % morphologisch veränderte Spermien und zeigen eine ungestörte MB [++] (ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2006a). Bei Auffälligkeiten kann eine chemisch-physikalische Untersuchung mit Bestimmung von pH-Wert (physiologisch 6,4 bis 7,0) und Osmolarität (physiologisch 280 bis 300 mosmol) zusätzliche Informationen liefern (WABERSKI und PETRUNKINA, 2007). Für die Ermittlung der Spermienkonzentration im nativen Ejakulat stehen verschiedene Methoden mit unterschiedlicher Genauigkeit zur Verfügung: Zählkammer, Durchflusszytometrie, Photometer, Coulter Counter und CASA-System. Sie wird in der Einheit Spermien $\times 10^6/\text{ml}$ angegeben und ergibt multipliziert mit dem Ejakulatvolumen die Spermiengesamtzahl (WEITZE, 2001c; WABERSKI und PETRUNKINA, 2007).

Die Mindestanforderungen für natives Bullensperma sind in der ADR-Empfehlung 8.2 „Anforderungen an Zuchtbullen für den Einsatz in der KB und für Deckbullen“ der Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter e. V. (ADR) vermerkt und im Anhang in Tabelle 12 zur Übersicht zusammengefasst (ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2006a).

2.2. Moderne spermatologische Testverfahren

Moderne spermatologische Testverfahren ermöglichen im Vergleich zu konventionellen Untersuchungsverfahren (Motilitätsschätzung, Morphologie) die Analyse einer großen Spermienpopulation unter Berücksichtigung der Heterogenität der Spermienzellen (WABERSKI und PETRUNKINA, 2007; PETRUNKINA et al., 2008; CONTRI et al., 2010; VINCENT et al., 2021).

2.2.1. Computergestützte Spermienanalyse (CASA = computer assisted/aided sperm analysis)

Die computergestützte Spermienanalyse erlaubt eine präzise und individuelle Motilitätsanalyse von Spermien innerhalb einer Population. Auf Grund der im Vergleich zur konventionellen Motilitätsschätzung größeren Objektivität der Ergebnisse können exaktere Aussagen zur Qualität und potentiellen Befruchtungsfähigkeit von Ejakulaten getroffen werden (AMANN und KATZ, 2004; AMANN und WABERSKI, 2014). Über eine an das Mikroskop gekoppelte Kamera werden Bildabfolgen bzw. Videosequenzen der Spermeproben aufgenommen, die kinetischen

Parameter anhand spezieller Computersoftware-Algorithmen berechnet (VINCENT et al., 2012) und die Spermien unterschiedlichen Motilitätskategorien zugeordnet (MORTIMER, 2000; AMANN und WABERSKI, 2014). Der Spermienkopf ist als Spermenschwerpunkt (Centroid) festgelegt und dient zur Erfassung der Positionsveränderung des Spermiums (MORTIMER, 2000).

Durch die stetige Weiterentwicklung der CASA-Systeme und die damit einhergehenden Verbesserungen in den Bereichen Optik, Belichtung, Bildverarbeitung sowie auf Hardware- und Softwareebene ist heutzutage innerhalb einer kurzen Zeitspanne die präzise Analyse einer großen Spermienanzahl möglich, was zu einer erhöhten statistischen Sicherheit führt (BEHR, 2010). Dennoch hat eine Vielzahl von Faktoren wie Probe (Spezies, Verdünner, Spermienkonzentration), Probenaufarbeitung (Medium, Temperatur, Verdünnungsfaktor), Messutensilien (Objektträger, Probenkammer, Pipettenspitzen), Mikroskop (Beleuchtungsstärke, temperierter/nicht temperierter Kreuztisch), Kamera (Auflösung), Computersystem (Analysehardware und -software, Bildrate/-frequenz, Auswertungsalgorithmen), Untersuchungstechnik (Pipettiertechnik, Anzahl der Messfelder), Untersucher (Erfahrung), experimentelles Design etc. Einfluss auf die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messergebnisse (DAVIS und KATZ, 1993; HOLT et al., 1994; CONTRI et al., 2010; KATHIRAVAN et al., 2011; AMANN und WABERSKI, 2014). Auf Grund dieser unzähligen Einflussfaktoren und der Tatsache, dass eine Standardisierung des Untersuchungsablaufs im Gegensatz zur Humanmedizin (ESHRE ANDROLOGY SPECIAL INTEREST GROUP, 1998) für Ejakulate landwirtschaftlicher Nutztiere bisher nicht vorhanden ist, gestaltet sich ein Vergleich von CASA-Ergebnissen unterschiedlicher Labore jedoch als schwierig.

2.2.2. Durchflusszytometrische Spermienuntersuchung

Basierend auf der Emission von Lichtsignalen ist die Durchflusszytometrie ein objektives Verfahren, das sich ideal für die Analyse von heterogenen Zellpopulationen wie Spermien eignet (GIVAN, 2001; GILLAN et al., 2005; WABERSKI und PETRUNKINA, 2007). Durch die Möglichkeit der multiparametrischen Spermienanalyse können für jede Spermienzelle einer Probe verschiedene Qualitätsparameter gleichzeitig analysiert werden, ohne dass diese Einzeldaten bei der Datenverarbeitung und Auswertung verloren gehen (GILLAN et al., 2005; WABERSKI und PETRUNKINA, 2007; PETRUNKINA und HARRISON, 2013; BUCHER et al., 2019).

Die mit Fluorochromen angefärbten, in einer Suspension vorliegenden Zellen durchlaufen mit hoher Geschwindigkeit ein Kapillarsystem und passieren dabei einen oder mehrere Laser (VINCENT et al., 2012). Die dabei absorbierte Energie wird bei der Rückkehr der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau als Fluoreszenz, Licht einer bestimmten Wellenlänge, frei und ist von der Energiemenge der Photonen abhängig (GIVAN, 2001; WABERSKI und PETRUNKINA, 2007). Mit Hilfe von Detektoren werden die Fluoreszenzstärken erfasst, in elektronische Signale umgewandelt und mittels Software digitalisiert und ausgewertet (VINCENT et al., 2012). Nicht an die Spermienzellen gebundene Fluorochrome werden nicht berücksichtigt und müssen deshalb vor der Analyse nicht aus der Probe entfernt werden (GRAHAM, 2001; NAGY et al., 2003). Fluoreszenzunabhängige Streulichtparameter (Vorwärtsstreulicht = forward scatter (FSC), Seitwärtsstreulicht = side scatter (SSC)), die auf der Größe sowie Komplexität und Granularität der Partikel beruhen, ermöglichen eine Abgrenzung der Spermien von anderen Partikeln wie Bakterien, Blutzellen, Epithelzellen, Zellbruchstücken und Verdünnerteilchen (z. B. Eigelb) und deren Ausschluss von der fluoreszenzgebundenen Analyse (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2010; MCKINNON, 2018).

2.2.2.1. Untersuchung der Plasmamembranintegrität mittels SYBR® 14/PI-Färbung

Die am häufigsten verwendete Fluorochromkombination zur Untersuchung der Plasmamembranintegrität (PMI) und Differenzierung zwischen lebenden und toten Spermien ist SYBR® 14 und Propidiumiodid (PI) (GARNER et al., 1994; KRIENKE, 2003; HOSSAIN et al., 2011). Beide Fluoreszenzfarbstoffe haben die DNA als Zielstruktur und lassen sich mit Hilfe von sichtbarem Licht (488 nm) anregen (GARNER und JOHNSON, 1995). Während SYBR® 14 membranpermeabel ist und zu grüner Fluoreszenz aller Spermienköpfe – unabhängig von der Plasmamembranintegrität – führt, ist PI membranimpermeabel und kann nur bei geschädigter Plasmamembran in die Spermazelle eindringen und dabei das an die DNA angeheftete SYBR® 14 verdrängen. Es kommt zu roter Fluoreszenz (GARNER et al., 1994; GARNER und JOHNSON, 1995; MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2010; HOSSAIN et al., 2011). Bei der Dualfärbung mit SYBR® 14 und PI können drei Spermienpopulationen differenziert werden. Lebende Spermien fluoreszieren grün, tote Spermien rot und moribunde Spermien zeigen sowohl rote als auch grüne Fluoreszenz (GARNER et al., 1994; GARNER und JOHNSON, 1995).

2.2.2.2. Untersuchung des Mitochondrienmembranpotentials mittels JC-1-Färbung

Die durchflusszytometrische Differenzierung von Spermien anhand ihres MMP kann mit Hilfe des Fluorochroms 5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Iodid (JC-1) erfolgen. Bei niedrigem MMP liegt JC-1 als Monomer vor und weist eine grüne Fluoreszenz auf. Mit steigendem MMP, also zunehmender negativer Ladung der Mitochondrienmatrix, lagert sich das lipophile Kation vermehrt in die Mitochondrien ein und bildet reversibel Aggregate, die rot-orange fluoreszieren (REERS et al., 1991; COSSARIZZA et al., 1996; PERELMAN et al., 2012). Als Schwellenwert für die Aggregatbildung gilt ein MMP von -100 mV (REERS et al., 1995). Das Rot-Grün-Fluoreszenzverhältnis wird bei JC-1 ausschließlich vom MMP bestimmt und ist unabhängig von Größe, Form und Dichte der Mitochondrien sowie im physiologischen pH-Bereich auch pH-unabhängig. Vergleichende Messungen des MMP ermöglichen die Reaktion der Mitochondrien auf verschiedene Stimuli zu bestimmen (SMILEY et al., 1991; THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.). So führte die präanalytische Behandlung von Spermaproben mit Spermiziden und oxidativen Entkopplern zu einer drastischen Reduktion des MMP (MARCHETTI et al., 2004; AGNIHOTRI et al., 2016).

Eine (positive) Korrelation zwischen MMP und Spermienmotilität wird von mehreren Autoren beschrieben (GARNER und THOMAS, 1999; PAOLI et al., 2011; AGNIHOTRI et al., 2016). GARNER und THOMAS (1999) konnten nicht nur eine Korrelation zwischen dem Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential (hMMP) und der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien, sondern auch zwischen dem prozentualen Anteil an Spermien mit hMMP (82,6 %) und plasmamembranintakten Spermien (80,1 %) aufzeigen. MARCHETTI et al. (2004) verzeichneten im Rahmen der In-Vitro-Fertilisation (IVF) höhere Fertilitätsraten, wenn Spermien mit hohem MMP verwendet wurden.

2.3. Einflussfaktoren auf die Qualität von Bullensperma

Die Spermaqualität ist beim Bullen von unzähligen Faktoren abhängig. Neben Individuums- (Rasse, Alter, Libido, Genetik, Krankheit) und Umweltfaktoren (Hal tung, Fütterung, Management, Temperatur und Klima, Jahreszeit/Saison), die vor der Spermagewinnung die Spermaqualität beeinflussen, haben auch die Arbeitsschritte während der Spermagewinnung und -prozessierung (Absamfrequenz, Bullenpfleger/Absamer, Samenverarbeitung, Verdünner, Abkühl- und Einfrierprozess)

und bis zur eigentlichen Besamung (Lagerung, Auftauen, Samenhandling) bedeutenden Einfluss auf die Spermaqualität und den damit verbundenen Besamungserfolg.

2.3.1. Individuumsfaktoren

Bei den Individuumsfaktoren ist zuallererst der Genotyp zu nennen, dessen Einfluss auf die Spermaqualität bereits in mehreren Studien untersucht wurde (FIELDS et al., 1979; ASAD et al., 2004; BOUJENANE und BOUSSAQ, 2014; LEMMA und SHEMSU, 2015; HIRWA et al., 2017; PANDA et al., 2017; ISLAM et al., 2018; BERRY et al., 2019).

Auch das Alter, mit dem Bullen die Pubertät, und somit die Fähigkeit eine adäquate Anzahl an Spermien zu produzieren, erreichen, stellt eine rasseabhängige Variable dar, wobei auch innerhalb einer Rasse Unterschiede festzustellen sind (FIELDS et al., 1979; LUNSTRA und ECHTERNKAMP, 1982; BRITO, 2015a). Bullen der Art *Bos taurus* sind grundsätzlich früher geschlechtsreif als Bullen der Art *Bos indicus* und Bullen von milchbetonten Rassen erreichen die Pubertät vor Fleischbulle (BRITO, 2015a). Mit zunehmendem Alter der Bullen ist grundsätzlich eine Verbesserung der Spermaqualität in Hinblick auf das Ejakulatvolumen und die Spermiengesamtzahl zu beobachten, die im Alter zwischen 6 und 10 Jahren ein Maximum erreicht, bevor es letztendlich wieder zu einem Rückgang kommt. Die Volumenzunahme des Ejakulats ist dabei auf die Zunahme der Körpermasse und das damit einhergehende Wachstum der Hoden zurückzuführen (FIELDS et al., 1979; TAYLOR et al., 1985a; STÄLHAMMAR et al., 1989; MATHEVON et al., 1998; BRITO et al., 2002a; ASAD et al., 2004; FUERST-WALTL et al., 2006; MAJIĆ BALIĆ et al., 2012; BERRY et al., 2019).

Neben spezifischen Erkrankungen des männlichen Geschlechtsapparates (angeborene Missbildungen, entzündliche Prozesse, Traumata, etc.) (BUSCH, 2001a; BARTH, 2015) haben auch hormonell bedingte Dysfunktionen (BUSCH, 2001a) sowie (fiebrhafte) Allgemeinerkrankungen unterschiedlichen Ursprungs (bakteriell, viral, parasitär, toxisch, etc.) negative Auswirkungen auf die Spermaqualität (BUSCH, 2001b).

2.3.2. Umweltfaktoren

Bei den Umweltfaktoren sind zunächst meteorologische Einflussfaktoren wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Tageslänge zu nennen. Unzählige Studien wurden

diesbezüglich bereits im Rinderbereich durchgeführt (EVERETT und BEAN, 1982; STÄLHAMMAR et al., 1989; BRITO et al., 2002b; ASAD et al., 2004; NICHI et al., 2006; FIAZ et al., 2010; IGNA et al., 2010; MAJIĆ BALIĆ et al., 2012; HIRWA et al., 2017; MALAMA et al., 2017), die in den meisten Fällen einen Einfluss der Saison auf die Spermaqualität aufzeigen konnten, jedoch mit unterschiedlichen Ergebnissen. FUERST-WALTL et al. (2006) konnten einen nicht linearen, negativen Zusammenhang zwischen Umgebungstemperatur und prozentualem Anteil an lebenden Spermien aufzeigen und legten den optimalen Temperaturbereich der Bullenumgebung mit +5 bis +15 °C fest. Die Temperatur nimmt dabei nicht nur am Tag der Spermagewinnung, sondern bereits während der Spermatogenese sowie zum Zeitpunkt der Nebenhodenreifung Einfluss auf die Spermaqualität (FUERST-WALTL et al., 2006; IGNA et al., 2010).

Einen weiteren Umweltfaktor stellt die Fütterung dar, wobei sich sowohl eine zu extensive (BROWN, 1994) als auch eine zu intensive Fütterung negativ auf die Spermaqualität auswirken können (SWANEPOEL et al., 2008). Im Zusammenhang mit der Fütterung ist auch auf die Wichtigkeit von Spurenelementen wie Zink, Selen, Kupfer, Jod, Eisen, Molybdän und Mangan hinzuweisen, die bei der Steuerung vieler Körperprozesse eine essentielle Rolle spielen und deren Mangel sich unter anderem in einer verminderten Fertilität bemerkbar macht (LEONHARD-MAREK, 2001). Mit dem Futter können auch Schadstoffe wie Pestizide, Düngemittel, Toxine, Arzneimittel etc. aufgenommen werden, die die Spermaqualität negativ beeinflussen (GLOBS, 2001).

2.3.3. Einflussfaktoren bei Spermagewinnung und -prozessierung

Beim eigentlichen Prozess der Spermagewinnung wird vor allem der sexuellen Stimulation des Bullen eine wichtige Rolle zuteil. Sogenannte Blindsprünge stellen dabei eine der effektivsten Methoden dar, um das Ejakulatvolumen und die Spermienkonzentration zu erhöhen (COLLINS et al., 1951; ALMQUIST, 1973; SCHENK, 2018), und haben zudem positive Auswirkungen auf die progressive Motilität und den Anteil an plasmamembranintakten Spermien nach der Tiefgefrierung (PONGSIRI et al., 2020).

Ein (signifikanter) Einfluss auf Qualitätsparameter von Spermaproben konnte für das Gewinnungsintervall (SEIDEL und FOOTE, 1969; MATHEVON et al., 1998; FUERST-WALTL et al., 2006; BERRY et al., 2019) sowie Bullenführer und

Absamer aufgezeigt werden (MATHEVON et al., 1998; FUERST-WALTL et al., 2006). Die Ausweitung des Spermagewinnungsintervalls von 4 bis 6 Tagen auf über 10 Tage führte zwar zu einer Zunahme von Volumen (5,6 versus 6,2 ml) und Gesamtspermienzahl ($6,1 \times 10^9$ versus $6,7 \times 10^9$), hatte jedoch auch eine Reduktion des Anteils an progressiv motilen Spermien (66,8 % versus 66,3 %) und der Spermienkonzentration ($1,14 \times 10^9/\text{ml}$ versus $1,11 \times 10^9/\text{ml}$) zur Folge (FUERST-WALTL et al., 2006). Das größte Ejakulatvolumen sowie die höchste Spermienkonzentration konnten MATHEVON et al. (1998) bei Holsteinbullen mit einem Absamintervall von 4 bis 7 Tagen bei Jungbullen (< 30 Monate) und 5 Tagen bei Altbullen erzielen. Werden mehrere Ejakulate pro Bulle und Tag gewonnen, so sind die Erstejakulate den nachfolgenden in Volumen und Spermienkonzentration überlegen (TAYLOR et al., 1985a; FUERST-WALTL et al., 2006).

Im Rahmen der Spermienprozessierung, vor allem beim Prozess der Tiefgefrier-(TG)-konservierung, sind die Spermien osmotischen, chemischen, thermischen und mechanischen Einflüssen ausgesetzt (VISHWANATH und SHANNON, 2000). Die Verarbeitungsprotokolle für Spermaproben bezüglich Verdüner, Verdünnungsschema, Abkühlraten und Äquilibrierzeiten, Einfriermethoden etc. variieren sehr stark, auch innerhalb von Besamungsstationen (VISHWANATH und SHANNON, 2000; AMIRAT et al., 2004; WEITZE und PETRUNKINA, 2007) und haben Einfluss auf die im Labor bestimmten Spermaqualitätsparameter sowie Non-Return-(NRR) bzw. Fertilitätsraten. Dabei sind Unterschiede auf Individuumsebene zu verzeichnen (GIL et al., 2000; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000; THUN et al., 2002; CRESPILOHO et al., 2014; LAYEK et al., 2016; KHALIL et al., 2019; ASSUNÇÃO et al., 2021).

LEITE et al. (2010) untersuchten die Auswirkungen unterschiedlicher Äquilibrierzeiten und Verdüner (BioXcell[®] (Fa. IMV Technologies, L'Aigle, Frankreich), Tris-Eigelb-Glycerol (TRIS)) auf Spermaqualitätsparameter. Sie äquilibrierten die verdünnten Spermaproben nach der Abkühlphase für 0, 2 und 4 Stunden bei +5 °C, bevor die Spermaproben tiefgefroren und in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Bei beiden Verdünnern war mit zunehmender Äquilibrierzeit eine Verbesserung der Spermaqualitätsparameter (totale und progressive Motilität, PMI, Akrosomentaktheit) zu beobachten, wobei der TRIS-Verdüner bessere Ergebnisse lieferte. Einzig auf das MMP hatte weder die Äquilibrierzeit noch der Verdüner Einfluss. Auch FLEISCH et al. (2017) beschäftigten sich mit den Auswirkungen

unterschiedlicher Äquilibrierzeiten (4, 24, 48, 72, und 96 Stunden) und Verdüner (OPTIXcell[®] (Fa. IMV Technologies, L´Aigle, Frankreich), AndroMed[®], Triladyl[®] (beide Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach)) auf die Spermaqualität vor und nach der TG-Konservierung. Zunehmende Äquilibrierzeiten hatten vor der Tiefgefrierung eine Abnahme der Spermienmotilität und der plasmamembran- und akrosomintakten Spermien (PMAI) zur Folge. Nach der TG-Konservierung erzielten zu beiden Untersuchungszeitpunkten (0 und 3 Stunden nach dem Auftauen) die Proben mit 24 Stunden Äquilibrierzeit die besten Ergebnisse bei Motilität und PMAI, während über 24 Stunden hinausgehende Äquilibrierzeiten zu einer Abnahme dieser Qualitätsparameter führten. Die schlechtesten Ergebnisse, sowohl vor als auch nach der TG-Konservierung, lieferten dabei die mit AndroMed[®] verdünnten Proben. Während direkt nach dem Auftauen in Bezug auf die Äquilibrierzeiten kein Unterschied beim Anteil an lebensfähigen Spermien mit hMMP aufgezeigt werden konnte, lag dieser nach 3 Stunden Inkubation für 48 Stunden und mehr Äquilibrierzeit deutlich unter jenem für 4 und 24 Stunden. Die besten Ergebnisse für das MMP wurden in der genannten Studie zu beiden Analysezeitpunkten mit dem OPTIXcell[®]-Verdünner erzielt.

Eine zu schnelle Abkühlung der Spermachargen geht mit einem Kälteschock der Spermien einher (WEITZE, 2001b; WEITZE und PETRUNKINA, 2007). Der sich der Äquilibrierung anschließende Einfrierprozess stellt ebenso wie der Auftauprozess einen kritischen Arbeitsschritt dar und bedingt die größten Einbußen bei der Spermaqualität, wobei der kritische Temperaturbereich zwischen -15 und -60 °C liegt (GRÖTTER et al., 2019).

Die Spermaqualität kann auch noch im Anschluss an den TG-Prozess bis zur eigentlichen Besamung beeinflusst werden. Untersuchungen im Feld haben gezeigt, dass die unterschiedliche Handhabung von TG-Pailletten durch Besamungstechniker Einfluss auf die Spermienmotilität hat und sich letztendlich auch in den NRR widerspiegelt (JANETT et al., 2008). Auch Auftautemperatur und -zeit beeinflussen die Spermaqualität (NUR et al., 2003; LYASHENKO, 2015).

3. Künstliche Besamung beim Rind

Die künstliche Besamung ist die Methode der Wahl, wenn es um die Verbreitung von wertvollem genetischen Material geht und stellt für Landwirte weltweit das wichtigste Werkzeug zur Verbesserung der Herdengenetik dar (FOOTE, 2002; VISHWANATH, 2003; BOLS et al., 2009).

Als Indikator für den Besamungserfolg dient in der Regel die NRR, die den prozentualen Anteil der erstbesamten Rinder an der Gesamtheit erstbesamter Rinder beschreibt, der bis zu einem festgelegten Tag nicht erneut zur Besamung vorstellig (WEITZE, 2001a) und daher als trächtig eingestuft wird (BUSCH, 2007b). Die NRR ist nicht nur vom Paritätsstatus (Kalbin, Kuh) und Alter des weiblichen Tieres, sondern auch von Bulle, Umwelteinflüssen, Besamungszeitpunkt, Besamungstechniker (berufliche Erfahrung, Besamungsgebiet) und vielen weiteren Einflussfaktoren abhängig (TAYLOR et al., 1985b; REURINK et al., 1990; FOUZ et al., 2011; HOEDEMAKER et al., 2014). Die im Rahmen der Augustzuchtwertschätzung 2009 für Deutschland und Österreich erfassten NRR 56 der Rasse Fleckvieh lagen für Kühe mit 65,6 % deutlich unter jener der Kalbinnen (77,6 %) (FUERST und GREDLER, 2009). Neuere Daten liegen zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor. Während die durchschnittliche NRR 56 aller Besamungstechniker und Tierärzte, die Sperma über die Bayern-Genetik GmbH beziehen, 2020 bei 67,7 % lag, war mit Minimum 55,8 % und Maximum 73,7 % eine Differenz von fast 20 % zwischen den NRR 56 der einzelnen Besamungstechniker zu verzeichnen. Die Daten wurden der Warenwirtschaftssoftware KBPro der Bayern-Genetik GmbH entnommen. Um mit unverzerrten NRR arbeiten zu können, die die verschiedenen Einflussfaktoren berücksichtigen, haben REURINK et al. (1990) ein System zur Korrektur der NRR entwickelt. Seit 2000 ist in Bayern ein stetiger Rückgang der NRR 56 zu verzeichnen (vgl. Abbildung 1) (ARBEITSGEMEINSCHAFT DER BESAMUNGSSTATIONEN IN BAYERN E. V. und LANDESVERBAND BAYERISCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2020, 2021), der unter anderem auf die negative Korrelation zwischen Milchmenge und Fertilität zurückzuführen ist (PRYCE et al., 2004; FOUZ et al., 2011; FUERST et al., 2021).

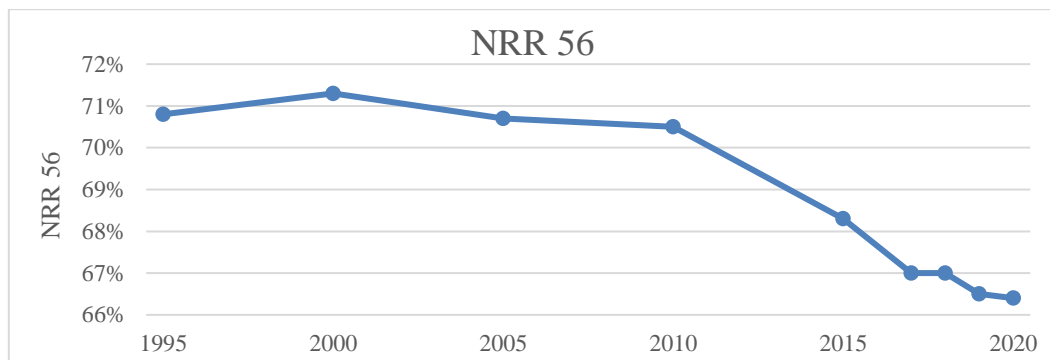


Abbildung 1: Entwicklung der Non-Return-Rate (NRR) 56 der in Bayern angesiedelten Besamungsstationen seit 1995 (modifiziert nach ARBEITSGEMEINSCHAFT DER BESAMUNGSSTATIONEN IN BAYERN E. V. und LANDESVERBAND BAYERISCHER RINDERZÜCHTER E. V. (2021))

Die Zahl der tatsächlich trächtigen Tiere liegt circa 10 % (BUSCH, 2007b) bis 15 % (VERBERCKMOES et al., 2004; HOEDEMAKER et al., 2014) unter der NRR 56. Gründe hierfür sind zum Beispiel eine Belegung der nach Erstbesamung umrinndernden Tiere mittels Natursprung, der Verkauf/Abgang erstbesamter Rinder und Kühe, die fehlende/mangelnde Brunstbeobachtung oder eine Wiederbelegung mehr als 56 Tage nach Erstbesamung (HOEDEMAKER et al., 2014). Die tatsächlichen Konzeptionsraten nach Erstbesamung (EB) beschreiben WEITZE (2001a) sowie HOEDEMAKER et al. (2014) mit 65 % (Kalbinnen) und 55 % (Kühe), wobei auf Herdenebene ein Erstbesamungserfolg von mindestens 50 % (HOEDEMAKER et al., 2014) bzw. 55 % (WEHREND, 2014) anzustreben ist.

3.1. Physiologie des Spermientransports im weiblichen Genitaltrakt

Damit ein Spermium bei der Befruchtung der Eizelle eine Rolle spielen kann, muss es den Eileiter, das funktionelle Spermienreservoir und den Ort der Befruchtung, erreichen und auf seinem Weg dorthin verschiedene mechanisch-anatomische (Zervix, Krypten, Zilien), physikalisch-chemische (Vaginalsekret, Zervikalmukus) und immunologische Hindernisse bewältigen (TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001). Dabei erfahren die Spermien eine starke Reduktion in ihrer Anzahl. Geht man beim Bullen beim natürlichen Deckakt von einer Gesamtspermienzahl von vereinfacht 10^{10} Spermien im Ejakulat aus, sind es im Uterus noch 10^6 , im kaudalen Isthmus noch 10^4 und in der Eileiterampulle, dem Ort der Befruchtung, nur noch 10^2 Spermien, von denen schlussendlich ein einziges Spermium bei der Befruchtung der Eizelle zum Zug kommt (TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001; HUNTER, 2003).

Während beim Rind als Scheidenbesamer (TÖPFER-PETERSEN, 2007) beim natürlichen Deckakt die Zervix die erste Barriere darstellt, in deren Zervikalschleim immotile und morphologisch abnormale Samenzellen sowie Seminalplasma und Bakterien hängen bleiben (TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001), wird dieser erste Selektionsvorgang bei der KB mit der Deposition des Spermas im Uteruskörper umgangen (WENDT, 2007). Nach der Uteruspassage, die vor allem passiv durch Kontraktion der Uterusmuskulatur sowie mit Hilfe der Uterusflüssigkeit erfolgt (HAWK, 1987; WENDT, 2007), müssen die uterotubale Verbindung und der visköse Mukus im englumigen Eileiteristhmus aktiv überwunden werden (TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001; TÖPFER-PETERSEN, 2007). Im Eileiteristhmus heften sich die Spermien mit ihrem apikalen Kopfabschnitt über speziesspezifische Kohlenhydratverbindungen an das Eileiterepithel an (SUAREZ, 2002). Beim Rind erfolgt diese temporäre Bindung über die heparinbindenden bovinen Seminalplasmaproteine (bSPP) an Fukosemoleküle des Eileiterepithels (IGNOTZ et al., 2001; GWATHMEY et al., 2006). IGNOTZ et al. (2001) konnten zeigen, dass die Kapazitation mit einem Verlust der bSPP und folglich der Fukosebindungsfähigkeit einhergeht. Neben dem Schutz der Spermien vor Phagozytose und ihrer Energieversorgung ist das funktionelle Spermienreservoir für die Aufrechterhaltung der Befruchtungsfähigkeit und Motilität der Spermien bis zur Ovulation der Eizelle verantwortlich (SUAREZ, 2002; GWATHMEY et al., 2006). Je nach Spezies bleiben die Spermien für 24 Stunden (Rind, Schwein) bis mehrere Tage (Hund) fertil (TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001). Für eine erfolgreiche Befruchtung ist eine zeitliche Synchronisation von Ovulation der Eizelle und Freisetzung der Spermien vom Eileiterepithel, einschließlich Kapazitation und Hyperaktivierung, notwendig (SUAREZ, 2002). Kapazitierte Spermien sind auf Grund der Destabilisierung der Zellmembran sowie metabolischer Veränderungen in ihrer Lebensdauer begrenzt (TÖPFER-PETERSEN, 2007). Durch eine kontinuierliche Freisetzung der Spermien wird sichergestellt, dass beim Eintreffen der befruchtungsfähigen Eizelle kapazitierte Spermien verfügbar sind und gleichzeitig das Risiko für Polyspermie reduziert wird (DIDION und GRAVES, 1986; SUAREZ, 2002).

Beim Spermientransport im weiblichen Genitaltrakt sind eine schnelle und eine langsame Transportphase zu unterscheiden, wobei letztgenannte beim Rind circa acht Stunden dauert und eine befruchtungsfähige Spermienpopulation im

Eileiteristhmus liefert (HAWK, 1983, 1987; TÖPFER-PETERSEN, 2007; WENDT, 2007). Sowohl beim natürlichen Deckakt als auch bei der KB ist ein Großteil der Spermien bereits wenige Stunden nach der Deposition in der Scheide bzw. im Zervikalmukus nachweisbar und somit für die Befruchtung der Eizelle unbedeutend (LARSSON und LARSSON, 1985; MITCHELL et al., 1985). Dieser retrograde Spermientransport ist auch bei intraperitonealer Besamung zu beobachten (LOPEZ-GATIUS und YANIZ, 2000) und bei zervikaler im Vergleich zur kornualen Besamung fast doppelt so hoch (GALLAGHER und SENGER, 1989). Eine Unterbindung des retrograden Spermientransports bis drei Stunden post inseminationem führte zu einer schlechteren Embryonenqualität und ging mit einer Zunahme an degenerierten und unbefruchteten Eizellen einher (DEJARNETTE et al., 1992).

3.2. Die intrauterine Besamung als Standardbesamungsmethode

In den 1940er Jahren wurde die mit Hilfe eines Vaginalspekulums durchgeführte vaginale bzw. flach zervikale Besamung durch die tiefe zervikale oder intrauterine Besamung ersetzt, bei der die Zervix durch transrektale Palpation fixiert wird. Diese von dänischen Tierärzten eingeführte Technik hat sich bis heute auf Grund ihrer Einfachheit, Wirtschaftlichkeit und Effizienz als Standardbesamungsmethode durchgesetzt. Entscheidend dabei ist die erfolgreiche Zervixpassage, denn erst durch die Deposition des Spermas im Uteruskörper wurde eine starke Reduktion der Spermienkonzentration bei gleichbleibenden Trächtigkeitsraten möglich (FOOTE, 2002; VISHWANATH, 2003). Zwei Besamungsstudien, eine mit hochkonzentriertem TG-Sperma (1) (MACPHERSON, 1968), die andere mit niedrigkonzentriertem Frischsperma (2) (MOLLER et al., 1972), bestätigten mit besseren NRR (Studie 1: 68,2 % vs. 63,2 %, Studie 2: 67,9 % vs. 63,1 %) den Uterus gegenüber der Zervix als favorisierten Samenablageort.

3.3. Der optimale Ort der Spermadeposition im Rahmen der künstlichen Besamung beim Rind

Die Annahme, dass eine weitere Verbesserung der Trächtigkeitsraten erzielt werden würde, wenn das Sperma näher am Eileiter abgelegt wird, sowie die Tatsache, dass es immer wieder zur fehlerhaften Spermadeposition in der Zervix und dadurch reduzierten Befruchtungsraten kam, waren Anlass für die tiefe intrauterine bzw. intrakornuale Besamung, die uni- oder bikornual durchgeführt werden kann

(PETERS et al., 1984; SENGER et al., 1988; LÓPEZ-GATIUS, 2000).

Erste, in den 1950er Jahren durchgeführte Studien konnten auf Grund der Verwendung von hochkonzentriertem Frischsperma kaum Unterschiede in den Befruchtungsraten bei zervikaler, uteriner oder kornuärer Besamung feststellen, da beim Spermientransport auftretende Probleme durch die hohen Spermienkonzentrationen überdeckt wurden (KNIGHT et al., 1951; SALISBURY und VANDEMARK, 1951; SENGER et al., 1988; LÓPEZ-GATIUS, 2000). Spätere Untersuchungen zur tiefen intrauterinen bzw. intrakornualen Besamung führten zu unterschiedlichen Ergebnissen, was unter anderem auf Unterschiede bezüglich experimentellem Aufbau, Besamungsdosis, Tiefe der Spermadeposition im Uterushorn, uni- oder bilateraler Besamung sowie Alter bzw. Parität des Rindes zurückzuführen ist (KURYKIN et al., 2006). Während bei einigen Studien keine Unterschiede in den Non-Return- bzw. Trächtigkeitsraten nachgewiesen werden konnten (HAWK und TANABE, 1986; WILLIAMS et al., 1988; MOMONT et al., 1989; MCKENNA et al., 1990), kam es bei anderen Untersuchungen zu einer Verbesserung (LÓPEZ-GATIUS und CAMÓN-URGEL, 1988; SENGER et al., 1988; MEIRELLES et al., 2012) und in einem Fall sogar zu einer Verschlechterung (MARSHALL et al., 1989) bei intrakornuärer Besamung.

HAWK und TANABE (1986) und MOMONT et al. (1989) führten Besamungen mit TG-Sperma entweder in den Uteruskörper oder in eines der Uterushörner ipsi- oder kontralateral zum ovulatorischen Follikel durch und konnten weder bei Kalbinnen (MOMONT et al., 1989) noch bei Kühen (HAWK und TANABE, 1986; MOMONT et al., 1989) einen signifikanten Unterschied in den Befruchtungs- bzw. Trächtigkeitsraten feststellen. Während bei WILLIAMS et al. (1988) die Befruchtungsergebnisse von intrauteriner (48,1 %) und bilateral intrakornuärer (49,3 %) Besamung kaum Unterschiede zeigten, konnten sie einen deutlichen Vorteil dieser beiden Methoden gegenüber der zervikalen Besamung (39,4 %) aufzeigen. Auch MCKENNA et al. (1990) konnten in ihrer dreimonatigen Studie (Juni bis August 1988) mit 12 Besamungstechnikern bei insgesamt 4623 durchgeführten Besamungen mit 70,8 % (bilateral kornual, n = 2195) und 69,5 % (intrauterin, n = 2428) keinen signifikanten Unterschied bei den NRR hinsichtlich des Samenablageorts feststellen. Die prozentuale Differenz der NRR der einzelnen Besamungstechniker lag bei bis zu 19 % (Uteruskörper) bzw. 30 % (Uterushörner). KURYKIN et al. (2006) führten im Rahmen ihrer Studie (tiefe) intrakornuale Besamungen mit TG-Sperma

in das Horn ipsilateral zum präovulatorischen Follikel mit 2×10^6 bzw. 40×10^6 Spermien sowie Standardbesamungen mit 40×10^6 Spermien durch und konnten weder konzentrationsabhängig noch ortsgebunden einen signifikanten Unterschied bei den Trächtigkeitsraten feststellen. Im Gegensatz zu den im Rahmen der natürlichen Brunst besamten Tieren waren jedoch bei den terminorientiert besamten Tieren deutliche bullenspezifische Unterschiede bei den Trächtigkeitsraten zu beobachten. Auch bei der terminierten Besamung von Kalbinnen mit weiblich gesextem Sperma ($2,2 \times 10^6$ Spermien/Paillette) konnten keine signifikanten Unterschiede bei den Trächtigkeitsraten für intrauterine (41,8 %), intrakornuale (49,1 %) und tiefe intrakornuale (39,3 %) Besamung aufgezeigt werden (KURYKIN et al., 2007).

Im Gegensatz dazu erreichten LÓPEZ-GATIUS und CAMÓN-URGEL (1988) bei der Besamung von Milchkühen mit TG-Sperma von hochfertilen Bullen im Rahmen der natürlichen Brunst bei Samenablage im Horn ipsilateral zum ovulatorischen Follikel um 10,3 % höhere Trächtigkeitsraten (70,6 %) als bei Standardbesamung (60,3 %) ($p < 0,05$). Auch MEIRELLES et al. (2012) erzielten bei Fleischrindern mit niedrig konzentriertem TG-Sperma (4×10^6 Spermien/Besamungsportion) signifikant bessere Trächtigkeitsraten (67,4 %; $p < 0,01$) bei tiefer intrakornuabler Besamung ipsilateral zum ovulierenden Follikel im Vergleich zur Standardbesamung (48,8 %). Nach einem Training zur Präzisierung der Samenablage in Uteruskörper und Gebärmutterhörnern vor Studienbeginn, erreichten Eigenbestandsbesamer bei bikornuabler Besamung um 20 % bessere Konzeptionsraten (64,4 %) im Vergleich zur Standardbesamungsmethode (SENGER et al., 1988).

Während die kornuale Besamung laut LÓPEZ-GATIUS und CAMÓN-URGEL (1988) sowie MEIRELLES et al. (2012) auf Grund der besseren Trächtigkeitsraten eine weitere Reduktion der Spermienkonzentration ermöglicht und bei der Verwendung von gesextem Sperma zu bevorzugen ist, empfiehlt DISKIN (2018) diese Methode wegen des höheren Verletzungsrisikos nur dann anzuwenden, wenn bei intrauteriner Besamung keine zufriedenstellenden Konzeptionsraten erzielt werden.

3.4. Spermienkonzentration in Besamungsportionen

Die Anzahl an produzierten Besamungsportionen ist auf Grund gesetzlicher Vorgaben zur Mindestkonzentration und der physiologisch limitierten Spermamenge begrenzt (ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER E. V.,

2006b). Konventionelle TG-Pailletten enthalten in der Regel $15\text{--}20 \times 10^6$ Spermien (VISHWANATH und SHANNON, 2000).

Aus ökonomischen Gründen ist jedoch eine Reduktion der Spermienkonzentration auf jenes Minimum anzustreben, das keine negativen Auswirkungen auf die Fertilität bzw. NRR hat und folglich mit einer Maximierung der produzierten Besamungsportionen einhergeht (DEN DAAS et al., 1998). Diese minimale Spermienkonzentration weist jedoch einen bullenspezifischen Schwellenwert auf. Eine Konzentrationserhöhung der Spermien über diesen Schwellenwert hinaus beeinflusst die Fertilität nicht, wohingegen eine Reduktion zu einem Abfall der Fertilität führt (VISHWANATH und SHANNON, 2000). Während suboptimale Spermienkonzentrationen bei Frischsperma mit einem konstanten Abfall der NRR für alle Bullen einhergingen (5,5 bis 9,1 %), war die Reduktion der NRR bei TG-Sperma bullenabhängig (-0,1 bis 20,8 %) (SHANNON und VISHWANATH, 1995). DEN DAAS et al. (1998) konnten bei zunehmender Spermienkonzentration bei TG-Sperma ($2,1$ bis $17,3 \times 10^6$ Spermien pro Besamungsportion) nur bei zwei von vier Bullen einen deutlichen Anstieg der NRR beobachten. Auf Grund der unterschiedlichen Auswirkungen des Kryokonservierungsprozesses auf die Spermaqualität einzelner Bullen stellt die optimale Spermienkonzentration eine individuelle Variable dar und es wird zwischen Bullen mit guter und schlechter Gefriertauglichkeit unterschieden (PERUMAL et al., 2016). CRESPILO et al. (2014) konnten außerdem einen Verdünnereinfluss bei der terminierten Besamung von Zebukühen aufzeigen. Während die Trächtigkeitsraten bei den mit TRIS-Eigelb-Verdünner produzierten Portionen konzentrationsabhängig ($6, 12, 25$ oder 50×10^6 Spermien/Paillette) signifikante Unterschiede (45,6, 48,8, 60,3 und 70,6 %) zeigten, waren diese bei mit Botu-Bov[®] (Fa. Botupharma, Botucatu, Brasilien) verdünntem Sperma nicht zu beobachten (57,6, 60,3, 59,3 und 62,5 %). VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al. (2000) erstellten anhand der konzentrationsabhängigen NRR 56 exponentielle Kurven, um die optimale Spermienkonzentration jedes einzelnen Bullen zu bestimmen.

3.5. Alternative Besamungstechniken beim Rind

Mit der Absicht, die KB noch effizienter zu machen, haben Wissenschaftler immer wieder versucht, neue Besamungsgeräte und -methoden zu entwickeln. Auf Grund der fehlenden Verbesserung der Trächtigkeitsraten, der Komplexität ihrer Anwendung oder des höheren finanziellen, zeitlichen oder materiellen Aufwands konnte sich jedoch bis heute keine dieser Besamungstechniken gegen die

Standardbesamungsmethode behaupten.

MENDOZA und NIVEN (1992; 2000) entwickelten ein Besamungsgerät mit Ballonkatheter für die Besamung ohne rektale Fixation. Dabei wird das Besamungsgerät mit Hilfe eines Vaginalspekulums in die Zervix eingeführt, durch Ballonierung/Aufblasen des Ballons fixiert und das Sperma anhand einer mit Luft bzw. Verdünnerrlösung gefüllten Spritze über die Pipette in den Uterus appliziert. Wissenschaftliche Studien zur praktischen Anwendung sind nicht verfügbar.

Ein Hightechbesamungsgerät stellt das AlphaVision der Firma IMV Technologies dar. Ähnlich einem Vaginalspekulum aufgebaut, verfügt es neben der Besamungspistole über eine Kamera zur Visualisierung von Scheide und äußerem Muttermund, die ein Einführen der Besamungspistole in den kaudalen Teil der Zervix ohne rektale Fixation ermöglicht (IMV TECHNOLOGIES FRANCE). Die vollständige Passage der Zervix mit der Besamungspistole ist allerdings wegen der bovinen Zervikalkrypten nur unter rektaler Kontrolle möglich (SCHERZER, 2020). Der größte Vorteil des AlphaVision liegt in der zusätzlichen Nutzung zu diagnostischen Zwecken, wie Feststellen von Verletzungen und Entzündungen im Scheidenbereich, Zyklusstand der Zervix, Ausflussbeurteilung etc., wobei eine Dokumentation der Befunde anhand von Bildern und Videosequenzen möglich ist (IMV TECHNOLOGIES FRANCE).

Der von der Universität Ghent speziell für die tiefe intrakornuale Besamung entwickelte „Ghent-Katheter“ passt sich durch seine Flexibilität an die Krümmung der Gebärmutterhörner an und ermöglicht eine Deposition des Spermas nahe der uterotubalen Verbindung. In einem ersten Feldversuch mit TG-Sperma (10 bis 15×10^6 Spermien) und über 4000 durchgeführten Besamungen konnten im Vergleich zur Standardbesamung (57,6 %) jedoch keine besseren Trächtigkeitsraten mit dem „Ghent Katheter“ sowohl bei intrauteriner (52,7 %) ($p < 0,01$) als auch bei bilateral intrakornualem Besamung (53,8 %) ($p = 0,27$) erzielt werden (VERBERCKMOES et al., 2004). Eine weitere Studie, bei der die intrakornualen Besamungen mit reduzierten Spermienkonzentrationen (8 , 4 und 2×10^6 Spermien) sowohl mit dem „Ghent-Katheter“ als auch der Standardbesamungspistole durchgeführt wurden und Kontrolltiere mit der Standardbesamungsmethode und 12 Millionen Spermien besamt wurden, konnte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) bei den Trächtigkeitsraten aufzeigen (VERBERCKMOES et al., 2005).

Basierend auf der Fragestellung, wie man aus einer Paillette mit seltenem und/oder teurem Bullensperma die meisten Kälber erzeugen kann, hat STROUD (2012, 2016a, 2017, 2020) über mehrere aufeinander aufbauende Patente eine high-volume-Besamungsmethode entwickelt (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Patente bei der Entwicklung der high-volume-Besamungsmethode durch Stroud

Jahr	Patentnummer	Titel	Quelle
2012	US 8,202,210	Artificial breeding techniques for bovines including semen diluents and AI apparatus	(STROUD, 2012)
2016	US 9,433,484	Artificial breeding techniques for bovines including semen diluents and AI apparatus	(STROUD, 2016a)
2017	US 9,554,883	Method and apparatus to reduce the number of sperm used in artificial insemination of cattle	(STROUD, 2017)
2020	US 10,610,343	Method, apparatus and kit for artificial insemination of bovine	(STROUD, 2020)

Bei dieser high-volume-Besamung (HVB) wird das aufgetaute Sperma vor der Besamung mit Hilfe eines Mandrins in einen Faltenbalgbehälter überführt, der bis zu 30 ml eines spermienfreundlichen Puffermediums enthält. Für die Besamung wird der Faltenbalgbehälter über eine Silikonverbindung am Besamungskatheter fixiert. Die Besamung wird analog der Standardbesamung als intrauterine Besamung mit transrektaler Fixation der Zervix durchgeführt und das Medium-Sperma-Gemisch in den Uterus appliziert (STROUD, 2020). Möchte man mit einer Paillette mehrere Tiere besamen, wird der Pailletteninhalt auf mehrere Faltenbälge aufgeteilt. Laut STROUD (2012, 2016a, 2017, 2020) sind verschiedene Puffermedien als Trägermedium für die HVB geeignet. Sie sollten einen pH-Wert zwischen 7,0 und 7,4 aufweisen und die Osmolarität zwischen 280 und 300 mosmol/L liegen. Das Puffermedium sollte die Lebensfähigkeit der Spermien unterstützen und keinen negativen Effekt auf die Spermien ausüben. Als Beispiele nennt STROUD (2020) gepufferte Salzlösung sowie verschiedene kommerziell erhältliche Embryo-Spüllösungen und Verdüner, die auch in der Kryokonservierung von Sperma eine Rolle spielen. Das Sperma darf dem Puffermedium erst zugegeben werden, wenn dieses zumindest Raumtemperatur hat, und ist im Fall von TG-Sperma vorher aufzutauen. In praktischen Versuchen konnte STROUD (2015) mittels Ultraschalluntersuchungen zeigen, dass 30 ml ein angemessenes Volumen darstellen, um bei einer geschlechtsreifen Kuh beide Uterushörner gleichmäßig zu fluten.

3.6. Embryotransfer beim Rind

Der Embryotransfer (ET) bietet die Möglichkeit zur besseren Nutzung des genetischen Potentials auf der Mutterseite und führt durch die Embryonengewinnung bei Kalbinnen bereits vor Erreichen der Zuchtreife und der damit einhergehenden Verkürzung des Generationsintervalls zu einer Steigerung des Zuchtfortschrittes und einem Anheben des genetischen Leistungspotentials.

Nach einem deutlichen Rückgang im ET-Bereich zu Beginn des 21. Jahrhunderts (FAASCH, 2009) ist in Bayern seit 2014 wieder ein Aufwärtstrend bei der Anzahl der durchgeführten Spülungen und transfertauglichen Embryonen zu beobachten (vgl. Tabelle 2) (ARBEITSGEMEINSCHAFT DER BESAMUNGSSTATIONEN IN BAYERN E. V. und LANDESVERBAND BAYERISCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2016, 2019, 2020). Die Beurteilung von Entwicklungsstadium und Qualität der gewonnen Embryonen erfolgt numerisch anhand des Handbuchs der internationalen Embryotechnologiegesellschaft (International Embryo Technology Society, kurz IETS). Dabei handelt es sich um ein subjektives Verfahren, das Erfahrung und Expertise erfordert, um Ergebnisse miteinander vergleichen zu können (BÓ und MAPLETOFT, 2013).

Tabelle 2: Embryongewinnung beim Rind für Bayern und weltweit

	Embryotransfer-Einrichtung	Spülungen	gew. E./O.	tt. E.	gew. E./O. pro Spülung	tt. E. pro Spülung
Bayernweite Statistik Embryotransfer						
Bayern 2020	Bayern-Genetik	170	2.186	1.580	12,9	9,3
	Marktredwitz	5	75	37	15,0	7,4
	Neustadt/Aisch	536	7.456	5.072	13,9	9,5
	CRV	188	2.541	1.639	13,5	8,7
	Sonstige (3 Teams)	385	5.155	3.188	13,4	8,3
	Gesamt 2020	1.284	17.413	11.516	13,6	9,0
Bayern 2019	Bayern-Genetik	201	2.651	2.003	13,2	10,0
	Marktredwitz	6				
	Neustadt/Aisch	536	7.262	5.067	13,5	9,5
	CRV	22	349	211	15,9	9,6
	Sonstige (3 Teams)	424	5.479	3.340	12,9	7,9
	Gesamt 2019	1.189	15.741	10.621	13,2	8,9
Bayern 2018	Bayern-Genetik	214	2.363	1.947	11,0	9,1
	Marktredwitz	4	65	34	16,3	5,8
	Neustadt/Aisch	547	7.243	4.914	13,2	9,0
	Sonstige (4 Teams)	437	5.937	3.154	13,6	7,2
	Gesamt 2018	1.202	15.608	10.049	13,0	8,4
	Gesamt 2017	1.047	13.916	9.088	13,3	8,7
	Gesamt 2016	973	13.700	8.995	14,1	9,2
	Gesamt 2015	727	10.495	7.605	14,4	10,5
Weltweite Statistik Embryotransfer						
	Weltweit 2020	58.391	585.610	361.728	10,0	6,2
	Fleischsektor 2020	26.865	301.686	178.494	11,2	6,6
	Milchsektor 2020	31.526	283.924	183.234	9,0	5,8
	Weltweit 2019	60.488	636.750	387.769	10,5	6,4
	Fleischsektor 2019	30.774	349.134	204.492	11,3	6,6
	Milchsektor 2019	29.714	287.616	183.277	9,7	6,2
	Weltweit 2018*	76.067	773.231	469.908	10,2	6,2
	Fleischsektor 2018	38.270	418.234	246.942	10,9	6,5
	Milchsektor 2018	37.797	354.997	222.966	9,4	5,9

Die Daten wurden den Jahresberichten „Rinderzucht, Besamung, Embryotransfer in Bayern 2018/2019/2020“ der Arbeitsgemeinschaft der Besamungsstationen in Bayern e. V. und des Landesverbandes Bayerischer Rinderzüchter e. V. (ARBEITSGEMEINSCHAFT DER BESAMUNGSSTATIONEN IN BAYERN E. V. und LANDESVERBAND BAYERISCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2019, 2020, 2021) und den Jahresberichten „2018/2019/2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals“ des Komitees der internationalen Embryotechnologiegesellschaft IETS (International Embryo Technology Society) (VIANA, 2019, 2020, 2021a) entnommen.

*Korrektur in Tabelle nach Rücksprache mit VIANA (2021b) → Additionsfehler der Zahlen im Jahresbericht 2018

Abk.: gew.: gewonnene; tt.: transfertauglich; E.: Embryonen; O.: Oozyten

STROUD (2015) stellte beim jährlichen Treffen der „Canadian Embryo Transfer Association/Association Canadienne de Transfert d'Embryons“ (CETA/ACTE) und der „American Embryo Transfer Association“ (AETA) eine neue Besamungstechnik unter dem Titel „A novel insemination system for superovulated beef donors“ vor. Basierend auf seinen Patenten zur high-volume-Besamung (vgl. Tabelle 1, S. 22) entwickelte Stroud neben einem atraumatischen Besamungskatheter aus

Metall zusätzlich ein Trägermedium (Maximate[®]) für Spermien und bezeichnete dieses HVB-System fortan als Maximate. Das Trägermedium befreit nicht nur die Plasmamembran der Spermien von Verdünnungsinhaltsstoffen wie Glycerol und Eigelb und fördert dadurch die Motilität, sondern ermöglicht den Spermien auch einen mechanischen und atraumatischen Transport Richtung uterotubaler Verbindung. Stroud führte insgesamt 2706 Spülungen bei Fleischrindern durch, von denen 1251 der Spendertiere mittels Standardbesamungsmethode und 1455 mit Maximate besamt wurden. Die Spermienkonzentration bei den mit Maximate besamten Tieren war um 8,4 % reduziert. Während bei den mit Maximate besamten Tieren im Schnitt 64,0 % der gewonnenen Embryonen lebensfähig waren, lag dieser Anteil bei der Standardbesamung mit 57,0 % deutlich darunter. Laut entsprechender Berechnungen kann mit Maximate durchschnittlich ein lebensfähiger Embryo pro Spülung mehr gewonnen werden im Vergleich zu standardmäßig besamten Spendertieren (Maximate 8,9 vs. Standard 7,9 lebensfähige Embryonen/Spülung). Einzig bei Problemkühen konnten auch mit Maximate keine besseren Ergebnisse erzielt werden (STROUD, 2016b).

3.7. Geschlechterverteilung bei Kälbern

Das Geschlecht wird bei Säugetieren von den Spermazellen bestimmt, die entweder ein weibliches X- oder ein männliches Y-Chromosom tragen. Der Anteil an X- und Y-Chromosom-tragenden, im Rahmen der Spermatogenese produzierten Spermien ist dabei auf Grund der meiotischen Teilungen in etwa gleich, weshalb die erwartete Wahrscheinlichkeit, dass die Eizelle von einem männlichen oder weiblichen Spermium befruchtet wird, bei 50 % liegt (GRIFFIN et al., 1996; HASSANANE et al., 1999; RAHMAN und PANG, 2020). Das tatsächliche Geschlechterverhältnis der Nachkommen kann jedoch abweichend sein und auf mehreren Ebenen beeinflusst werden (HARDY, 1997; BERRY et al., 2011):

- Ejakulate enthalten eine ungleiche Menge an X- und Y-Spermien
- Unterschiedliche Kapazitations- und Überlebensraten von X- und Y-Chromosom-tragenden Spermien, auch in Bezug auf die Spermienprozessierung
- Förderung oder Inhibition des Transports von X- oder Y-Chromosom-tragenden Spermazellen im weiblichen Geschlechtstrakt
- Spermioselektion bei der Befruchtung durch die Eizelle
- Geschlechtsabhängige Unterschiede bei intrauterinen Verlusten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (Einnistung, embryonaler Früh Tod, Abort)

CHANDLER et al. (1998) bestimmten von 20 Ejakulaten (zwei Ejakulate/Bulle) den Anteil an Y-Chromosom-tragenden Spermien, der im Mittel bei 50,8 % lag, mit einem Minimum von 26,5 % und einem Maximum von 95,5 %. Bei fünf der zehn Bullen war ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) beim Anteil an Y-Spermien zwischen den beiden Ejakulaten zu verzeichnen. In einer weiteren Arbeit untersuchten CHANDLER et al. (2002) in diesem Zusammenhang die Rolle der Absamfrequenz. Während der Anteil an Y-Chromosom-tragenden Spermien nach einer mehr als 30-tägigen Sprungpause zu Beginn stark schwankte, konnte bei regelmäßiger Spermagewinnung im Drei-Tagesrhythmus ab der fünften Gewinnung bei allen fünf Bullen ein Ausgleich der Anzahl an weiblichen und männlichen Spermien erreicht werden. Auch bei der Auswertung der Abkalbedaten einzelner Bullen konnten CHANDLER et al. (1998) auf Ejakulatebene eine enorme Schwankungsbreite ($\bar{x} = 49,8$ %, Min.: 16,1 %, Max.: 72,3 %) bei der Anzahl männlicher Kälber verzeichnen.

In mehreren Säugetierstudien wird der Einfluss des Besamungszeitpunktes auf das Geschlecht der Nachkommen in Relation zur Ovulation und dem Reifegrad der Eizelle beschrieben, wobei bei früher Besamung die weiblichen und bei später Besamung die männlichen Nachkommen überwiegen (PRATT et al., 1987; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 1999; RORIE, 1999). Vermutet wird, dass Y-Spermien nach der Besamung eine schnellere Reaktion hinsichtlich Kapazitation und Akrosomreaktion als X-Spermien zeigen. Sie sind daher früher befruchtungsfähig, haben dadurch aber auch eine kürzere Überlebensdauer als X-Spermien (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 1999). Auch im Rinderbereich wurden diesbezüglich Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt. Während einige Studien einen Einfluss des Besamungs- bzw. des Befruchtungszeitpunktes *in vitro* auf die Geschlechterverteilung der Nachkommen bzw. Embryonen bestätigten (DOMINKO und FIRST, 1997; WEHNER et al., 1997; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 1999; MARTINEZ et al., 2004; BAYRIL und YILMAZ, 2013; TESFU et al., 2014), konnten andere Studien keinen Unterschied bei der geschlechtlichen Verteilung der Kälber in Abhängigkeit vom Besamungszeitpunkt aufzeigen (FOOTE, 1977; RORIE et al., 1999). PURSLEY et al. (1998) verzeichneten bei mittels OvSynch[®] synchronisierten Kühen nicht nur bei den früh, sondern auch bei den sehr spät durchgeführten Besamungen mehr weibliche Kälber. Grundsätzlich geht ein später Besamungszeitpunkt beim Rind mit einer verminderten Fertilität einher (MAATJE et al., 1997;

DRANSFIELD et al., 1998; MARTINEZ et al., 2004). LECHNIAK et al. (2003) zeigten, dass auch Kapazitationsbedingungen, wie beispielsweise die Inkubationsdauer, Einfluss auf die Geschlechterverteilung haben können. Mit zunehmender Inkubationsdauer (0, 6 und 24 Stunden) boviner Spermien in Sperm-TALP stieg bei der IVF der Anteil an weiblichen Embryonen.

Ohne den Besamungszeitpunkt zu berücksichtigen, konnten zwei Studien bei der Auswertung der Abkalbedaten von jeweils 8 Jahren sowohl bei Einlings- (52,4 % und 53,3 % männliche Kälber) als auch bei Zwillingsgraviditäten (52,7 % und 51,9 % männliche Kälber) einen Vorzug der männlichen gegenüber den weiblichen Kälbern aufzeigen (DEL RÍO et al., 2007; HOSSEIN-ZADEH et al., 2008). BERRY et al. (2011) und AMADESI et al. (2015) bestätigten mit 51,4 % und 52,1 % die minimal höhere Prävalenz von Bullenkälbern. Die Auswertung der Besamungsdaten von Neuseeland von 1996 und 1997 zeigte zudem einen signifikanten Effekt der Spermaart auf das Geschlechterverhältnis ($p < 0,001$). In beiden Jahren wurden bei KB mit TG-Sperma mehr männliche Kälber geboren als bei KB mit Frischsperma (XU et al., 2000). KHAN et al. (2012) konnten in einer vergleichenden Studie bei KB deutlich mehr männliche Kälber (59 %) als beim natürlichen Deckakt (51 %) verzeichnen und begründen dies damit, dass die KB auch noch nach Brunstende durchgeführt werden kann. Laut BERRY und CROMIE (2007) steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein männliches Kalb geboren wird, bei der KB im Vergleich zum natürlichen Deckakt um ein Prozent an.

Nach der erfolgreichen Befruchtung beeinflussen geschlechtsdimorphistische Unterschiede während der embryonalen und fetalen Entwicklung sowie um den perinatalen Zeitraum das Geschlechterverhältnis (RAY et al., 1995; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001; KIMURA et al., 2004). So beschreiben ERB und MORRISON (1959) höhere Abort- (59,4 %) und Totgeburtenraten (56,8 %) für männliche Kälber. BERRY et al. (2011) verzeichneten bei der Auswertung der Abkalbedaten irischer Milchviehherden eine perinatale Sterblichkeitsrate von insgesamt 4,1 %, wovon 58,7 % Bullenkälber waren.

III. MATERIAL UND METHODEN

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels ist die Gewinnung, Beurteilung und Verarbeitung der Spermaproben für die späteren Untersuchungen aufgeführt. Anschließend werden die bei der Bayern-Genetik GmbH im Rahmen der Qualitätskontrolle von Spermaproben angewendeten Standardprotokolle für die computergestützte Spermienanalyse und die durchflusszytometrischen Untersuchungen beschrieben. Sie dienen als Grundlage für die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Laboruntersuchungen, die im dritten Abschnitt dieser Arbeit aufgeführt sind. Der vierte Abschnitt umfasst die vergleichende praktische Anwendung von HVB und Standardbesamungsmethode bei routinemäßiger KB im Rahmen der natürlichen Brunst und im Zuge des Embryotransfers beim Rind. Die verwendeten Geräte, Materialien, Reagenzien und Lösungen sowie Medikamente sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt (vgl. Kapitel IX.2.). In Kapitel IX.3. finden sich die Informationen zu den Fluorochromen.

1. Spermaproben

1.1. Bullen

Alle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden mit TG-Sperma von Fleckviehzuchtbullen der Besamungsstation Bayern-Genetik GmbH durchgeführt. Die Bullen waren am Standort Landshut in Einzelboxen mit planbefestigtem Boden aufgestellt. Die Boxen waren in eine Liegebucht mit Stroh und einen Fütterungs- bzw. Mistbereich unterteilt. Sie wurden zweimal täglich ausgemistet. Die Fütterung der Zuchttiere erfolgte mit Maissilage, Heu, Kraft- und Mineralfutter sowie β -Carotin. Zum Zeitpunkt der Spermagewinnung zeigten die Bullen ein ungestörtes Allgemeinbefinden sowie physiologisches Sexualverhalten und waren frei von jeglichen Krankheitssymptomen.

1.2. Spermagewinnung und Spermabeurteilung

Jeder Bulle wurde routinemäßig zweimal pro Woche im abwechselnden Drei- und Viertagesrhythmus abgesamt. Nach sexueller Stimulation durch Blindsprünge (Aufsprünge ohne Ejakulation) erfolgte die Spermagewinnung durch den Samenentnahmetechniker mit Hilfe einer auf +43 °C vorgewärmten künstlichen Scheide am Phantom oder Unterstellbullen. Bis zur Weiterverarbeitung im Labor wurde das

Spermaauffangröhrchen in der Hygieneschleuse im Kugelbad bei +34 °C zwischengelagert.

Im Labor erfolgte die makroskopische und mikroskopische Beurteilung der Ejakulate. Um Temperaturschwankungen und eine dadurch bedingte Verminderung der Spermaqualität zu vermeiden, wurde der Objektisch des Mikroskops über ein Steuergerät beheizt und alle verwendeten Materialien mit Hilfe einer Laborheizplatte und Heizblöcken auf +38 °C angewärmt. Bei der makroskopischen Untersuchung wurden Geruch, Konsistenz, Reinheit und Farbe der Ejakulate beurteilt. Die Volumenbestimmung erfolgte mit einer Laborwaage (Kern EW). Von auffälligen Ejakulaten wurde zusätzlich eine pH-Wertbestimmung mittels pH-Indikatorpapier durchgeführt. Bei der nachfolgenden mikroskopischen Beurteilung mit dem Phasenkontrastmikroskop wurden die Massenbewegung (MB) ([-] keine MB bis [+++] sehr gute MB) und der Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien bei 200facher Vergrößerung und positivem Phasenkontrast bestimmt. Außerdem wurde die vorverdünnte Probe auf Agglutination, Fremdzellen und morphologische Auffälligkeiten untersucht. Für die Konzentrationsbestimmung [Millionen Spermien pro Milliliter] wurde mit Hilfe eines Dilutors eine 1:100-Verdünnung von nativem Bullensperma mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, die in Einmalküvetten gefüllt, mittels Laborschüttler gevortext und photometrisch analysiert wurde.

1.3. Spermaverarbeitung

Nur Ejakulate, die die vorgeschriebenen Mindestanforderungen erfüllt haben (vgl. Tabelle 12, S. 115), wurden zu TG-Sperma weiterverarbeitet. Mit Hilfe der betriebseigenen Software KBPro wurde anhand der erhobenen Daten die notwendige Verdünnermenge für die vorgegebene Endkonzentration von $15\text{--}20 \times 10^6$ Spermien pro Paillette berechnet. Nach Vorverdünnung des nativen Ejakulats mit +30 °C warmem Steridylverdünner auf 15 ml erfolgte über das Steuergerät die Endverdünnung. Durch behutsames Schwenken wurden die Ejakulate homogen durchmischt, im Anschluss bei Raumtemperatur über die vollautomatische Abfüll- und Verschleißmaschine in Pailletten abgefüllt und nach Kontrolle von Füllzustand, Verschweißung und Aufdruck auf den Einfrierrampen platziert. Nach mindestens vierstündiger Äquibrierung bei +5 °C erfolgte die Kryokonservierung. Unter Stickstoffbedampfung wurden die Pailletten in der Einfriermaschine nach einer von IMV Technologies entwickelten Einfrierkurve innerhalb von 8 Minuten von +4 °C auf -142 °C abgekühlt und eingefroren. Dann wurden die Pailletten in flüssigen

Stickstoff (-196 °C) überführt. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Probennahme für die Qualitätskontrollen. Bis zur qualitätsabhängigen Freigabe wurden die produzierten Chargen in Quarantänestickstoffcontainern gelagert.

2. Qualitätskontrolle hergestellter Spermaportionen – Standardprotokolle

Nach der Tiefgefrierung wurden die Spermapailletten in flüssigem Stickstoff gelagert und nach frühestens drei Tagen für die Qualitätskontrolle verwendet.

Hierfür wurde die Motilitätsanalyse bei der Bayern-Genetik GmbH mittels CASA-System durchgeführt. Zusätzlich wurden alle produzierten Spermachargen einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Im Rinderbereich gibt es bis dato keine Richtwerte für mittels CASA-System und Durchflusszytometrie erfasste Daten bzw. Parameter, weshalb die Bayern-Genetik GmbH eigene Grenzwerte für die analysierten Parameter festgelegt hat. Nur wenn die von der Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter e. V. (ADR) vorgeschriebenen Mindestanforderungen sowie die von der Bayern-Genetik GmbH zusätzlich festgelegten durchflusszytometrischen Qualitätskriterien erfüllt wurden (vgl. Tabelle 3), erfolgte die Freigabe der produzierten Spermachargen für den Verkauf.

Tabelle 3: Qualitätsanforderungen an Tiefgefriersperma bei der Bayern-Genetik GmbH

Modifizierte Zusammenfassung der von der Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter e. V. (ADR) festgelegten Mindestanforderungen und von der Bayern-Genetik GmbH zusätzlich festgelegten Kriterien an die Qualität von bovinem TG-Sperma nach dem Auftauen (ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2006b).

Qualitätsparameter	Grenzwerte
Vorwärtsbeweglichkeit (geschätzt*/CASA°)	mindestens 50 % der Spermien zeigen eine Vorwärtsbeweglichkeit
Progressiv motile Spermien/Paillette*	≥ 6 Millionen/Paillette
Anteil Spermien mit PMI°	≥ 30 %
Anteil Spermien mit hMMP°	≥ 30 %
Anzahl Spermien mit PMI/Paillette°	≥ 5 Millionen/Paillette

*von der ADR festgelegte Mindestanforderungen

°von der Bayern-Genetik GmbH zusätzlich festgelegte Kriterien

Abk.: PMI: Plasmamembranintegrität; hMMP: hohes Mitochondrienmembranpotential

2.1. Computergestützte Spermienanalyse (CASA)

Die Nachuntersuchung mittels computergestützter Spermienanalyse wurde mit dem AndroVision[®] der Firma Minitüb GmbH durchgeführt, das sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte:

- Software: AndroVision[®] Version 1.1.4. vom 11.12.2017, Datenbank-Version 21
- Mikroskop: Zeiss Axio Lab.A1 mit beheizbarem Objektisch
- Objektiv: Zeiss Objektiv, 20x, negativer Phasenkontrast
- Kamera: Color-Digitalkamera, Basler Aviator avA1000-100gc, Seriennummer 22620157, Framerate: 60 Frames pro Sekunde
- Computer: Intel Xeon E5-1620 3.60 GHz, 24 GB RAM, 500 GB SSD Festplatte, Windows 10 Professional, 24 Zoll TFT Monitor

Die der CASA zu Grunde liegenden kinetischen Parameter sowie Setup-Einstellungen sind im Anhang dieser Arbeit in Kapitel IX.4. zu finden.

Um während der Nachuntersuchung eine konstante Temperatur von +38 °C sicherzustellen, wurden die verwendeten Materialien mit Hilfe einer Laborheizplatte und Heizblöcken und der Objektisch des Mikroskops über ein Steuergerät angewärmt. Von jedem Ejakulat wurden zwei Pailletten einzeln auf die Vorwärtsbeweglichkeit untersucht. Die tiefgefrorenen Pailletten wurden für 30 Sekunden im Wasserbad (Model WBS – 07) bei +38 °C aufgetaut, abgetrocknet und der Pailletteninhalt in vorgewärmte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach 10 Minuten Inkubationszeit erfolgte die Motilitätsanalyse. Dazu wurde mit der Paillette ein Ejakulatstropfen auf dem Objektträger platziert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Bei fehlerhafter Probenvorlage wie Lufteinschlüssen oder zu geringem/großem Probenvolumen wurde eine neue Probe vorbereitet. Für die Analyse wurden je Probe vier Analysefenster manuell fokussiert, von denen kurze Videosequenzen (Audio Video Interleave-Videos) aufgenommen wurden, die durch die Kamera digitalisiert und auf den gekoppelten Monitor übertragen wurden. Je Probe wurden mindestens 1000 Spermien analysiert. Bei zu niedriger Spermienkonzentration wurden weitere Messungen durchgeführt. Bei zu hoher Spermienkonzentration wurde die Probe im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 mit auf +38 °C vorgewärmten Spermaverdünner verdünnt und erneut analysiert. Nach Abschluss der Messungen wurden die Motilitätsparameter durch das AndroVision[®]-System berechnet und die erhobenen Daten in der Datenbank gespeichert.

2.2. Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Analysen erfolgten mit dem Durchflusszytometer Guava® easyCyte 5HT Benchtop. Das Durchflusszytometer war mit einem blauen Laser ausgestattet, dessen Anregungslicht eine Wellenlänge von 488 nm aufwies. Damit konnten die fünf Parameter Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) sowie drei Fluoreszenzfarben untersucht werden. Für die Emissionsmessung waren drei Filter verantwortlich: Filter 1 (525/30 nm) für die grüne Fluoreszenz, Filter 2 (583/26 nm) für die gelbe Fluoreszenz und Filter 3 (690/50 nm) für die rote Fluoreszenz. Das Durchflusszytometer verfügte über einen Plattenloader. Zum Einsatz kamen 96-Well-Platten. Für jede Probe wurden 5000 Spermazellen untersucht, sofern das mit 60 Sekunden gesetzte Zeitlimit nicht vorher erreicht wurde. Die Ergebnisse wurden als Punktdiagramm (Dot Plot) dargestellt. Die Auswertung erfolgte mit der Software CytoSoft und die Analysedaten wurden als Datei im Excelformat ausgegeben.

Zur Vermeidung von Temperaturschwankungen wurden die verwendeten Materialien und Lösungen sowie Spermaproben mit einer Laborheizplatte und Heizblöcken auf +38 °C angewärmt. Die Aliquotierung der Fluorochrome ist im Anhang dieser Arbeit aufgeführt (vgl. Kapitel IX.3., S. 111).

Routinemäßig wurden bei der Bayern-Genetik GmbH die Plasmamembranintegrität (PMI) untersucht und die Spermienkonzentration (CON) bestimmt. Zusätzlich war auch die Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) möglich.

2.2.1. Vorbereitungen am Durchflusszytometer und im Labor

Zu Beginn jedes Analysetages wurde ein Reinigungszyklus mit Reinstwasser sowie Wasch- und Reinigungsflüssigkeit am Durchflusszytometer durchgeführt, um das System von Verschmutzungen zu befreien und einen durchgehenden Flüssigkeitsstrom zu gewährleisten. Im Anschluss erfolgte die Kalibrierung des Durchflusszytometers mit dem Kalibrierkit, um sicherzustellen, dass Laser, FSC, SCC, Filter, Fluoreszenzdetektoren sowie Software richtig arbeiten. Einmal wöchentlich wurde zudem die Temperatur von Wasserbad, Laborheizplatte und Inkubator mit dem Digitalthermometer überprüft und gegebenenfalls adjustiert.

2.2.2. Probenvorbereitung für die durchflusszytometrische Analyse einschließlich Vorverdünnung

Je durchflusszytometrischem Untersuchungsdurchgang wurden 24 Ejakulate

analysiert, wobei pro Ejakulat zwei Pailletten als Poolprobe untersucht wurden. Die Spermapailletten wurden für 30 Sekunden im +38 °C temperierten Wasserbad mit Einhängethermostat aufgetaut, entnommen, abgetrocknet und auf die Laborwärmepatte überführt. Dann wurde der Inhalt der jeweils zusammengehörigen Pailletten in 1,3 ml Röhrchen gepoolt.

Für die durchflusszytometrische Analyse war auf Grund der Spermienkonzentration der Proben eine Vorverdünnung notwendig. Dazu wurden je 50 µl EasyBuffer B (EBB) in 24 Wells einer 96-Well-Platte vorgelegt. Nach Durchmischen der Spermaproben durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden von jeder Poolprobe 50 µl entnommen und in die Wells mit EBB pipettiert. Diese Vorverdünnung der Untersuchungsproben diente als Grundlage für die Analyse von PMI und MMP. Der Ablauf der durchflusszytometrischen Analyse ist in Abbildung 2 dargestellt.

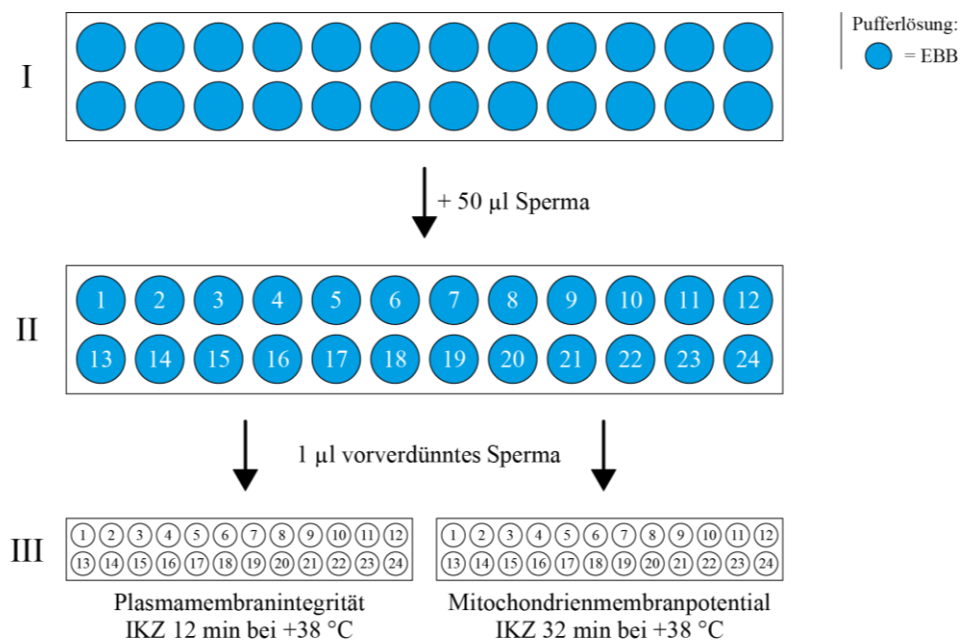


Abbildung 2: Schematische Darstellung der durchflusszytometrischen Standardanalyse

- I: Vorverdünnungsplatte mit EBB.
 II: Für die Vorverdünnung wird zu EBB eine äquivalente Menge an Sperma gegeben. Je Untersuchungsrunde werden 24 Ejakulate (1-24) untersucht.
 III: Je 1 µl vorverdünntes Sperma wird in die Arbeitslösungen für die Plasmamembranintegrität bzw. das Mitochondrienmembranpotential überführt und nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit durchflusszytometrisch analysiert.

Abk.: EBB: EasyBuffer B; 1-24: Ejakulate 1-24; IKZ: Inkubationszeit; µl: Mikroliter; min: Minuten

2.2.3. Plasmamembranintegrität

Für die Herstellung der Arbeitslösung für die Analyse der PMI wurden 5910 μl des Puffermediums BoviHold in ein 15 ml Tube pipettiert. Dem 0,5 μl SYBR[®] 14-Aliquot wurden 245 μl EBB hinzugefügt und durch Vortexen gemischt. Dann wurden 32 μl des verdünnten SYBR[®] 14 und 3,1 μl Propidiumiodid dem BoviHold zugegeben und erneut gevortext. 24 Wells einer 96-Well-Platte wurden mit je 199 μl Arbeitslösung befüllt. Im Anschluss wurde je 1 μl der Spermiovorverdünnung in die Arbeitslösung überführt, die abgedeckte Platte für 12 Minuten bei +38 °C inkubiert und nachfolgend analysiert (vgl. Abbildung 2 und Abbildung 3).

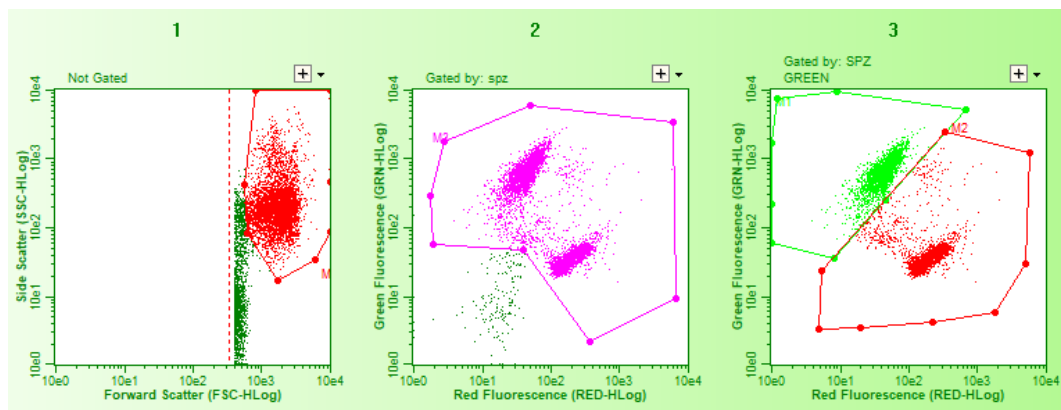


Abbildung 3: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der Plasmamembranintegrität

Plot 1: Alle Partikel werden anhand von Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) selektiert. Dabei kann auf Grund von Größe und Oberfläche eine Population mit Partikeln abgegrenzt werden (rotes Feld), die die Charakteristika einer Spermazelle aufweist.

Plot 2: Die in Plot 1 ausgewählte Zellpopulation wird hier basierend auf Fluoreszenz weiter eingegrenzt (pinkes Feld) und Partikel, die keine/kaum Fluoreszenz aufweisen (grüne Punkte), werden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Plot 3: Die in Plot 2 ausgewählten Zellen werden hier auf Grund ihrer tatsächlichen Fluoreszenz dargestellt und den unterschiedlichen Spermienpopulationen zugeordnet. Plasmamembranintakte Spermien fluoreszieren grün (grünes Feld), während membrangeschädigte Spermazellen eine rote Fluoreszenz (rotes Feld) aufweisen.

2.2.4. Mitochondrienmembranpotential

Für die Herstellung der Arbeitslösung zur Analyse des MMP wurde phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) im Verhältnis 1:10 mit Reinstwasser verdünnt und 5940 μl davon vorgelegt. Dann wurden dem 1 μl 5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Iodid-(JC-1)-Aliquot 90 μl Ethanol hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. 70 μl der Fluorochrommischung wurden in die verdünnte PBS-Lösung überführt und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. In 24 Wells einer 96-Well-Platte wurden je 199 μl Arbeitslösung vorgelegt

und je 1 μl der Spermiovorverdunnung hinzupipettiert. Die abgedeckte Platte wurde für 32 Minuten bei $+38\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Inkubator inkubiert und im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert (vgl. Abbildung 2 und Abbildung 4).

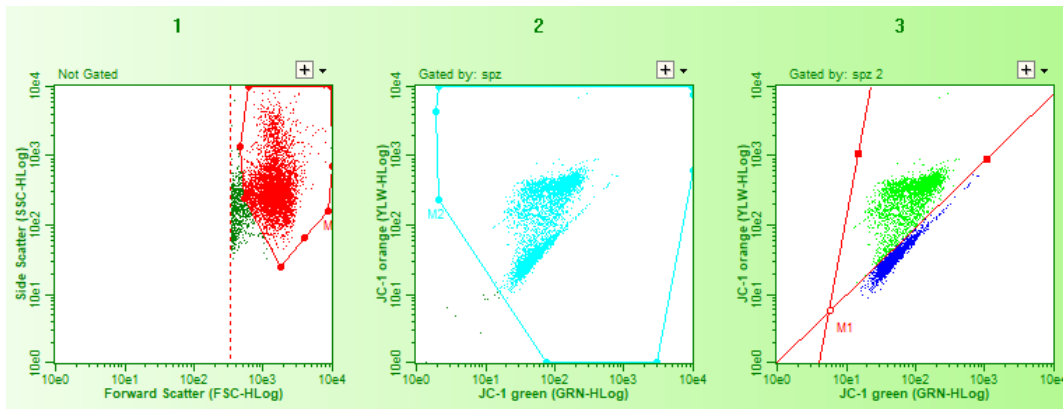


Abbildung 4: Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Untersuchung des Mitochondrienmembranpotentials

Plot 1: Alle Partikel werden anhand von Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) selektiert. Dabei kann auf Grund von Größe und Oberfläche eine Population mit Partikeln abgegrenzt werden (rotes Feld), die die Charakteristika einer Spermazelle aufweist.

Plot 2: Die in Plot 1 ausgewählte Zellpopulation wird hier basierend auf Fluoreszenz weiter eingegrenzt (türkises Feld) und Partikel, die keine/kaum Fluoreszenz aufweisen (grüne Punkte), werden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Plot 3: Die in Plot 2 ausgewählten Zellen werden hier auf Grund ihrer tatsächlichen Fluoreszenz dargestellt und den unterschiedlichen Spermienpopulationen zugeordnet. Spermien mit hohem MMP fluoreszieren orange (grüne Population), während Spermien mit niedrigem MMP auf Grund der ausbleibenden Aggregatbildung grünes Fluoreszenzlicht emittieren (blaue Population).

2.2.5. Konzentration

Für die Konzentrationsbestimmung wurde eine neue Vorverdunnung erstellt. Dazu wurden die Spermaproben im Verhältnis 1:20 mit Reinstwasser (10 μl natives Sperma, 190 μl Reinstwasser) vermischt. Je 190 μl der Arbeitslösung, bestehend aus 5000 μl EBB und 30 μl PI, wurden in der 96-Well-Platte vorgelegt und je 10 μl der Spermiovorverdunnung hinzupipettiert. Dadurch wird eine Endverdunnung von 1:400 erreicht. Nach 12-minütiger Inkubation bei $+38\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgte die durchflusszytometrische Konzentrationsbestimmung.

3. Laboruntersuchungen

Im Rahmen der Laboruntersuchungen wurde der Einfluss folgender vier Puffermedien auf die Standardqualitätsparameter der Bayern-Genetik GmbH, einschließlich dem MMP, untersucht, um daraus Rückschlüsse auf ihre Eignung als Trägermedium für die HVB zu ziehen:

- | | | |
|------------------------------|---|-------------------|
| - EasyBuffer B | = | EBB |
| - modifiziertes Fert-TALP | = | mFert-TALP |
| - BO-IVF TM | = | BIVF |
| - BO-SemenPrep TM | = | BSPREP |

Die Produktbeschreibungen der vier verwendeten Puffermedien sowie die Zusammensetzung und Herstellung des mFert-TALP sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt (vgl. Kapitel IX.1., S. 105).

Die verwendeten Analyseprotokolle von CASA und Durchflusszytometrie wurden an die in Kapitel III.2. beschriebenen Standardprotokolle der Bayern-Genetik GmbH adaptiert. Für die Laboruntersuchungen wurden Spermapailletten ($n = 27$) von je einem Tiefgefrierejakulat von zehn Jungbullen ($n = 10$) herangezogen. Die Tiefgefrierejakulate wurden am selben Sprungtag produziert und mit dem eigelbhaltigen Steridylverdünner verarbeitet.

3.1. Computergestützte Spermienanalyse (CASA)

Für die CASA wurden vor Analysebeginn je 100 μ l der vier verschiedenen Pufferlösungen (EBB, mFert-TALP, BIVF, BSPREP) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt. Pro Untersuchungsrunde wurden drei Pailletten pro Ejakulat für 30 Sekunden bei +38 °C aufgetaut, abgetrocknet und der Pailletteninhalt in einem Reaktionsgefäß gepoolt. Nach Durchmischen der Probe durch vorsichtiges Auf- und Abpipetieren wurden je 100 μ l Sperma entnommen, mit der äquivalenten Menge der vier Pufferlösungen behutsam durchmischt und für 10 Minuten bei +38 °C inkubiert.

Nach 10-minütiger Inkubation wurde jede der vier vorverdünnten Spermaproben einer Analyse mit dem CASA-System unterzogen. Nach vorsichtigem Durchmischen mit einer Pipette wurden 3,7 μ l Probe entnommen, auf dem Objektträger vorgelegt, mit einem Deckgläschen abgedeckt und analysiert. Eine zweite Messung erfolgte analog zur ersten Untersuchung nach insgesamt 70 Minuten Inkubation bei +38 °C. Dieser Untersuchungsvorgang wurde für jedes der zehn Ejakulate viermal wiederholt. Der Untersuchungsablauf ist in Abbildung 5 dargestellt.

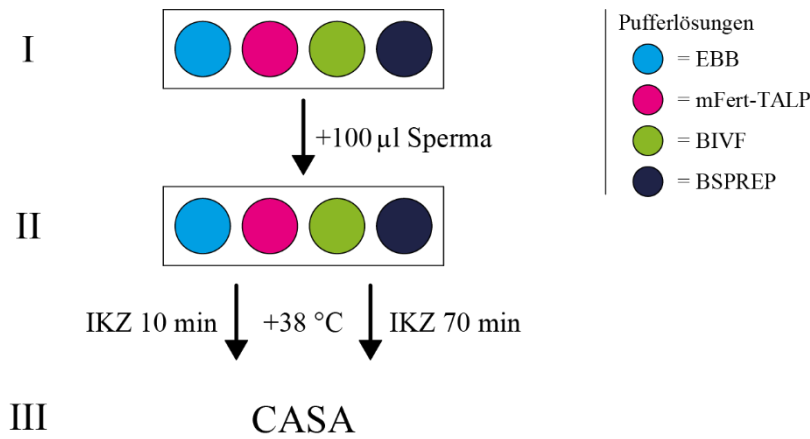


Abbildung 5: Schematische Darstellung der CASA im Rahmen der Dissertation

- I: Zuerst werden je 100 µl der vier Pufferlösungen vorbereitet.
- II: Je 100 µl der gepoolten Spermaprobe werden zu den angewärmten Medien pipettiert.
- III: Nach 10 bzw. 70 Minuten Inkubation bei +38 °C erfolgt die Analyse mit dem CASA-System.

Um einen Einfluss der Untersuchungsposition auszuschließen, wurde die Position der Puffermedien bei jeder Wiederholung der Untersuchung verändert.

Abk.: CASA: computergestützte Spermienanalyse; EBB: EasyBuffer B; mFert-TALP: modifiziertes Fert-TALP, BIVF: BO-IVFTM; BSPREP: BO-SemenPrepTM; IKZ: Inkubationszeit; µl: Mikroliter; min: Minuten

3.2. Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Spermaproben ist zum besseren Verständnis in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Abweichend zum Standardprotokoll wurde die Vorverdünnung der Proben im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit vier verschiedenen Pufferlösungen (EBB, mFert-TALP, BIVF, BSPREP) durchgeführt. Die 24 Wells der Vorverdünnungsplatte wurden nach folgendem Schema mit je 50 µl der einzelnen Puffermedien beschickt: Well 1/5/9/13/17/21 EBB; Well 2/6/10/14/18/22 mFert-TALP; Well 3/7/11/15/19/23 BIVF; Well 4/8/12/16/20/24 BSPREP. Die Arbeitslösungen für die Analyse von PMI und MMP wurden, wie in den Kapiteln III.2.2.3 und III.2.2.4 beschrieben, hergestellt.

Pro Untersuchungsrunde wurden fünf der zehn Ejakulate untersucht. Von jedem Ejakulat wurden je drei Pailletten bei +38 °C für 30 Sekunden im Wasserbad aufgetaut, abgetrocknet und eine Poolprobe erstellt. Nach Durchmischen der Probe durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden je 50 µl entnommen, mit der äquivalenten Menge der vier vorbereiteten Pufferlösungen vorverdünnt und für 10 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit dem Beschicken der

Arbeitsplatte für die Analyse der PMI begonnen und nach weiteren 4 Minuten wurde die Platte für das MMP beschickt. Eine Referenzprobe wurde bei allen Durchgängen zur Kontrolle mituntersucht. Dieser Untersuchungsvorgang wurde für jedes der zehn Ejakulate fünfmal wiederholt.

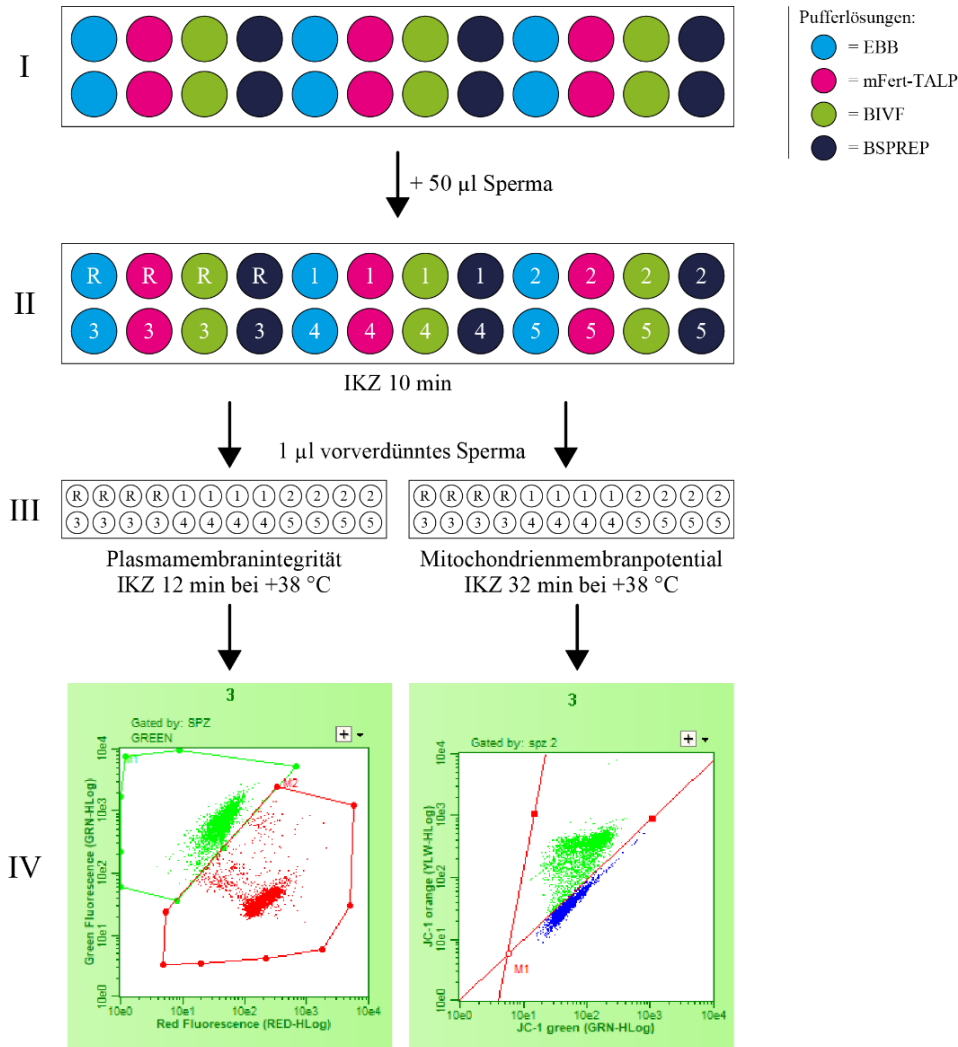


Abbildung 6: Schematische Darstellung der durchflusszytometrischen Untersuchung im Rahmen der Dissertation

- I:** Vorbereitung der Vorverdünnungsplatte mit den vier Pufferlösungen
- II:** Erstellen der Vorverdünnung durch Zugabe einer äquivalenten Menge an Sperma zu den angewärmten Puffermedien. Je Untersuchungsrunde wurden neben der Referenzprobe fünf Ejakulate untersucht, die jeweils mit jedem der vier Medien inkubiert wurden.
- III:** Nach 10 Minuten wird je 1 µl vorverdünntes Sperma in die Untersuchungsplatte für die Plasmamembranintegrität, nach weiteren 4 Minuten in die Untersuchungsplatte für das Mitochondrienmembranpotential pipettiert.
- IV:** Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit erfolgt die Analyse von Plasmamembranintegrität bzw. Mitochondrienmembranpotential.

Abk.: EBB: EasyBuffer B; mFert-TALP: modifiziertes Fert-TALP; BIVF: BO-IVF™; BSPREP: BO-SemenPrep™; R: Referenzprobe; 1-5: Ejakulate 1-5; IKZ: Inkubationszeit; µl: Mikroliter; min: Minuten

4. Künstliche Besamungen (KB)

Der praktische Teil der Arbeit war in zwei Abschnitte gegliedert. Zum einen wurde die HVB bei routinemäßigen Besamungen im Rahmen der natürlichen Brunst angewendet und mit der Standardbesamungsmethode hinsichtlich der Konzeptionsraten verglichen. Zum anderen wurden Spendertiere bei routinemäßigen Superovulationen mit der HVB besamt und die Spülergebnisse mit Ergebnissen standardmäßig durchgeführter Spülungen verglichen. Als Trägermedium für die HVB wurde das modifizierte Fert-TALP verwendet, das in Anlehnung an das von STROUD (2015, 2016b) entwickelte Maximate[®] hergestellt wurde (vgl. Kapitel IX.1).

4.1.1. Standardbesamung

Die Standardbesamung wurde, wie von BUSCH (2007a) beschrieben, als intrauterine Besamung mit transrektaler Fixation der Zervix durchgeführt. Standardmäßig werden heutzutage 0,25 ml-Spermapailletten eingesetzt.

4.1.2. High-volume-Besamung (HVB)

Die HVB wurde basierend auf dem Patent „Method, apparatus and kit for artificial insemination of bovine“ von STROUD (2020) durchgeführt. Anstelle der Metallkatheter wurden Einmaluteruskatheter verwendet.

Zuerst wurde die Spermapaillette analog zur Standardbesamung für 10 Sekunden bei +38 °C im Wasserbad aufgetaut, abgetrocknet und das verschweißte Ende abgetrennt. Dann wurde die Paillette in die Öffnung des Faltenbalgbehälters mit dem modifizierten Fert-TALP (23 ml) überführt (vgl. Abbildung 7 I). Der befüllte Faltenbalgbehälter wurde zuvor in der Klimabox bei +37 °C angewärmt. Mit Hilfe eines Mandrins wurde der Kunststoffstopfen vorgeschoben und der Pailletteninhalt in mFert-TALP überführt (vgl. Abbildung 7 II). Im Anschluss wurde der Faltenbalgbehälter über eine flexible Silikonverbindung mit dem Einmaluteruskatheter verbunden (vgl. Abbildung 7 III und IV). Die sich anschließende Besamung wurde analog der Standardbesamung als intrauterine Besamung durchgeführt. Für die Applikation wurde der Faltenbalg so gedreht, dass die Spitze senkrecht nach unten zeigte und das Medium-Sperma-Gemisch durch vorsichtiges Zusammendrücken in den Uterus appliziert (vgl. Abbildung 7 V und VI). Um einen Rückfluss der Flüssigkeit durch Sogwirkung zu vermeiden, wurde der Katheter unter Gedrückthalten des Faltenbalgs aus dem Uterus entfernt.



Abbildung 7: Praktische Durchführung der high-volume-Besamung in der Routinebesamung beim Rind

- I: Nach dem Auftauen der Paillette für 10 Sekunden bei +38 °C wird das verschweißte Ende entfernt und die Paillette über die Öffnung in den Faltenbalg gesteckt.
- II: Mit Hilfe eines Mandrins wird das Sperma durch Vorschieben des Kunststoffstopfens in das angewärmte Medium überführt.
- III: Über eine Silikonverbindung wird der Faltenbalg am Einmaluteruskatheter fixiert.
- IV: Ansicht der Besamungsvorrichtung für die HVB.
- V/VI: Praktische Anwendung am Tier: Die Spitze des Besamungskatheters wird durch transrektale Palpation in den Gebärmutterkörper eingeführt. Dann wird der Faltenbalg um 90° nach oben gedreht und das Medium-Sperma-Gemisch durch langsames Zusammendrücken des Faltenbalgs in die Gebärmutter appliziert.

4.2. Routinemäßige Besamungen im Rahmen der natürlichen Brunst

Insgesamt wurden vom 01.05.2020 bis zum 17.05.2020 200 Kalbinnen und Kühe der Rasse Deutsches Fleckvieh im Rahmen der natürlichen Brunst durch einen Besamungstechniker mit TG-Sperma von fünf genomischen Jungbullen besamt. Drei Bullen waren zur Besamung von Kalbinnen geeignet. Die Bullen waren zum Zeitpunkt der Spermagewinnung klinisch gesund. Die Ejakulate erfüllten die von der ADR bestimmten Mindestanforderungen und die von der Bayern-Genetik GmbH zusätzlich festgelegten Qualitätskriterien. Tag der Spermagewinnung, Weiterverarbeitung sowie Tiefgefrierung war der 14.02.2020. Die fünf Jungbullen wurden routinemäßig zweimal die Woche abesamt.

Von den insgesamt 200 Routine-Besamungen wurden 100 als Standardbesamungen und 100 als HVB durchgeführt. Pro Ejakulat waren 20 Standardbesamungen und 20 HVB zu verzeichnen. Die Auswahl der Besamungstechnik erfolgte willkürlich durch den Besamungstechniker. Lediglich bei der Auswahl der Bullen hatten die Landwirte ein Mitspracherecht.

Über das Mobile-Daten-Erfassungsgerät wurden die Besamungsdaten erfasst und auf die zentrale Warenwirtschaftssoftware KBPro eingespielt. Erfasst wurden Betrieb, besamtes Tier, Ejakulat und Besamungsmethode sowie die Anzahl der in der laufenden Zuchtperiode vorher durchgeführten Besamungen. Ab Tag 35 post inseminationem wurden bei allen besamten Tieren, die nicht erneut zur Besamung vorgestellt wurden, Trächtigkeitsuntersuchungen per transrektaler Palpation durch den Besamungstechniker durchgeführt. Die Auswertung der geschlechtlichen Verteilung der Kälber basierte auf dem tatsächlichen Geschlecht bei der Geburt und erfolgte im Frühjahr 2021.

Die 200 Besamungen wurden an 65 Betrieben durchgeführt, die in der Regel einmal täglich angefahren wurden. Die betrieblichen Strukturen, einschließlich Haltung und Fütterung, gestalteten sich sehr unterschiedlich. Der kleinste Betrieb hatte 12 Milchkühe und der größte circa 100 Milchkühe. Es waren sowohl Anbinde- als auch Laufstallhaltungen vorzufinden. Zwei der 65 Betriebe wurden biologisch geführt. In sechs Betrieben wurde mit einem automatischen Melksystem gemolken. Die Fütterung basierte in den meisten Betrieben auf Mais- und Grassilage sowie Kraftfutter, Heu und Stroh und wurde in einigen Betrieben als totale Mischration gefüttert.

4.3. Routinemäßige Besamungen im Rahmen des Embryotransfers

4.3.1. Spendertiere

Die zwölf Spendertiere waren an der Embryotransfer-(ET)-station der Bayern-Genetik GmbH mit Standort Kammerlehen untergebracht. Sie wurden in Einzelboxen auf Tiefstreu aus Stroh gehalten und mit Heu ad libitum sowie restriktiv mit Kraft-, Mineralfutter und β -Carotin gefüttert. Es handelte sich um nicht laktierende Milchkühe der Rasse Fleckvieh ($n = 11$) und ein Jungrind der Rasse Wagyu. Die Spendertiere waren zum Zeitpunkt der Spülungen klinisch gesund. Das ET-Team der Bayern-Genetik GmbH, bestehend aus dem Stationstierarzt und zwei Embryotransfertechnikern, war routinemäßig sowohl für die Vorbereitung der Spendertiere als auch für die Durchführung der künstlichen Besamungen sowie die Embryonengewinnung verantwortlich.

4.3.2. Superovulation und Besamung

Die Brunstbeobachtung erfolgte durch das Brunsterkennungsprogramm Bayern-Watch. Acht bis 14 Tage nach Brunst wurde die sonographische Untersuchung von Gebärmutter und Ovarien durchgeführt. Die Einleitung der Superovulation erfolgte nur bei Vorhandensein eines zyklischen Gelbkörpers und in Abwesenheit pathologischer Befunde. Um die Gelbkörperphase zu verlängern, wurde zum Teil mit CIDR[®]-Vaginalspiralen gearbeitet. Die Induktion der Superovulation erfolgte mit den Hormonpräparaten Folltropin[®] und Pluset[®]. Für jedes der beiden Präparate waren Superovulationsprotokolle mit unterschiedlichen Dosierungsschemata verfügbar (siehe Anhang Tabelle 14, S. 116). Spendertiere, die mehrmals einer Superovulation unterzogen wurden, wurden teilweise mit unterschiedlichen Hormonprotokollen vorbereitet, die individuell anhand der Ergebnisse vorangegangener Spülungen angepasst wurden. Die Brunst wurde durch Prostaglandin-Gabe (Dinolytic[®]) ausgelöst. Alle Injektionen erfolgten intramuskulär. Die Bezugsquellen der Medikamente sind im Anhang (vgl. Kapitel IX.2.3.) aufgeführt.

Insgesamt wurden zwischen dem 06.02.2018 und dem 14.11.2019 31 Spülungen durchgeführt, bei denen die Besamungen als HVB durchgeführt wurden. Jedes Spendertier wurde im Rahmen einer Superovulation viermal im Abstand von je 12 Stunden besamt. Dabei wurde Sperma von ein bis drei verschiedenen Bullen eingesetzt, wobei pro Besamung nur ein Bulle verwendet wurde. Bei zwei Spülungen wurde gesextes Sperma verwendet. In diesen Fällen wurden nur zwei Besamungen

durchgeführt. Die erste Besamung erfolgte 15 Stunden nach Aktivitätsspitze (entspricht der dritten Besamung) mit vier Pailletten gesextem Sperma, die zweite 10 Stunden nach der ersten Besamung (entspricht der vierten Besamung) mit zwei Pailletten. Als Vergleich wurden, wenn vorhanden, Ergebnisse von Spülungen derselben Spendertiere herangezogen, bei denen die Besamungen als Standardbesamungen durchgeführt wurden (n = 21).

4.3.3. Embryonengewinnung und Beurteilung

Die Embryonengewinnung erfolgte nicht chirurgisch 7 Tage nach der zweiten Besamung. Nach Setzen einer kaudalen Epiduralanästhesie (Procamidol®) wurde jedes Uterushorn einzeln gespült. Dafür wurde der Embryonenspülkatheter unter Rektalkontrolle mit Hilfe eines Mandrins in das jeweilige Uterushorn eingeführt und durch Ballonierung der Katheterspitze fixiert. Jedes Horn wurde fünf bis sechs Mal mit je 50 ml Spülmedium gespült (Kalbin nur 40 ml Spülmedium), das vorher auf +37 °C erwärmt wurde. Im Anschluss an die Spülung wurde die wiedergewonnene Spülflüssigkeit im mobilen ET-Labor mit Hilfe des EmSafe Filtersystems gefiltert, das zugleich auch als Suchschale diente. Unter dem Stereomikroskop erfolgte bei 15-facher Vergrößerung die Suche nach den Embryonen und Eizellen. Mit Hilfe der an das Stereomikroskop gekoppelten Moticam war es möglich, Aufnahmen der Embryonen zu machen. Die Beurteilung von Entwicklungsstadium und Qualität durch den Stationstierarzt basierte auf den im Handbuch der „International Embryo Technology Society“ (IETS) festgelegten Einteilungskriterien (BÓ und MAPLETOFT, 2013). Während das Stadium den Entwicklungsstand jedes einzelnen Embryos beschreibt, wird bei der Qualität die morphologische Integrität eines jeden Embryos, einschließlich der (Ir)Regularität der Embryonenmasse sowie Größe, Farbe und Dichte der einzelnen Zellen beurteilt (vgl. Tabelle 4, S. 45). Die Embryonen wurden entweder direkt frisch übertragen oder bei ausreichend guter Qualität eingefroren und bis zur Übertragung tiefgefrierkonserviert. Die Erfassung der Embryotransferdaten erfolgte über das Herdenüberwachungsprogramm HerdVision.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Entwicklungsstadien und Qualitäten boviner Embryonen modifiziert nach BÓ und MAPLETOFT (2013)

Code	Entwicklungsstadium	Definition
1	unbefruchtete Eizelle, 1-Zell-Embryo	
3	(frühe) Morula	Zellmasse bestehend aus mindestens 16 Zellen, einzelne Blastomere nur schwer voneinander abgrenzbar
4	kompakte Morula	Verschmelzung der individuellen Blastomere zu kompakter Masse
5	frühe Blastozyste	Blastocoel zu erkennen, innere Zellmasse und Trophektoderm schwer voneinander abgrenzbar
6	Blastozyste	prominentes Blastocoel, innere Zellmasse und Trophektoderm voneinander abgrenzbar
7	expandierte Blastozyste	Zunahme im Durchmesser, Ausdünnung der Zona pellucida
8	geschlüpfte Blastozyste	Embryo schlüpft gerade oder hat Zona pellucida bereits abgestreift
Code	Qualität	Definition
1	ausgezeichnet/gut	mindestens 85 % intakte, lebensfähige Embryonenmasse
2	angemessen	mindestens 50 % intakte Embryonenmasse
3	schlecht	mindestens 25 % intakte Embryonenmasse
4	tot, degeneriert	umfasst Embryonen, Oozyten und 1-Zell-Embryonen

5. Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse wurde mit der statistischen Software R (R version 4.0.3 (2020-10-10)) durchgeführt. Die deskriptive Analyse der Daten erfolgte mit Microsoft Excel.

Die Auswertung der Laboruntersuchungen, in denen der Einfluss von vier Puffermedien auf Spermaqualitätsparameter untersucht wurde, erfolgte mit gemischten Regressionsmodellen.

Für die Auswertung der Anwendung der high-volume-Besamung bei den routinemäßigen Besamungen im Rahmen der natürlichen Brunst wurden der Einfluss von Besamungsmethode, Paritätsstatus, Anzahl der vorangegangenen Besamungen und Bulle auf die Konzeptionsraten mittels logistischer Regressionsmodelle analysiert. Für die Untersuchung, ob die Besamungsmethode einen Einfluss auf die Geschlechterverteilung der Kälber hat, wurde der Pearson-Chi-Quadrat-Test gewählt. Die Beurteilung der Geschlechterverteilung innerhalb einer Besamungsmethode wurde mit dem Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Im ET-Bereich wurde der Einfluss der Besamungsmethoden auf die Anzahl an tauglichen Embryonen in Bezug auf die Gesamtheit der gewonnenen Embryonen/Oozyten untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss der beiden Besamungsmethoden auf die Qualitätsstadien (Qualität 1-3) der Embryonen in Bezug auf die tauglichen Embryonen analysiert. Es wurde mit (robusten) linearen Regressionsmodellen gearbeitet. Die robusten Modelle waren auf Grund der Abweichung einer oder mehrerer Modellannahmen notwendig.

Die sich den einzelnen Modellen anschließenden Vergleiche wurden mit Kontrastanalysen durchgeführt. Die p-Wert-Anpassungen für multiple Vergleiche wurden mit der Tukey-Methode vorgenommen.

Das Signifikanzniveau α betrug 5 %. Die p-Werte wurden in folgende Kategorien eingeteilt:

- $0,05 \leq p\text{-Wert} < 0,1$: Tendenz
- $0,01 \leq p\text{-Wert} < 0,05$: signifikantes Ergebnis
- $0,001 \leq p\text{-Wert} < 0,01$: hoch signifikantes Ergebnis
- $p < 0,001$: höchst signifikantes Ergebnis

IV. ERGEBNISSE

Für die Laboruntersuchungen sind im Fließtext sowie in den Diagrammen, wenn nicht anders beschrieben, die bei der statistischen Auswertung modellierten Datenwerte angegeben. Bei den Resultaten der Untersuchungen zur künstlichen Besamung sind im Fließtext sowie in den Diagrammen, wenn nicht anders beschrieben, die Rohdaten aufgeführt.

1. Einfluss der Puffermedien auf die Spermaqualität

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von vier verschiedenen Puffermedien auf Qualitätsparameter boviner Ejakulate untersucht.

- EasyBuffer B = **EBB**
- modifiziertes Fert-TALP = **mFert-TALP**
- BO-IVFTM = **BIVF**
- BO-SemenPrepTM = **BSPREP**

Die für die Laboruntersuchungen herangezogenen Ejakulate (n = 10) wurden alle am selben Produktionstag gewonnen und zu TG-Sperma verarbeitet. Sie erfüllten die von der ADR für natives Bullensperma festgelegten Qualitätskriterien (vgl. Tabelle 5 und Tabelle 12, S. 115).

Tabelle 5: Ausgangswerte der für die Laboruntersuchungen verwendeten Nativejakulate

Bulle	Volumen [ml]	Dichte [x 10 ⁹ /ml]	MB [- bis +++]	geschätzte VB [%]
Bulle A	5,7	1,529	+++	75
Bulle B	4,6	1,725	+++	75
Bulle C	4,8	2,040	+++	75
Bulle D	4,2	0,941	++	80
Bulle E	7,0	2,103	+++	75
Bulle F	6,0	1,871	+++	75
Bulle G	6,2	2,014	+++	75
Bulle H	4,8	1,860	+++	80
Bulle I	5,0	1,943	+++	75
Bulle J	7,1	1,435	+++	75

Abk.: MB: Massenbewegung; VB: Vorwärtsbeweglichkeit; ml: Milliliter; -: keine Massenbewegung; +: geringe Massenbewegung; ++: gute Massenbewegung; +++: sehr gute Massenbewegung

1.1. Einfluss der Puffermedien auf die progressive Spermienmotilität

Mit Hilfe der CASA wurde der Einfluss der vier verschiedenen Puffermedien auf die progressive Motilität der Spermien nach 10 Minuten (Zeitpunkt 1) und 70 Minuten Inkubation (Zeitpunkt 2) bei +38 °C untersucht.

Zum Zeitpunkt 1 lag der prozentuale Anteil an progressiv motilen Spermien im Durchschnitt bei 63,5 % (EBB), 62,4 % (mFert-TALP), 61,8 % (BIVF) und 59,2 % (BSPREP). Bei den mit EBB inkubierten Spermaproben war ein signifikant höherer Anteil an progressiv motilen Spermien als bei den mit BSPREP-inkubierten Proben zu verzeichnen ($p = 0,007$). Die Inkubation mit mFert-TALP führte zu einer tendenziell höheren progressiven Motilität im Vergleich zu BSPREP ($p = 0,076$). Für die anderen Medien (EBB – mFert-TALP, EBB – BIVF, mFert-TALP – BIVF, BIVF – BSPREP) konnte kein signifikanter Unterschied beim prozentualen Anteil an progressiv motilen Spermien aufgezeigt werden ($p > 0,207$).

Zum Zeitpunkt 2 lag der prozentuale Anteil an progressiv motilen Spermien im Durchschnitt bei 57,8 % (EBB), 53,2 % (mFert-TALP), 51,8 % (BIVF) und 41,0 % (BSPREP). Zwischen den beiden Puffermedien mFert-TALP und BIVF konnte dabei kein statistisch signifikanter Unterschied beim prozentualen Anteil an progressiv motilen Spermien festgestellt werden ($p = 0,695$). Bei den mit EBB inkubierten Spermien war ein signifikant höherer Anteil an progressiv motilen Spermien als bei den mit mFert-TALP inkubierten Spermien zu verzeichnen ($p = 0,003$), der im Vergleich zu den mit BIVF und BSPREP inkubierten Spermien höchst signifikant war ($p < 0,001$). Bei den mit mFert-TALP und BIVF inkubierten Spermien war zum Zeitpunkt 2 ein höchst signifikant höherer Anteil an progressiv motilen Spermien als bei den mit BSPREP inkubierten Spermien ($p < 0,001$) zu verzeichnen.

Bei allen vier Puffermedien bestand ein höchst signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil an durchschnittlich progressiv motilen Spermien zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 ($p < 0,001$) (vgl. Abbildung 8). Die prozentualen Differenzen für die einzelnen Puffermedien beim Anteil an progressiv motilen Spermien zwischen den Untersuchungszeitpunkten 1 und 2 lagen bei -5,7 % (EBB), -9,2 % (mFert-TALP), -10,0 % (BIVF), -18,2 % (BSPREP).

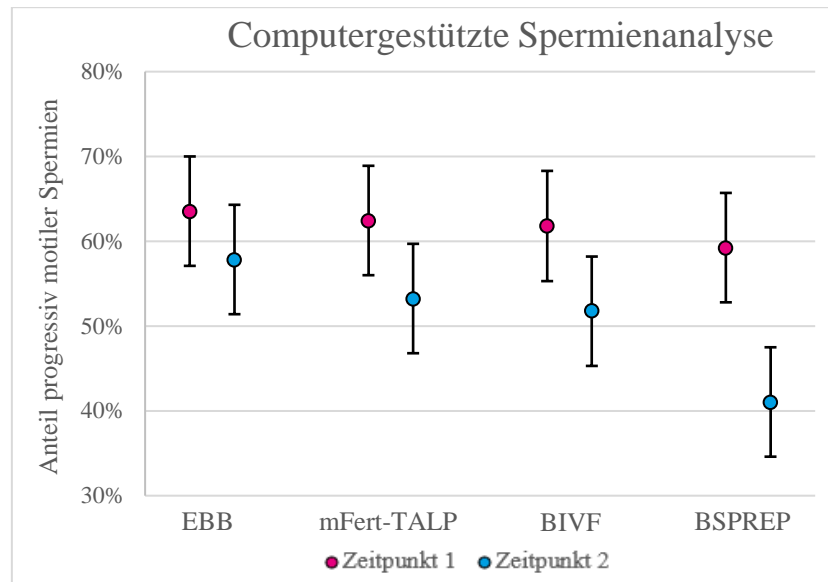


Abbildung 8: Anteil progressiv motiler Spermien zu den Untersuchungszeitpunkten 1 und 2

Dargestellt sind die modellierten Mittelwerte von Prozenten einschließlich der 95 %-Konfidenzintervalle. Die Werte finden sich im Anhang in Tabelle 15.

Abk.: EBB: EasyBuffer B; mFert-TALP: modifiziertes Fert-TALP, BIVF: BO-IVF™; BSPREP: BO-SemenPrep™; Zeitpunkt 1: 10 Minuten Inkubation; Zeitpunkt 2: 70 Minuten Inkubation

1.2. Einfluss der Puffermedien auf durchflusszytometrische Spermaqualitätsparameter

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde der Einfluss der vier verschiedenen Puffermedien auf die Plasmamembranintegrität (PMI) und das Mitochondrienmembranpotential (MMP) der zehn Ejakulate untersucht.

1.2.1. Plasmamembranintegrität

Bezogen auf die einzelnen, für die Inkubation verwendeten Puffermedien, lag der Anteil an plasmamembranintakten Spermien aller Ejakulate bei durchschnittlich 41,7 % (EBB), 41,1 % (mFert-TALP), 41,3 % (BIVF) und 40,3 % (BSPREP). Zwischen den einzelnen Medien (EBB – mFert-TALP, EBB – BIVF, EBB – BSPREP, mFert-TALP – BIVF, mFert-TALP – BSPREP, BIVF – BSPREP) waren keine signifikanten Unterschiede bei der PMI festzustellen ($p > 0,267$) (vgl. Abbildung 9).

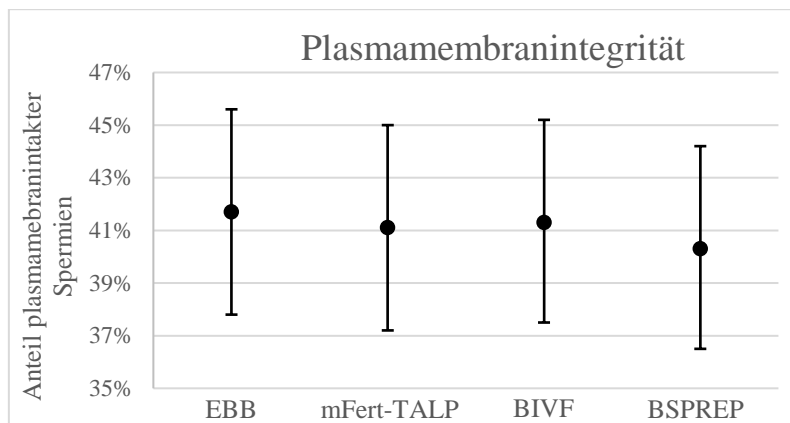


Abbildung 9: Anteil plasmamembranintakter Spermien

Dargestellt sind die modellierten Mittelwerte von Prozenten einschließlich der 95 %-Konfidenzintervalle. Die Werte finden sich im Anhang in Tabelle 15.

Abk.: EBB: EasyBuffer B; mFert-TALP: modifiziertes Fert-TALP, BIVF: BO-IVF™; BSPREP: BO-SemenPrep™

1.2.2. Mitochondrienmembranpotential

Bezogen auf die einzelnen, für die Inkubation verwendeten Puffermedien lag der Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential (hMMP) für alle Ejakulate bei durchschnittlich 50,6 % (EBB), 45,0 % (mFert-TALP), 45,2 % (BIVF) und 52,1 % (BSPREP). Kein signifikanter Unterschied für den prozentualen Anteil an Spermien mit hMMP bestand zwischen den mit EBB und BSPREP sowie mFert-TALP und BIVF inkubierten Spermaproben ($p > 0,621$). Die mit EBB und BSPREP inkubierten Spermien hatten einen signifikant höheren Anteil an Spermien mit hMMP als die mit mFert-TALP und BIVF inkubierten Spermien ($p < 0,001$) (vgl. Abbildung 10).

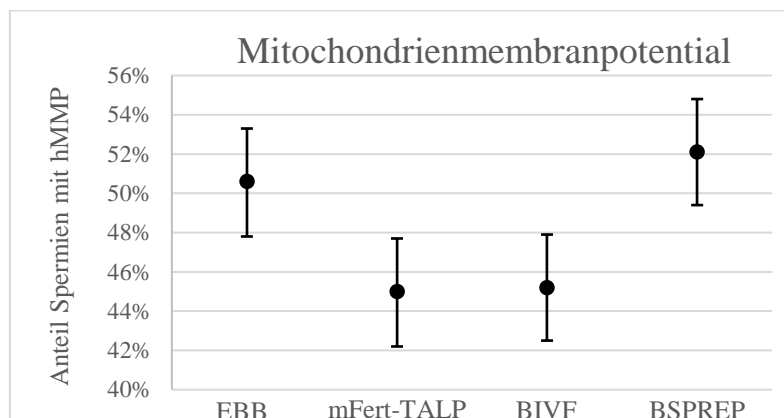


Abbildung 10: Anteil Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential

Dargestellt sind die modellierten Mittelwerte von Prozenten einschließlich der 95 %-Konfidenzintervalle. Die Werte finden sich im Anhang in Tabelle 15.

Abk.: hMMP: hohes Mitochondrienmembranpotential; EBB: EasyBuffer B; mFert-TALP: modifiziertes Fert-TALP, BIVF: BO-IVF™; BSPREP: BO-SemenPrep™

2. Einfluss der Besamungsmethode auf das Ergebnis routinemäßiger KB und ET

2.1. Einfluss der Besamungsmethode auf das Ergebnis der routinemäßigen KB

Die eingesetzten Ejakulate (n = 5) erfüllten sowohl bei der konventionellen Analyse (vgl. Tabelle 6) als auch nach der TG-Konservierung (vgl. Tabelle 7) die von der ADR und von der Bayern-Genetik GmbH zusätzlich festgelegten Qualitätsanforderungen (vgl. Tabelle 3, S. 31 und Tabelle 12, S. 115).

Tabelle 6: Ausgangswerte der für die Besamungen verwendeten Nativejakulate

Bulle	Volumen [ml]	Dichte [x 10 ⁹ /ml]	MB [- bis +++]	geschätzte VB [%]
I	2,7	1,753	+++	80
II	6,1	1,495	+++	75
III	7,6	1,630	++	75
IV	4,5	1,523	+++	75
V	3,2	1,254	+++	75

Abk.: MB: Massenbewegung; VB: Vorwärtsbeweglichkeit; ml: Milliliter; -: keine Massenbewegung; +: geringe Massenbewegung; ++: gute Massenbewegung; +++: sehr gute Massenbewegung

Tabelle 7: Qualitätskontrolle nach Tiefgefrierkonservierung

Bulle	prog. Sp. 1 [%]	prog. Sp. 2 [%]	Ø prog. Sp. [%]	PMI [%]	Sp./P. [x 10 ⁶]	Ø prog. Sp./P. [x 10 ⁶]	PMI Sp./P. [x 10 ⁶]
I	76	79	77,5	48	21,2	16,4	10,2
II	76	65	70,5	37	20,7	14,6	7,7
III	69	71	70	40	17,4	12,2	7,0
IV	75	75	75	45	23,2	17,4	10,4
V	67	69	68	59	23,5	16,0	13,9

Abk.: prog. Sp.: Anteil progressiv motiler Spermien; 1,2: Paillette 1 bzw. 2; PMI: Plasmamembranintegrität/Anteil plasmamembranintakter Spermien; Sp./P.: Spermien je Paillette; prog. Sp./P.: progressiv motile Spermien je Paillette; PMI Sp./P.: plasmamembranintakte Spermien je Paillette

2.1.1. Konzeptionsraten

Insgesamt wurden 200 routinemäßige Besamungen im Rahmen der natürlichen Brunst durchgeführt. Hundert Besamungen waren Standardbesamungen, die anderen 100 wurden als HVB durchgeführt. Die Anzahl der Besamungen teilte sich dabei äquivalent zwischen den fünf Bullen auf (20 Besamungen pro Bulle und Besamungsmethode). Die Trächtigkeitsuntersuchungen wurden ab Tag 35 post inseminationem mittels manueller transrektaler Palpation durchgeführt. Die Konzeptionsrate lag bei insgesamt 54,5 %. Bei der Standardbesamungsmethode wurden 56 der 100 besamten Tiere als trächtig untersucht. Bei der HVB war die Trächtigkeitsuntersuchung bei 53 von 100 besamten Tieren positiv. Für die beiden Besamungsmethoden konnte kein signifikanter Unterschied bei den Konzeptionsraten aufgezeigt werden ($p = 0,670$) (vgl. Abbildung 11).

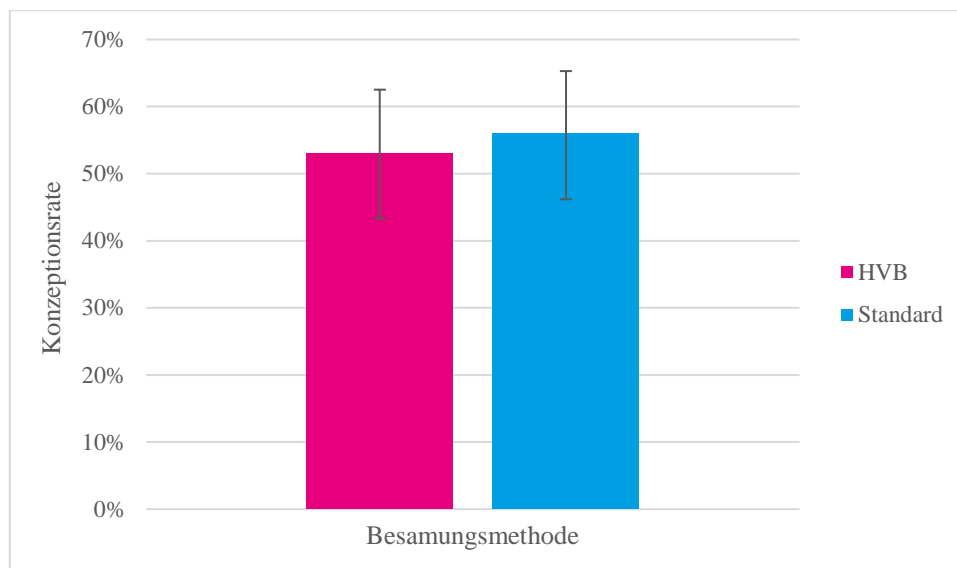


Abbildung 11: Konzeptionsraten für die beiden Besamungsmethoden

Dargestellt sind die Konzeptionsraten der beiden Besamungsmethoden als modellierte Wahrscheinlichkeiten einschließlich der 95 %- Konfidenzintervalle. Die Werte finden sich im Anhang in Tabelle 16.

Abk.: HVB: high-volume-Besamung; Standard: Standardbesamung

Die Interaktion von Bulle und Besamungsmethode hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Konzeptionsrate ($p = 0,708$). Für die einzelnen Bullen konnte kein signifikanter Unterschied ($p > 0,333$) bei den Konzeptionsraten von HVB und Standardbesamungsmethode aufgezeigt werden. Weder bei der HVB noch bei der Standardbesamungsmethode unterschieden sich die Konzeptionsraten der einzelnen Bullen signifikant voneinander ($p > 0,355$) (vgl. Abbildung 12).

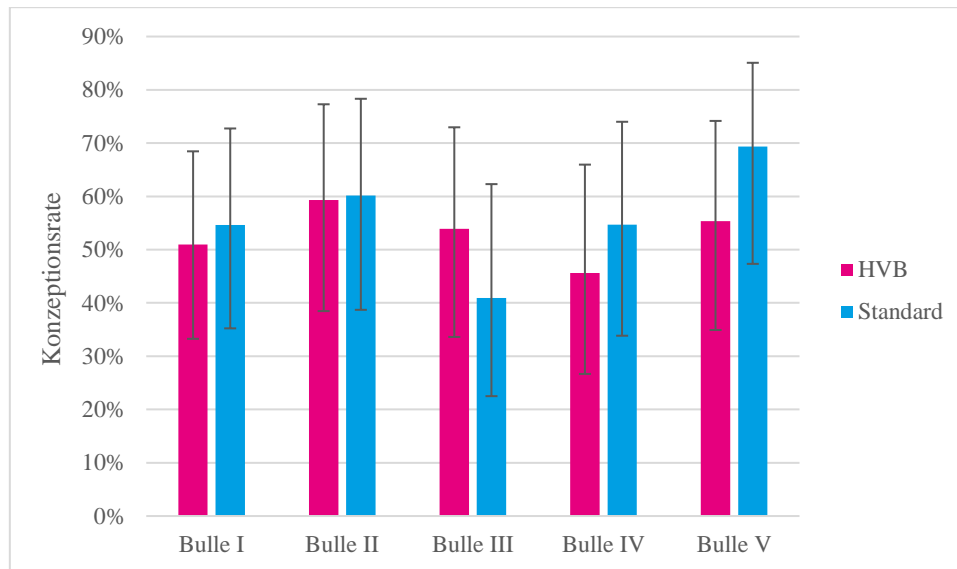


Abbildung 12: Konzeptionsraten der einzelnen Bullen für die beiden Besamungsmethoden

Dargestellt sind die Konzeptionsraten der einzelnen Bullen für die beiden Besamungsmethoden als modellierte Wahrscheinlichkeiten einschließlich der 95 %- Konfidenzintervalle. Die Werte finden sich im Anhang in Tabelle 16.

Abk.: HVB: high-volume-Besamung; Standard: Standardbesamung

2.1.1.1. Konzeptionsraten in Abhängigkeit von der Anzahl vorangegangener Besamungen

Die Besamungen der beiden Besamungsmethoden wurden anhand der Anzahl der in der laufenden Zuchtperiode vorher durchgeführten Besamungen in drei Gruppen zusammengefasst: keine vorangegangene Besamung (0), eine vorangegangene Besamung (1), mehr als eine vorangegangene Besamung (> 1). Die Konzeptionsraten für die einzelnen Gruppen lagen bei der HVB bei 52,3 % (0), 64,0 % (1) und 30,0 % (> 1) und bei der Standardbesamungsmethode bei 53,3 % (0), 61,9 % (1) und 61,1 % (> 1). Die Interaktion zwischen Anzahl vorangegangener Besamungen und Besamungsmethode hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Konzeptionsrate ($p = 0,316$). Weder zwischen den Besamungsmethoden noch innerhalb einer Besamungsmethoden bestand ein signifikanter Unterschied bei den Konzeptionsraten in Abhängigkeit von der Anzahl vorangegangener Besamungen ($p > 0,160$) (vgl. Abbildung 13).

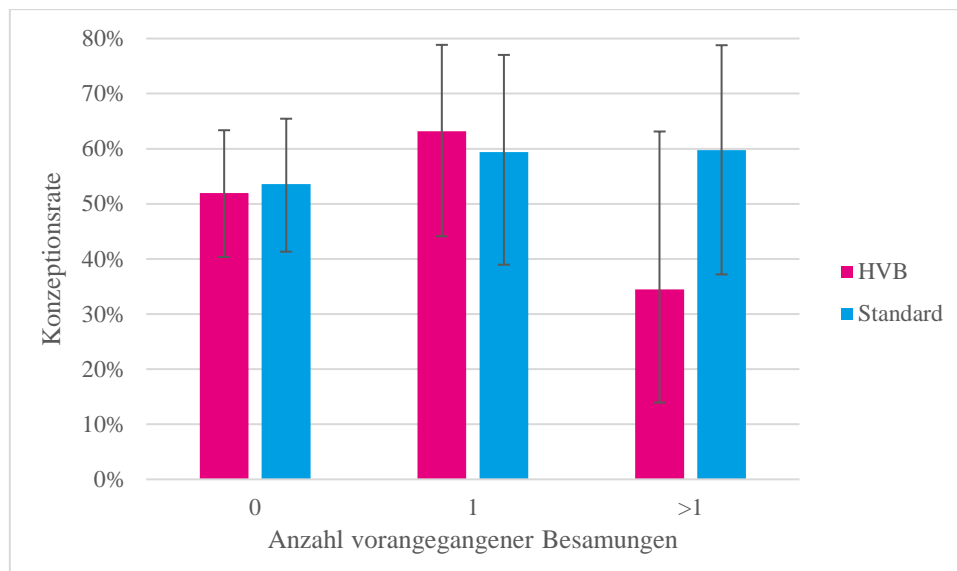


Abbildung 13: Konzeptionsraten für die beiden Besamungsmethoden unter Berücksichtigung der Anzahl vorangegangener Besamungen

Dargestellt sind die Konzeptionsraten in Bezug auf die Anzahl vorangegangener Besamungen für die beiden Besamungsmethoden als modellierte Wahrscheinlichkeiten einschließlich der 95 %- Konfidenzintervalle. Die Werte finden sich im Anhang in Tabelle 17.

Abk.: HVB: high-volume-Besamung; Standard: Standardbesamung

2.1.1.2. Konzeptionsraten in Abhängigkeit vom Paritätsstatus

Die beiden Besamungsmethoden wurden sowohl bei Kühen als auch bei Kalbinnen angewendet. Die Interaktion von Paritätsstatus und Besamungsmethode hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Konzeptionsrate ($p = 0,258$). Mit der Standardbesamungsmethode wurden 66 Kühe und 34 Kalbinnen besamt. Davon wurden 35 Kühe (53,0 %) und 21 Kalbinnen (61,8 %) trächtig. Die HVB-Methode wurde bei 78 Kühen und 22 Kalbinnen angewendet, wovon 43 Kühe (55,1 %) bzw. 10 Kalbinnen (45,5 %) als trächtig untersucht wurden (vgl. Abbildung 14). Bei beiden Besamungsmethoden bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,460$) bei den Konzeptionsraten zwischen Kühen und Kalbinnen. Zudem konnte weder innerhalb der Kühe noch innerhalb der Kalbinnen ein signifikanter Unterschied bei den Konzeptionsraten bei standardmäßig und mittels HVB besamten Tieren aufgezeigt werden ($p > 0,281$).

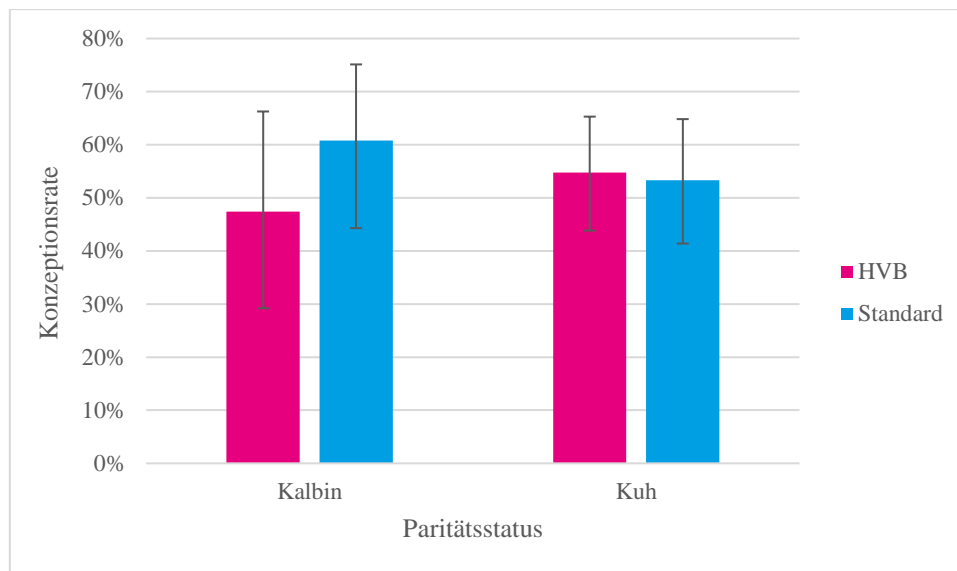


Abbildung 14: Konzeptionsraten für die beiden Besamungsmethoden unter Berücksichtigung des Paritätsstatus des besamten Tieres

Dargestellt sind die Konzeptionsraten unter Berücksichtigung des Paritätsstatus für die beiden Besamungsmethoden als modellierte Wahrscheinlichkeiten einschließlich der 95 %-Konfidenzintervalle. Die Werte finden sich im Anhang in Tabelle 18.

Abk.: HVB: high-volume-Besamung; Standard: Standardbesamung

2.1.2. Non-Return-Raten

Neben den tatsächlichen Trächtigkeiten wurden auch die Non-Return-Raten (NRR) 30 und 56 erhoben. Die NRR berücksichtigen nur Erstbesamungen (EB) und stufen alle Tiere als trächtig ein, die bis zu einem festgelegten Tag (NRR 30: 30 Tage nach EB, NRR 56: 56 Tage nach EB) nicht erneut zur Besamung vorstellig werden. Die durchschnittliche NRR 30 aller durchgeführten EB lag bei 81,8 % (HVB: 79,4 %, Standard: 84,4 %), die NRR 56 bei 68,2 % (HVB: 67,7 %, Standard: 68,8 %).

Der Erstbesamungserfolg (EBE), der die Anzahl der tatsächlich trächtigen Tiere nach Erstbesamung beschreibt, lag für alle durchgeführten Besamungen bei 52,7 % (HVB: 51,5 %, Standard: 53,1 %). Unter Berücksichtigung des Paritätsstatus der besamten Tiere (Kuh, Kalbin) lag der EBE für Kühe bei 50,5 % (HVB: 51,9 %, Standard: 48,8 %) und für Kalbinnen bei 57,9 % (HVB: 50,0 %, Standard: 63,6 %).

Die Definition einer EB basiert auf der besamungsstationspezifischen Einteilung (vgl. Anhang Tabelle 13), bei der jede vierte Besamung wieder als Erstbesamung gezählt wird, und ist demnach für eine wissenschaftliche Bearbeitung nicht schlüssig. Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit eine vergleichsweise geringe Anzahl an EB durchgeführt, bei der die NRR einer großen Schwankungsbreite unterliegen

kann. Eine statistische Auswertung wurde daher als nicht sinnvoll erachtet und nicht durchgeführt.

2.1.3. Geburtenrate

Insgesamt waren 99 Geburten zu verzeichnen. Davon waren 49 Geburten auf die Standardbesamungsmethode und 50 Geburten auf die HVB zurückzuführen. Die Differenz der 109 als trächtig untersuchten Tiere und der 99 Geburten war auf acht Aborte und zwei Totgeburten zurückzuführen. Bei der Standardbesamungsmethode waren zwei Zwillingsgeburten sowie fünf Aborte und zwei Totgeburten zu verzeichnen. Bei der Gruppe der HVB wurden fünf Zwillingsgeburten und drei Aborte dokumentiert.

2.1.4. Geschlechterverteilung der geborenen Kälber

Insgesamt wurden 106 lebende Kälber geboren, von denen 58 männlich und 45 weiblich waren (vgl. Abbildung 15). Von 3 Kälbern war das Geschlecht nicht nachvollziehbar, da das Geschlecht an den Betrieben bei der Geburt nicht erfasst bzw. dokumentiert wurde. Sie wurden bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt. Prozentual betrachtet waren 56,3 % der Kälber männlich und 43,7 % weiblich. Von den sieben Zwillingspärchen waren drei gemischtgeschlechtliche Zwillingspaare und je zwei männliche bzw. weibliche Zwillingspaare zu verzeichnen.

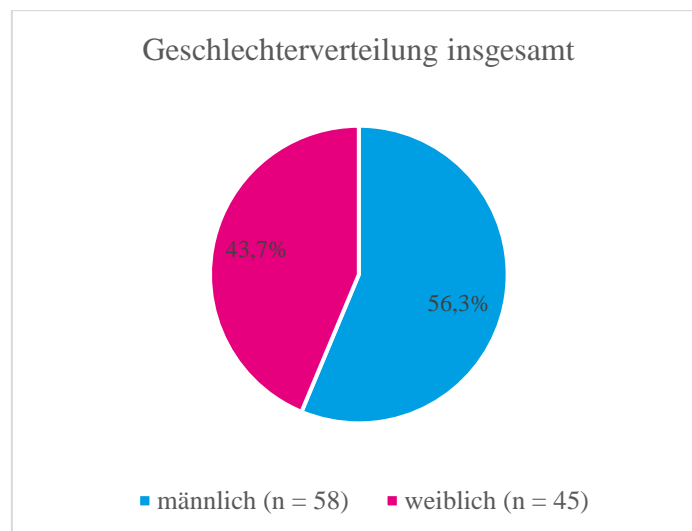


Abbildung 15: Geschlechtliche Verteilung aller geborenen Kälber

Aufgegliedert auf die beiden Besamungsmethoden war bei der Standardbesamungsmethode von zwei der 51 geborenen Kälber das Geschlecht nicht nachvollziehbar. Von den 49 anderen Kälbern waren 34 Kälber männlich (69,4 %) und 15

weiblich (30,6 %) (vgl. Abbildung 16a). Bei der HVB war von einem der 55 lebend geborenen Kälber das Geschlecht nicht nachvollziehbar. Die anderen 54 Kälber teilten sich in 24 männliche Kälber (44,4 %) und 30 weibliche Kälber (55,6 %) auf (vgl. Abbildung 16b).

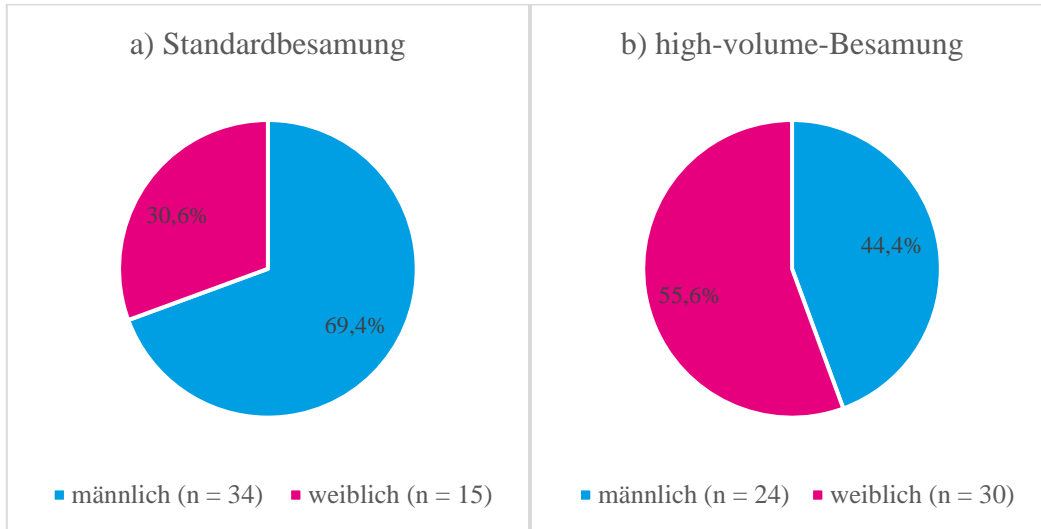


Abbildung 16: Geschlechtliche Verteilung der Kälber bezogen auf die Besamungsmethode a) Standardbesamung und b) HVB

Bei den routinemäßigen Besamungen im Rahmen der natürlichen Brunst konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Besamungsmethode und Geschlecht des geborenen Kalbes aufgezeigt werden ($p = 0,011$), wobei bei der HVB mehr weibliche Kälber als bei der Standardbesamungsmethode geboren wurden. Während innerhalb der HVB kein signifikanter Unterschied bei der Anzahl an männlichen und weiblichen Kälbern bestand ($p = 0,414$), wurden bei der Standardbesamungsmethode signifikant mehr männliche als weibliche Kälber geboren ($p = 0,007$).

2.2. Einfluss der Besamungsmethode auf das Ergebnis des routinemäßigen ET

Insgesamt wurden im Zeitraum zwischen dem 06.02.2018 und dem 14.11.2019 31 Embryonengewinnungen durchgeführt, bei denen die Spendertiere mit der HVB-Methode besamt wurden. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden, wenn vorhanden, Daten von Embryonengewinnungen derselben Spendertiere herangezogen, die zu einem früheren bzw. späteren Zeitpunkt durchgeführt wurden und bei denen die Spendertiere mit der Standardbesamungsmethode besamt wurden ($n = 21$). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwölf Spendertiere über den Embryotransfer genutzt. Es handelte sich um elf Kühe der Rasse Fleckvieh und eine Wagyu-Kalbin. Im Schnitt wurde jedes Spendertier 4,7-mal gespült (Min.: 1, Max.: 8).

2.2.1. Transfertaugliche Embryonen

Bei den 52 durchgeführten Spülungen konnten insgesamt 960 Embryonen/Oozyten gewonnen werden, durchschnittlich 18,5 pro Spülung (Min.: 0, Max.: 48). Davon waren durchschnittlich 10,9 transfertauglich (Min.: 0, Max.: 33), 6,3 unbefruchtet (Min.: 0, Max.: 35) und 1,3 degeneriert (Min.: 0; Max.: 11). Bei der HVB-Gruppe konnten durchschnittlich 18,2 Embryonen/Oozyten pro Spülung gewonnen werden. Davon waren durchschnittlich 10,3 Embryonen tauglich, 6,6 unbefruchtet und 1,3 degeneriert. Bei der Vergleichsgruppe wurden im Durchschnitt 18,9 Embryonen/Oozyten gewonnen, von denen 11,9 tauglich, 5,9 unbefruchtet und 1,1 degeneriert waren (vgl. Abbildung 17a-d). Der prozentuale Anteil an tauglichen Embryonen an den insgesamt gewonnenen Embryonen/Oozyten lag bei der HVB-Gruppe bei 56,6 % und bei der Vergleichsgruppe bei 62,9 %. Mit steigender Anzahl an insgesamt gewonnenen Embryonen/Oozyten wurden bei beiden Besamungsmethoden mehr taugliche Embryonen gewonnen. Dieser Trend war bei beiden Besamungsmethoden signifikant ($p < 0,001$), zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Besamungsmethoden ($p = 0,405$).

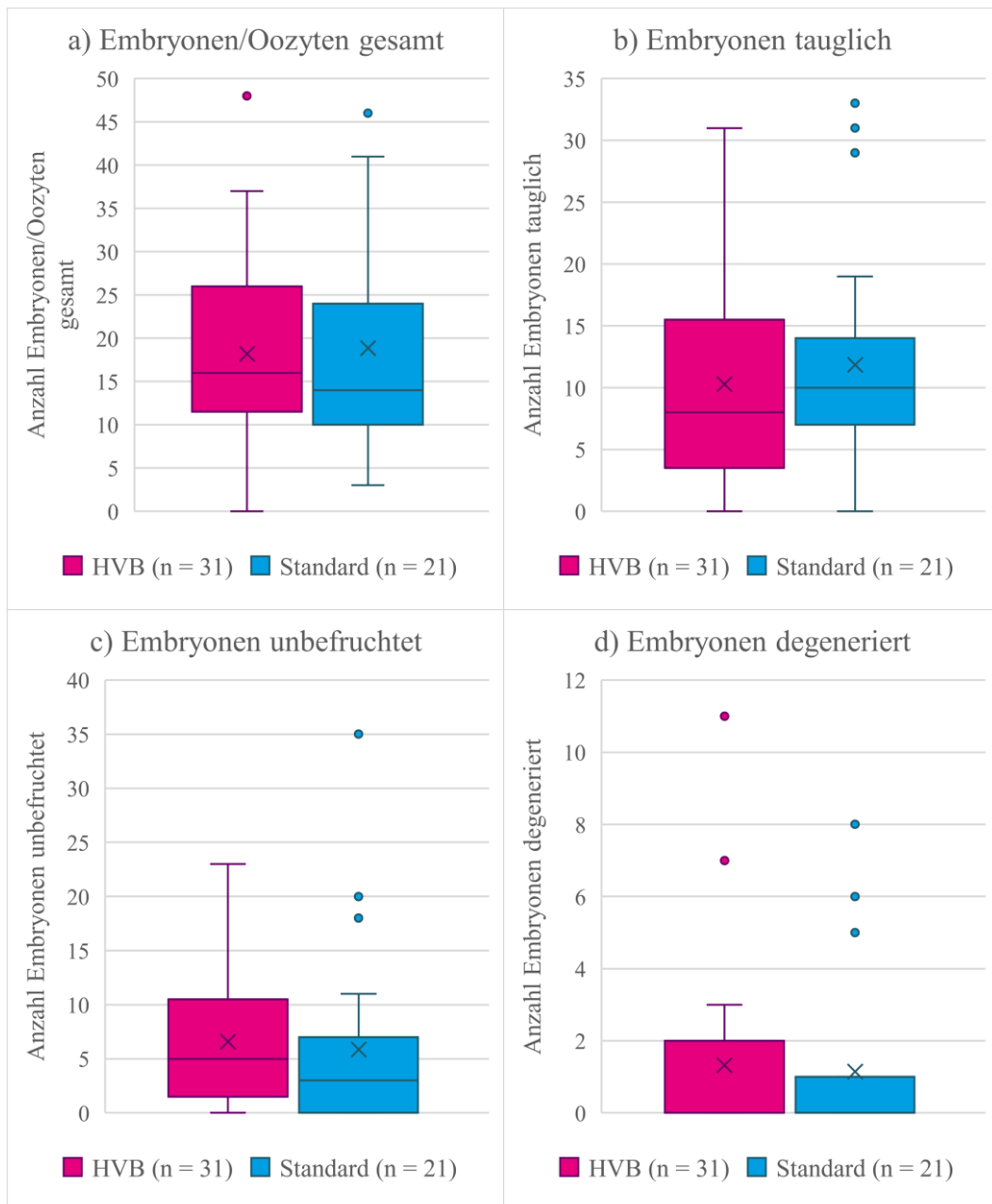


Abbildung 17: Anzahl der Embryonen/Oozyten a) gesamt, b) tauglich, c) unbefruchtet und d) degeneriert in Abhängigkeit von der Besamungsmethode

Boxplot-Diagramme zur Veranschaulichung der Embryonen/Oozyten gesamt, tauglich, unbefruchtet und degeneriert für die beiden Besamungsmethoden. Die Zahlenwerte der Boxplot-Diagramme finden sich im Anhang in Tabelle 19.

Abk.: HVB: high-volume Besamung; Standard: Standardbesamung; x: Mittelwert; n: Anzahl der Spülungen, bei denen die Rinder mit der jeweiligen Besamungsmethode besamt wurden.

2.2.2. Embryonenqualität

Die Embryonengewinnung erfolgte immer sieben Tage nach der zweiten von vier Besamungen. Die Beurteilung von Entwicklungsstadium und Qualität basierte auf den Einteilungskriterien der internationalen Embryotechnologiegesellschaft (IETS) (vgl. Tabelle 4, S. 45). Von den insgesamt 960 gewonnenen Embryonen/Eizellen wurden 568 als tauglich eingestuft (59,2 %). Qualitativ teilten sich die 568 tauglichen Embryonen in 313 Qualität 1-Embryonen (55,1 %), 186 Qualität 2-Embryonen (32,7 %) und 69 Qualität 3-Embryonen (12,2 %). Bezüglich der Entwicklungsstadien waren sowohl Morula (Stadium 4) als auch frühe bis expandierte Blastozysten (Stadium 5–7) vorzufinden.

In Abbildung 18 sind einzelne Entwicklungsstadien und Qualitäten von Embryonen abgebildet. Die Aufnahmen wurden im Zuge der Embryonengewinnungen mit Hilfe der an das Stereomikroskop gekoppelten Moticam gemacht.

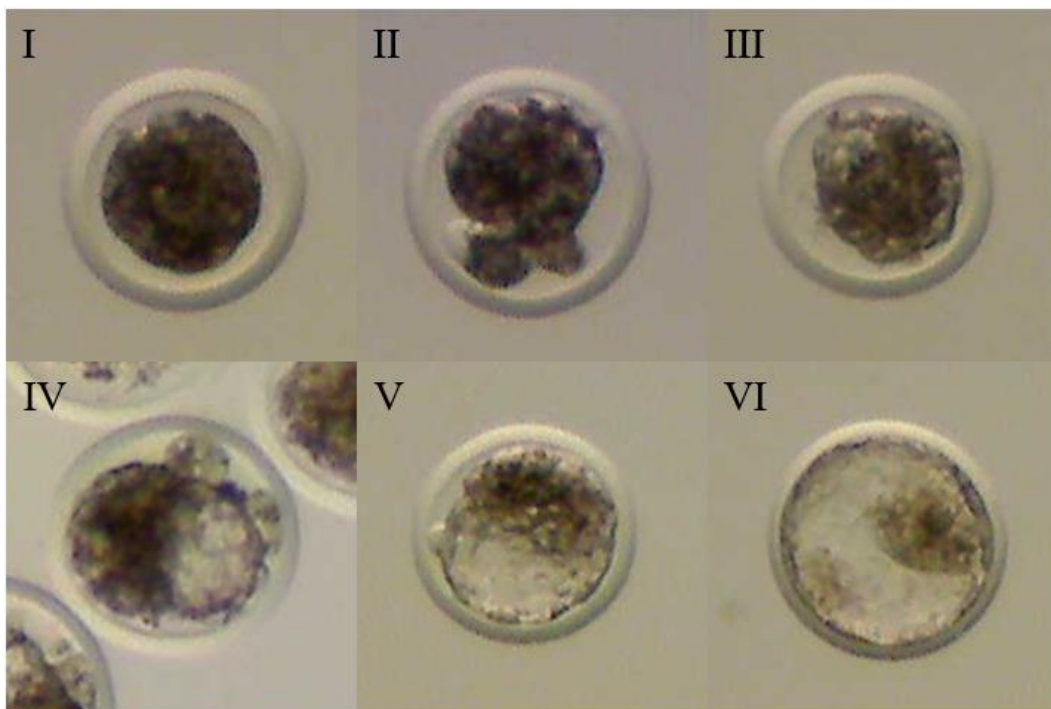


Abbildung 18: Bilder von Embryonen

Die Beurteilung von Entwicklungsstadium und Embryonenqualität basierte auf den Einteilungskriterien der internationalen Embryotechnologiegesellschaft (IETS). Die erste Zahl beschreibt das Stadium, die zweite Zahl die Qualität (vgl. Tabelle 4, S. 45).

I: kompakte Morula – 4.1

II: kompakte Morula – 4.2

III: frühe Blastozyste – 5.1

IV: frühe Blastozyste – 5.2

V: Blastozyste – 6.1

VI: expandierte Blastozyste – 7.1

Aufgegliedert auf die beiden Besamungsmethoden konnten bei den mit der Standardbesamungsmethode besamten Tieren insgesamt 249 taugliche Embryonen gewonnen werden. Davon waren 146 Qualität 1-Embryonen (58,6 %), 68 Qualität 2-Embryonen (27,3 %) und 35 Qualität 3-Embryonen (14,1 %) (vgl. Abbildung 19a). Bei der HVB-Gruppe wurden von den insgesamt 319 tauglichen Embryonen 167 in die Qualitätsgruppe 1 (52,3 %), 118 in die Qualitätsgruppe 2 (37,0 %) und 34 in die Qualitätsgruppe 3 (10,7 %) eingestuft (vgl. Abbildung 19b).

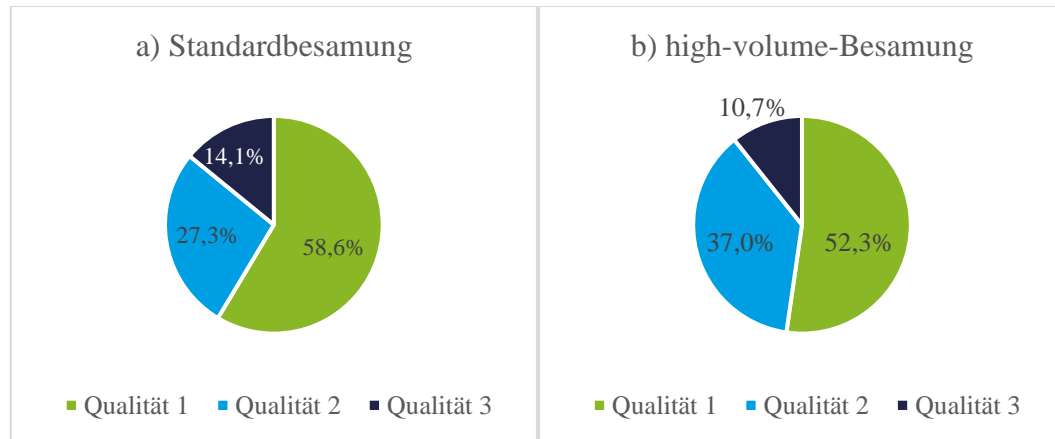


Abbildung 19: Embryonenqualitäten in Abhängigkeit von der Besamungsmethode a) Standardbesamung und b) HVB

Die Beurteilung der Embryonenqualität basierte auf den Einteilungskriterien der internationalen Embryotechnologiegesellschaft (IETS) (vgl. Tabelle 4, S. 45).

Mit steigender Anzahl an tauglichen Embryonen waren bei beiden Besamungsmethoden mehr Qualität 1- und Qualität 2-Embryonen vorzufinden. Dieser Trend war bei beiden Besamungsmethoden signifikant ($p < 0,001$), zeigte bei den Qualität 1-Embryonen aber keinen signifikanten Unterschied für die beiden Besamungsmethoden ($p = 0,322$). Mit steigender Anzahl an tauglichen Embryonen waren bei der HVB tendenziell mehr Qualität 2-Embryonen als bei der Standardbesamung vorzufinden ($p = 0,063$). Weder bei der HVB noch bei der Standardbesamungsmethode waren mit steigender Anzahl an tauglichen Embryonen signifikant mehr Qualität 3-Embryonen zu erwarten ($p > 0,215$). Der Unterschied im Trend bei den Qualität 3-Embryonen in Bezug auf die tauglichen Embryonen war für beide Besamungsmethoden nicht signifikant ($p = 0,929$).

2.3. Kostengegenüberstellung Standardbesamung – HVB

Da in der Besamungsindustrie auch der wirtschaftliche Faktor eine entscheidende Rolle spielt, wurde ein Kostenvergleich zwischen Standardbesamung und HVB vorgenommen. In Tabelle 8 sind die einmaligen Anschaffungskosten sowie die laufenden Kosten je durchgeführter Besamung aufgeführt. Bei den einmaligen Anschaffungskosten nicht berücksichtigt wurden Stickstoffcontainer, Auftaugerät, Pinzette, Paillettencutter, Stoppuhr, Besamungshandschuh und Gleitgel, da diese Materialien bzw. Gerätschaften für beide Besamungsmethoden gleichermaßen benötigt werden.

Tabelle 8: Kostengegenüberstellung Standbesamung - HVB

Material	Standard	HVB
Einmalige Anschaffungskosten		
Besamungsgerät/-pistole*	29,75 €	
Klimabox mit variabler Temperatureinstellung		339,15 €
Netzgerät für Klimabox		65,45 €
Heizblöcke für Faltenbälge (Stückpreis)		14,28 €
Anschaffungskosten gesamt	29,75 €	418,88 €
Laufende Kosten je durchgeführter Besamung		
Besamungshülle*	0,06 €	
Besamungskatheter aus Plastik		0,21 €
Faltenbalgbehälter		0,39 €
Silikonverbindung		0,06 €
Materialkosten für mFert-TALP je Besamung		0,30 €
Laufende Gesamtkosten je Besamung	0,06 €	0,96 €

Die aufgeführten Preise sind als Bruttopreise exklusive Versand- und Frachtkosten angegeben. Die Firmen, über die die Produkte bezogen wurden, sind im Anhang in Kapitel IX.2. gelistet.

*Verkaufspreise der Bayern-Genetik GmbH (Stand August 2021)

Abk.: HVB: high-volume-Besamung; Standard: Standardbesamung

Neben den laufenden Kosten von circa 0,96 € brutto je Besamung kommt bei der HVB noch die Arbeitszeit hinzu, die für die Herstellung von mFert-TALP sowie zur Befüllung der Faltenbälge und Vorbereitung der Besamungskatheter notwendig ist. Die Arbeitszeit für die Herstellung von 10 Liter mFert-TALP, das bei Verwendung von 23 ml je HVB für ungefähr 430 Besamungen ausreicht, und die sich anschließende Präparation der Faltenbälge beläuft sich auf circa sechs Arbeitsstunden. Eine detaillierte Berechnung diesbezüglich wurde nicht vorgenommen.

V. DISKUSSION

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, eine in der jüngeren Vergangenheit in die Besamungspraxis eingeführte, großvolumige Besamungsmethode, die high-volume-Besamung (HVB), erstmals im Rahmen einer wissenschaftlichen Arbeit auf ihre Praxistauglichkeit zu untersuchen. In Laboruntersuchungen wurde der Einfluss vier verschiedener Puffermedien auf Qualitätsparameter boviner Spermien und ihre Eignung als Trägermedium für die HVB analysiert. Im praktischen Teil der Arbeit wurde die von STROUD (2015, 2020) entwickelte HVB-Methode sowohl bei der routinemäßigen KB im Rahmen der natürlichen Brunst als auch bei der routinemäßigen KB superovulierter Rinder getestet und mit der kleinvolumigeren Standardbesamungsmethode in Bezug auf die Besamungs- und Befruchtungsergebnisse sowie die Praktikabilität verglichen.

1. Untersuchungen zur Eignung verschiedener Puffermedien als Trägermedium für die HVB

Da laut STROUD (2012, 2016a, 2017, 2020) verschiedene Puffermedien als Trägermedium für die HVB verwendet werden können und das von STROUD (2015) eingesetzte Maximate[®] kommerziell nicht erhältlich war, sollte im Laborteil dieser Arbeit untersucht werden, ob Puffermedien gleichermaßen als Trägermedium für die HVB geeignet sind. Dazu wurden vier verschiedene Puffermedien, drei kommerziell erhältliche (EasyBuffer B (EBB), BO-IVFTM (BIVF), BO-SemenPrepTM (BSPREP)) sowie ein selbst hergestelltes Medium (modifiziertes Fert-TALP (mFert-TALP)), auf ihre Spermienverträglichkeit untersucht. Mittels spermatologischer Untersuchungen wurden die Puffermedien hinsichtlich ihres Einflusses auf die Spermaqualität analysiert, um daraus Rückschlüsse auf ihre potentielle Eignung als Trägermedium für die HVB zu ziehen. Für die spermatologischen Untersuchungen wurden die computergestützte Spermienanalyse (AndroVision[®]-System, Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach) und die Durchflusszytometrie (Durchflusszytometer Guava[®] easyCyte 5HT Benchtop, Fa. Millipore Corporation, Billerica, USA) herangezogen. Sie ermöglichen die objektive Analyse einer großen Spermienpopulation unter Berücksichtigung der Heterogenität der Spermienzellen (WABERSKI und PETRUNKINA, 2007; PETRUNKINA et al., 2008; CONTRI et al., 2010; VINCENT et al., 2021). Um die Arbeit möglichst praxisorientiert zu gestalten, wurden die Laboruntersuchungen an die Standarduntersuchungsprotokolle der Bayern-

Genetik GmbH angepasst.

1.1. Das Puffermedium hat Einfluss auf die progressive Motilität der Spermien

Mit dem CASA-System wurde der Anteil an progressiv motilen Spermien bestimmt. Abweichend zur Standarduntersuchung, bei der nur bei zu hoher Spermienkonzentration der Spermaproben eine Verdünnung vorgenommen wird, wurden die Proben im Rahmen dieser Arbeit im Verhältnis 1:2 mit den vier Puffermedien verdünnt. Da die Konzentration der Probe Einfluss auf das Ergebnis der CASA hat, war ein direkter Vergleich zwischen den bei der standardmäßig durchgeführten Qualitätskontrolle und den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen nicht möglich (CONTRI et al., 2010). Die Messungen mit dem CASA-System wurden nach 10 und 70 Minuten Inkubation bei +38 °C (Zeitpunkt 1 bzw. Zeitpunkt 2) durchgeführt.

Zum Zeitpunkt 1 konnten für drei (EBB, mFert-TALP, BIVF) der vier Medien keine nennenswerten Unterschiede beim Anteil an progressiv motilen Spermien festgestellt werden. Einzig bei den mit BSPREP inkubierten Spermaproben war im Vergleich zu EBB ein signifikant niedrigerer Anteil an progressiv motilen Spermien zu beobachten ($p = 0,007$). Dies spricht dafür, dass sich BSPREP bereits nach kurzem Kontakt negativ auf die progressive Motilität der Spermien auswirkt. Folgt man den Herstellerangaben, schont BSPREP die Energie der Spermien, was die verminderte progressive Motilität bedingen könnte (IVF LIMITED, 2016). Zum Zeitpunkt 2 setzte sich EBB mit dem größten Anteil an progressiv motilen Spermien signifikant von allen drei anderen Puffermedien ab ($p < 0,003$). Zwar war bei allen Medien ein signifikanter Abfall beim Anteil an progressiv motilen Spermien zwischen Untersuchungszeitpunkt 1 und 2 zu verzeichnen ($p < 0,001$), dieser war bei EBB, im Gegensatz zu BSPREP, aber überschaubar. Basierend auf den Ergebnissen der progressiven Motilitätsmessung ist EBB somit am besten als Trägermedium für die HVB geeignet, gefolgt von mFert-TALP, BIVF und BSPREP.

Dass das bei der CASA für die Verdünnung der Spermaproben verwendete Medium Einfluss auf die Motilität der Spermien und damit einhergehend auf die Analyseergebnisse hat, wurde bereits in vorangegangenen Studien beschrieben (FARRELL et al., 1996; TARDIF et al., 1997; RIJSSELAERE et al., 2003; COX et al., 2006; ROBAYO et al., 2008; MOSTAFAPOR und ARDEBILI, 2014). Dabei konnten

auch speziesspezifische Unterschiede hinsichtlich einzelner Medien aufgezeigt werden. FARRELL et al. (1996) führten Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Medien (Tyrode's-Albumin-Laktat-Pyruvat-Medium (TALP), TALP mit hohem Kaliumanteil, phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit Glukose und bovinem Serumalbumin) auf die Motilitätsparameter von Human- und Kaninchensperma durch. Während bei den humanen Spermaproben kaum Unterschiede in Bezug auf das für die Verdünnung verwendete Medium zu verzeichnen waren, zeigte das Kaninchensperma bei Verdünnung mit TALP signifikant bessere Motilitätsparameter und auch einen signifikant höheren Anteil an progressiv motilen Spermien. In weiteren Untersuchungen konnten FARRELL et al. (1996) zeigen, dass TALP Bullensperma nicht negativ beeinflusst und somit ein geeignetes Medium für die Verdünnung von bovinen Spermaproben für die CASA darstellt. CONTRI et al. (2010) untersuchten, inwieweit eine Verdünnung mit isotonischer Kochsalzlösung, PBS oder dem Spermaverdünner BioXcell® (Fa. IMV Technologies, L'Aigle, Frankreich) die Ergebnisse der Motilitätsanalyse boviner Spermaproben beeinflusst, konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Anteils an progressiv motilen Spermien feststellen. EBB wird in mehreren Studien zur Verdünnung der Spermaproben für die CASA verwendet (SELLEM et al., 2015; BELALA et al., 2019; SEIFI-JAMADI et al., 2020), allerdings fehlen Vergleiche mit anderen Medien.

1.2. Einfluss der Puffermedien auf PMI und MMP der Spermien

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die Plasmamembranintegrität (PMI) und das Mitochondrienmembranpotential (MMP) der Spermaproben bestimmt. Die Vorverdünnung der Spermaproben zur durchflusszytometrischen Untersuchung ist in der Literatur mit verschiedenen Puffermedien wie PBS mit bovinem Serumalbumin (0,1 %) (CHRISTENSEN et al., 2005), Tyrode-Lösung (FLEISCH et al., 2017) und Beltsville Thawing Solution (MURPHY et al., 2018) beschrieben. Bei der Bayern-Genetik GmbH wird die Vorverdünnung standardmäßig mit EBB durchgeführt. Dieser Puffer wurde von IMV Technologies speziell für die durchflusszytometrische Analyse von bovinen Spermaproben entwickelt. Um den Einfluss des Puffermediums auf die Spermaqualität zu untersuchen, wurde die Vorverdünnung der Spermien im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit den vier verschiedenen Puffermedien durchgeführt. Die Spermien wurden für 10 Minuten bei +38 °C mit den Puffermedien inkubiert, bevor die Zugabe zu den Arbeitslösungen und die

Analyse durchgeführt wurde.

Eine intakte Plasmamembran ist Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und die Lebensfähigkeit der Spermienzelle (HAMMERSTEDT et al., 1990; HOSSAIN et al., 2011; PETRUNKINA und HARRISON, 2013). Nach 10 Minuten Inkubation hatte keines der Medien negative Auswirkungen auf die Plasmamembran. Wäre eines der Puffermedien mit einer Schädigung der Plasmamembran einhergegangen, wäre dies ein Ausschlusskriterium für seine Verwendung als Trägermedium bei der HVB gewesen, da folglich weniger lebensfähige Spermien für die Befruchtung verfügbar gewesen wären. Ähnliche Versuche, in denen untersucht wurde, ob ein Puffermedium Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Spermien nach dem Auftauen hat, wurden bislang nicht durchgeführt. Dies liegt vermutlich daran, dass die Spermaportionen bei der Standardbesamung in der Regel direkt nach dem Auftauen ohne weitere Verdünnung versamt werden.

Für mFert-TALP und BIVF war im Vergleich zu EBB und BSPREP ein höchst signifikant niedrigerer Anteil an Spermien mit hohem MMP zu beobachten ($p < 0,001$). Dies ist Hinweis darauf, dass die Spermien in diesen beiden Medien nicht jene Bedingungen vorfinden, die notwendig sind, um den Prozess der oxidativen Phosphorylierung und der damit einhergehenden ATP-Synthese optimal nutzen zu können. Die Reduktion des Anteils an Spermien mit hohem MMP ist bei beiden Medien aber überschaubar. Daraus lässt sich schließen, dass weder mFert-TALP noch BIVF Stoffe wie Spermizide oder oxidative Entkoppler enthalten, die zu einer drastischen Reduktion des MMP führen würden (MARCHETTI et al., 2004; AGNIHOTRI et al., 2016).

1.3. Die Medien unterscheiden sich in ihrer Eignung als Trägermedium

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen der durchgeführten Laboruntersuchungen schließen, dass mit EBB sowohl bei der CASA als auch bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen die besten Ergebnisse erzielt wurden und dieses Puffermedium am besten als Trägermedium für die HVB geeignet ist. Auch wenn bei den mit mFert-TALP und BIVF inkubierten Spermien keine Verminderung der Plasmamembranintegrität zu beobachten war, sind diese beiden Medien auf Grund der im Vergleich zu EBB etwas geringeren Anteile an progressiv motilen Spermien und Spermien mit hohem MMP hinsichtlich ihrer Eignung als Trägermedium für die HVB hinter EBB einzureihen. Obwohl mit BSPREP bei der

Durchflusszytometrie sehr gute Ergebnisse erzielt wurden und kein signifikanter Unterschied zu den EBB-Ergebnissen bestand, lässt der extreme Abfall beim Anteil an progressiv motilen Spermien vermuten, dass die Spermien bei diesem Medium keine optimalen Bedingungen vorfinden. BSPREP ist damit nicht als Trägermedium für die HVB geeignet.

Für die HVB wurde als Trägermedium mFert-TALP verwendet, da es bei den Laboruntersuchungen gute Ergebnisse lieferte und im eigenen Labor hergestellt werden konnte. Von den anderen drei Medien (EBB, BIVF, BSPREP) war die genaue Zusammensetzung nicht bekannt. Zudem wären diese Medien in ihrer Anschaffung zu teuer gewesen.

2. Die HVB ist kein Ersatz für die Standardbesamungsmethode

2.1. Für die praktische Anwendung der high-volume-Besamungsmethode waren Anpassungen notwendig

Die von STROUD (2012, 2016a, 2017, 2020) über mehrere, aufeinander aufbauende Patente entwickelte HVB-Methode wurde im Zuge dieser Arbeit erstmals in ihrer praktischen Anwendung bei der routinemäßigen KB im Rahmen der natürlichen Brunst sowie der routinemäßigen KB superovulierter Rinder getestet. Für die praktische Durchführung der Besamungen waren Anpassungen hinsichtlich der verwendeten Materialien notwendig.

2.1.1. Besamungskatheter für die HVB

Im Unterschied zu STROUD (2015, 2020), der die HVB mit einem eigens dafür entwickelten Metallkatheter durchführte, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Einmaluteruskathetern gearbeitet. Die Gründe hierfür beruhen auf tierhygienischen und tierzüchterischen Aspekten. Im Gegensatz zur Standardbesamung, bei der die Besamungspistole durch eine Einwegbesamungshülle vor Verschmutzungen geschützt wird, gibt es bei der HVB bis dato keine Hülle zum Schutz des Metallkatheters vor Kontaminationen. Dadurch besteht bei Wiederverwendung die Gefahr der Übertragung von (Geschlechts-)Krankheiten und Tierseuchen. Außerdem wird das Medium-Sperma-Gemisch bei der HVB durch den Katheter gespült. Dabei im Lumen des Katheters zurückbleibende Spermien könnten bei der nächsten Besamung mit in den Uterus gespült werden und letztendlich zu einer fehlerhaften Belegung führen. Aus diesen Gründen muss der von STROUD entwickelte

Metallkatheter nach jeder Besamung gereinigt und sterilisiert werden (STROUD, 2016b). Um diesen sehr zeitaufwändigen und auch logistisch herausfordernden Arbeitsprozess der Reinigung der Metallkatheter zu umgehen, wurde daher mit Einmaluteruskathetern gearbeitet, die routinemäßig beim Rind für Uterusbehandlungen verwendet werden und früher auch bei der KB eingesetzt wurden.

Auf dem internationalen Markt waren verschiedene Einmaluteruskatheter erhältlich, die sich in Länge, Durchmesser, Steifheit etc. unterschieden haben. Bei der Auswahl des Katheters waren folgende Kriterien ausschlaggebend: Der Außendurchmesser des Katheters sollte möglichst gering sein, um auch bei Kalbinnen ein einfaches Einführen zu ermöglichen. Die Katheterlänge war so zu wählen, dass auch ältere Kühe mit größerem Geschlechtsapparat problemlos zu besamen waren. Bezüglich der Steifheit des Katheters war ein Kompromiss zwischen Länge und Außendurchmesser notwendig, denn je länger der Katheter und je geringer der Außendurchmesser war, desto mehr Flexibilität zeigte der Katheter und umso schwieriger gestaltete sich die Durchführung der HVB. Um das Verletzungsrisiko zu minimieren, musste das kraniale Ende des Katheters abgerundet sein. Die sogenannten Mülletten (Fa. Müller, Nürnberg) erfüllten diese Kriterien am besten und wurden für die Durchführung der HVB verwendet. In der Regel konnten die Besamungen mit diesen Einmaluteruskathetern problemlos durchgeführt werden. Einzig der mit ca. 6 mm doch etwas große Außendurchmesser war bei einigen Kalbinnen mit einer erschwerten Zervixpassage verbunden (SCHERZER, 2020; WENDLINGER, 2020). Zum Vergleich: Die bei der Standardbesamung verwendeten Einmalbesamungshüllen haben je nach Modell einen Außendurchmesser von 4,5 bis 5 mm, der von STROUD (2020) entwickelte Metallkatheter weist einen Außendurchmesser von 3,4 mm auf. Der von der Universität Ghent speziell für die intrakornuale Besamung entwickelte „Ghent-Katheter“ setzt sich aus einem äußeren, festen Tube zur Zervixpassage und einem inneren Tube mit flexiblem Katheter zur Samenablage in den Uterushörnern zusammen. Das äußere Tube hat mit 6,2 mm einen ähnlichen Durchmesser wie die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mülletten. Auf Grund des Durchmessers auftretende Probleme bei der Besamung von Kalbinnen mit dem „Ghent-Katheter“ werden von VERBERCKMOES et al. (2004, 2005) nicht beschrieben.

2.1.2. Auswahl des Trägermediums für die high-volume-Besamung

Wie unter Kapitel V.1. dargestellt, unterscheiden sich Puffermedien in ihrer

Eignung als Trägermedium für die HVB. Das von STROUD (2015) selbst entwickelte Trägermedium Maximate[®], das er bereits mit Erfolg bei der Besamung superovulierter Fleischrinder eingesetzt hat, war kommerziell nicht erhältlich. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf Basis der stofflichen Zusammensetzung von Maximate[®] und Fert-TALP, einem Befruchtungsmedium für die IVF boviner Eizellen, ein alternatives Trägermedium für die HVB hergestellt. Bei diesem modifizierten Fert-TALP wurde im Gegensatz zur regulären Zusammensetzung auf die Zugabe von Penicillin sowie Pyruvat und Albumin verzichtet (siehe Anhang Kapitel IX.1.). Bei der Herstellung war darauf zu achten, dass keine Stoffe wie Serum, Albumin, Heparin und bovine Seminalplasmaproteine sowie Calcium-Ionophore und Progesteron im Medium enthalten sind. Diese Stoffe hätten bei Zugabe der Spermien zu einem vorzeitigen Auslösen der Kapazitation bzw. Akrosomreaktion geführt (PARRISH et al., 1989; ZANEVELD und DE JONGE, 1991; DEDKOVA et al., 2000; THÉRIEN und MANJUNATH, 2003; BIRCK et al., 2010) und sich dadurch negativ auf die Befruchtungsergebnisse ausgewirkt.

Im Gegensatz zu STROUD (2015), der bei der Besamung superovulierter Fleischrinder mit einem Besamungsvolumen von 30 ml gearbeitet hat, wurden die Faltenbälge im Rahmen dieser Arbeit mit nur 23 ml modifiziertem Fert-TALP befüllt. Dies entspricht dem 92-fachen des standardmäßig eingesetzten Besamungsvolumens von 0,25 ml. Durch die Volumenreduktion sollte sichergestellt werden, dass der Besamungskatheter am Ende der Besamung noch mit Luft durchgespült wird, um so den Spermaverlust möglichst gering zu halten. STROUD (2015, 2020) beschreibt bei der Verwendung von 30 ml Trägermedium, dass circa 2,5 ml Medium-Sperma-Gemisch im Lumen des Metallkatheters zurückbleiben und empfiehlt daher in seinem neuesten Patent (STROUD, 2020), das Volumen des Trägermediums auf 27,5 ml zu reduzieren, um den Spermienverlust zu verringern.

2.2. Der Besamungserfolg der high-volume-Besamung zeigte keinen Unterschied zum Besamungserfolg der Standardbesamungsmethode

Die Non-Return-Rate 56 lag bei 68,2 % (HVB: 67,7 %, Standard: 68,8 %) und somit 1,8 % über der 2020 in Bayern durchschnittlich erzielten NRR 56 von 66,4 % (ARBEITSGEMEINSCHAFT DER BESAMUNGSSTATIONEN IN BAYERN E. V. und LANDESVERBAND BAYERISCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2021). Auf Grund der Tatsachen, dass die NRR bei kleinen Fallzahlen einer sehr großen Schwankungsbreite unterliegt, Zweit- und Drittbesamungen bei ihrer Berechnung

nicht berücksichtigt werden und sie keine definitive Aussage zum tatsächlichen Trächtigkeitsstatus erlaubt, stellte sie für die Auswertung nicht die ideale Kenngröße dar.

Daher erfolgte die Beurteilung des Besamungserfolges der beiden Besamungsmethoden (HVB, Standard) auf Basis der Konzeptionsraten. Insgesamt konnte mit der HVB-Methode eine zufriedenstellende Konzeptionsrate erzielt werden, die sich nicht signifikant von jener der Standardbesamungsmethode unterschieden hat ($p = 0,670$). Damit stellt die HVB in Bezug auf die Konzeptionsraten eine gleichwertige, alternative Besamungstechnik zur Standardbesamung dar. Die insgesamt erzielte Konzeptionsrate von 54,5 % (HVB: 53 %, Standard: 56 %) ist ähnlich jener, die VERBERCKMOES et al. (2004) bei der Testung des „Ghent-Katheters“ verzeichneten (insgesamt 54,7 %, Standardbesamungsmethode 57,6 %, „Ghent-Katheter“ intrauterin 52,7 %, „Ghent-Katheter“ intrakornual 53,8 %). Der von WEITZE (2001a) sowie HOEDEMAKER et al. (2014) beschriebenen Erstbesamungserfolg von 65 % bei Kalbinnen und 55 % bei Kühen konnte im Zuge dieser Arbeit mit 57,9 % (Kalbinnen) und 50,5 % (Kühe) nicht erreicht werden. Hier sei allerdings darauf hingewiesen, dass WEITZE (2001a) diese Richtwerte bereits zu Beginn des 21. Jahrhunderts erstmals veröffentlichte, als auch die NRR 56 der in Bayern angesiedelten Besamungsstationen mit 71,3 % (Jahr 2000) noch deutlich über den heute erzielten 66,4 % (Jahr 2020) lag (ARBEITSGEMEINSCHAFT DER BESAMUNGSSTATIONEN IN BAYERN E. V. und LANDESVERBAND BAYERISCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2021).

Auch wenn in der Gruppe mit mehr als einer vorangegangenen Besamung mit der Standardbesamungsmethode (61,1 %) im Vergleich zur HVB (30,0 %) eine mehr als doppelt so hohe Konzeptionsrate erzielt wurde, sei darauf hingewiesen, dass diese Daten auf einer sehr geringen Anzahl an Besamungen basieren (HVB $n = 10$, Standard $n = 18$) und daher einer großen Schwankungsbreite unterliegen. Die Abortrate lag mit 7,34 % etwas über der laut AHLERS und ANDRESEN (1996) als normal anzusehenden jährlichen Abortrate von 5 %, aber innerhalb der von HOEDEMAKER et al. (2014) beschriebenen Zielgröße für Aborte zwischen dem 45. und 265. Trächtigkeitstag von ≤ 8 %.

2.3. HVB und Standard-KB unterscheiden sich kaum in der Embryonenqualität superovulierter Rinder

Mit insgesamt durchschnittlich 18,5 gewonnenen Embryonen/Oozyten und 10,9 transfertauglichen Embryonen je Spülung konnten im Rahmen dieser Arbeit im bayernweiten Vergleich überdurchschnittlich gute Ergebnisse erzielt werden, die auch über den durchschnittlich innerhalb der Bayern-Genetik GmbH erzielten Ergebnissen lagen (vgl. Tabelle 2, S. 24) (ARBEITSGEMEINSCHAFT DER BESAMUNGSSTATIONEN IN BAYERN E. V. und LANDESVERBAND BAYERISCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2019, 2020, 2021). Die von STROUD (2015) basierend auf seinen mit Maximate erzielten Ergebnissen aufgestellte Berechnung, die besagt, dass bei Besamung mit der HVB-Methode im Vergleich zur Standardbesamung im Schnitt ein transfertauglicher Embryo je Spülung mehr gewonnen werden kann, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (HVB: $\bar{x} = 10,3$, Standard: $\bar{x} = 11,9$). Die statistische Auswertung der Anzahl an tauglichen Embryonen erfolgte in Bezug auf die insgesamt gewonnenen Embryonen/Oozyten und sollte einen besseren Vergleich der beiden Gruppen (HVB, Standard) liefern. Die Überlegung dabei war, dass mit steigender Anzahl an gewonnenen Embryonen/Oozyten auch die Wahrscheinlichkeit steigt, mehr befruchtete und somit taugliche Embryonen zu erhalten. Bei beiden Besamungsmethoden war dieser Trend signifikant ($p < 0,001$), zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Besamungsmethoden ($p = 0,405$). Mit zunehmender Anzahl an tauglichen Embryonen war bei beiden Besamungsmethoden ein signifikanter Anstieg der Qualität 1- und Qualität 2-Embryonen ($p < 0,001$), nicht jedoch der Qualität 3-Embryonen vorzufinden ($p > 0,215$). Auch wenn bei der HVB mit steigender Anzahl an tauglichen Embryonen im Vergleich zur Standardbesamungsmethode tendenziell mehr Qualität 2-Embryonen gewonnen wurden ($p = 0,063$), lassen diese Ergebnisse insgesamt betrachtet vermuten, dass die Spermien durch das Trägermedium und die Besamungsmethode kaum einen negativen Einfluss erfahren.

Der direkte Vergleich der beiden Besamungsmethoden anhand der Spülsergebnisse ist aus mehreren Gründen allerdings nur eingeschränkt möglich. Ein erster Grund, der den Vergleich der beiden Methoden stark beeinflusst, ist, dass die beiden Besamungsmethoden nicht in gleichem Ausmaß bei den einzelnen Spendertieren angewendet wurden. Für vier der zwölf Spender waren nur Ergebnisse von Spülungen verfügbar, bei denen die Kühe mit der HVB-Methode besamt wurden. Wie bereits

in anderen Studien beschrieben (HASLER et al., 1983; HAHN, 1992; DETTERER et al., 1997; KAFI und MCGOWAN, 1997; MAPLETOFT et al., 2002; MAPLETOFT und BÓ, 2015; MIKKOLA und TAPONEN, 2017), bestand auch innerhalb dieser Arbeit eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Spendertieren hinsichtlich ihrer Reaktion auf die Superovulationsbehandlungen sowie der erzielten Spülergebnisse und ihrer Eignung als Spender. Hinzu kommt, dass die Induktion der Superovulationen im Zuge dieser Arbeit sowohl mit unterschiedlichen Hormonpräparaten als auch basierend auf unterschiedlichen Dosierungsschemata erfolgte, die sich bei wiederholten Spülungen auch für die einzelnen Spender unterschieden haben. Studien zeigen immer wieder, dass der für die Induktion der Superovulation verwendete hormonelle Wirkstoff Einfluss auf die Embryonenqualität (MAPLETOFT et al., 2002; MAPLETOFT und BÓ, 2015), die Gesamtzahl an gewonnenen Embryonen und Eizellen (KELLY et al., 1997; MIKKOLA und TAPONEN, 2017) sowie die Anzahl an tauglichen Embryonen (KELLY et al., 1997) hat. Im Rahmen dieser Arbeit bestand für die beiden verwendeten Hormonpräparate Folltropin® und Pluset® ein signifikanter Unterschied bei der Gesamtzahl gewonnener Embryonen/Oozyten ($p = 0,018$), nicht jedoch bei der Anzahl an tauglichen Embryonen ($p = 0,728$) (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurden die Besamungen im Zuge der Arbeit mit TG-Sperma unterschiedlicher Bullen und im Fall der HVB in zwei Fällen sogar mit gesextem Sperma durchgeführt. Die Bullen unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Spermaqualität sowie Befruchtungsfähigkeit und beeinflussen damit auch das Spülergebnis (CALLAGHAN und KING, 1980; HUPKA, 2000; TROPFMANN, 2000).

In künftigen Studien zur Prüfung von Effekten der HVB im Rahmen des Embryotransfers sollte darauf geachtet werden, dass die einzelnen Besamungsmethoden äquivalent bei den Spendertieren angewendet werden. Zudem sollte eine Standardisierung des Hormonprotokolls erfolgen und die Besamungen sind idealerweise mit Sperma desselben Bullen aus einer Produktionscharge durchzuführen.

Von Seiten der Arbeitsgruppe Embryotransfer der Bayern-Genetik GmbH wird die HVB in Zukunft nicht die Standardbesamungsmethode ersetzen. Allerdings soll diese großvolumige Besamungsmethode bei Spezialfällen, wie der KB mit gesextem sowie sehr teurem oder seltenem Sperma Einsatz finden, da sie die Möglichkeit zur Aufteilung der Besamungsportionen auf mehrere Spendertiere bzw. Besamungen bietet.

2.4. Herausforderungen bei der praktischen Anwendung der HVB

Auch wenn sich die HVB in ihrer praktischen Durchführung am Tier mit transrektaler Fixation der Zervix und intrauteriner Deposition des Spermas kaum von der Standardbesamung unterscheidet, ist sie mit einem deutlichen Mehraufwand hinsichtlich Zeit, Logistik und Kosten verbunden. Die Praktikabilität der HVB für einen breiten Einsatz im Feld ist dadurch nicht gegeben.

In Bezug auf den Faktor Zeit sind vor allem die zeitintensiven Vorbereitungsarbeiten, die die Herstellung von mFert-TALP und die Vorbereitung der Faltenbälge und Besamungskatheter betreffen, zu nennen. Kurz vor der Besamung ist der zeitliche Mehraufwand im Vergleich zur Standardbesamungsmethode überschaubar und beschränkt sich auf das Überführen des aufgetauten Spermas in den Faltenbalg mit dem Trägermedium sowie das Fixieren des Faltenbalgs über die Silikonverbindung am Katheter. Für die Durchführung der Besamung wird auf Grund der Analogie zur Standardbesamung nicht mehr Zeit benötigt.

Hinsichtlich der logistischen Umsetzung ist die HVB mit einigen Herausforderungen verbunden. Das modifizierte Fert-TALP ist in seiner Haltbarkeit begrenzt und muss daher, ebenso wie andere Puffermedien, bei Kühlschranktemperaturen gelagert werden. Um das Kontaminationsrisiko zu verringern, sollte das bei der Herstellung steril gefilterte Medium erst wenige Stunden vor der Besamung in die Faltenbälge überführt werden. Kontaminationen könnten zu Veränderungen des Trägermediums führen, die sich folglich negativ auf die Spermien auswirken könnten. Außerdem ist das Trägermedium vor der Zugabe der Spermien anzuwärmen, damit die Spermien keinen Temperaturschwankungen unterliegen. Wie bei der Standardbesamung ist die HVB nach der Zugabe der Spermien zum Trägermedium alsbald durchzuführen, um ein Abkühlen des Trägermediums und eine dadurch bedingte negative Beeinflussung der Spermien zu vermeiden. Bereits angewärmte, aber nicht verwendete Faltenbälge sollten nicht erneut gekühlt und am nächsten Tag wiederverwendet werden und sind daher zu entsorgen, was einen wirtschaftlichen Verlust bedeutet.

Im Gegensatz zu den KB im ET-Bereich, bei denen im Voraus bekannt war, wie viele Spendertiere vorbereitet wurden und wie viele HVB durchzuführen sind, wurden die Besamungen beim Besamungstechniker erst im Laufe des Vormittages von den Landwirten angemeldet. Daher war zu Beginn des Arbeitstages die genaue Anzahl der an diesem Tag durchzuführenden Besamungen nicht bekannt und die

Anzahl der in der Klimabox mitzuführenden Faltenbälge nur schwer planbar. Während an der ET-Station ein Labor eingerichtet war, in dem alle notwendigen Vorbereitungen für die HVB unter optimalen Bedingungen unmittelbar getroffen werden konnten, musste beim Besamungstechniker ein provisorischer Lagerplatz einschließlich Kühlschranks für die Lagerung der befüllten Faltenbälge und der benötigten Materialien organisiert werden. Die Vorbereitungen für die Besamungen mussten direkt vor Ort beim Landwirt erfolgen. Diese Einschränkungen resultieren nicht zuletzt aus der kleinstrukturierten Landwirtschaft im Einzugsgebiet der Besamungsstation und sind für die relativ geringen Fallzahlen ($n = 200$) mitverantwortlich.

Aus finanzieller Sicht ist die HVB im Vergleich zur Standardbesamungsmethode mit deutlichen Mehrkosten verbunden (vgl. Kapitel IV.2.3., S. 62). Neben den einmaligen Anschaffungskosten von circa 420 € für Klimabox inkl. Netzgerät und Heizblock fallen bei jeder HVB laufende Kosten von circa 0,96 € für die benötigten Materialien (Einmaluteruskatheter, Faltenbalg, Silikonverbindung, Trägermedium) an. Dabei nicht berücksichtigt sind die Kosten für die Arbeitszeit, die für die Herstellung von mFert-TALP sowie der Vorbereitung der Faltenbälge und Besamungskatheter benötigt wird. Im Gegensatz dazu fallen bei der Standardbesamungsmethode nur 0,06 € laufende Kosten durch die Besamungshülle an. Damit ist jede HVB mit Mehrkosten von mindestens 0,90 € verbunden. Auch aus ökologischer Sicht ist die HVB im Vergleich zur Standardbesamungsmethode kritisch zu betrachten, da es sich bei den verwendeten Materialien um Einwegprodukte handelt, die, mit Ausnahme der Silikonverbindung, nicht wiederverwendbar sind.

2.5. Einfluss der Besamungsmethode auf das Geschlecht des Kalbes

Obgleich der Einfluss der Besamungsmethode auf das Geschlecht des Kalbes nicht eine zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war, wurden im Rahmen der routinemäßigen Besamungen die Geschlechter der geborenen Kälber für die beiden Besamungsmethoden erfasst und miteinander verglichen. Insgesamt wurden mehr männliche (56,3 %) als weibliche Kälber (43,7 %) geboren. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Arbeiten (DEL RÍO et al., 2007; HOSSEIN-ZADEH et al., 2008; BERRY et al., 2011; KHAN et al., 2012; AMADESI et al., 2015), die ebenfalls eine höhere Prävalenz der männlichen gegenüber den weiblichen Kälbern verzeichneten.

Da die Wahrscheinlichkeit für eineiige Zwillinge in Bezug auf alle Geburten (Eiulings- und Mehrlingsgeburten) beim Rind rasseabhängig zwischen 0,14 und 0,44 % liegt und nur 13,5 bis 24,2 % der gleichgeschlechtlichen Zwillingspaare auch eineiige Zwillinge sind (JOHANSSON et al., 1974), wurde für die statistische Auswertung angenommen, dass es sich bei den vier im Rahmen dieser Arbeit geborenen, gleichgeschlechtlichen Zwillingspaaren um zweieiige Zwillinge handelt. Daher wurde jedes Zwillingskalb einzeln in die Berechnung miteinbezogen. Folgt man den Untersuchungen von CHANDLER et al. (2002), konnte zumindest bei vier der fünf Bullen (Ausnahme Bulle III), deren Sperma für die Besamungen herangezogen wurde, auf Grund der regelmäßigen Samenentnahme im abwechselnden Drei- und Vier-Tagesrhythmus ein ausgeglichener Anteil an X- und Y-Spermien im Ejakulat und deshalb ein Geschlechterverhältnis von 50:50 erwartet werden. Der in einigen Studien beschriebene Einfluss des Besamungszeitpunktes auf das Geschlecht des Kalbes, mit einem frühen Besamungszeitpunkt das weibliche und einem späten Besamungszeitpunkt das männliche Geschlecht priorisierend (DOMINKO und FIRST, 1997; WEHNER et al., 1997; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 1999; MARTINEZ et al., 2004; BAYRIL und YILMAZ, 2013; TESFU et al., 2014), wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Da die Betriebe aber nur einmal täglich besucht wurden und der Besamungstechniker die beiden Besamungsmethoden (HVB, Standard) abwechselnd angewendet hat, sollte der Besamungszeitpunkt keinen Einfluss auf das Geschlecht der geborenen Kälber gehabt haben.

Der insgesamt aufgezeigte, statistisch signifikante Zusammenhang zwischen Besamungsmethode und Geschlecht des Kalbes ($p = 0,011$) war ein überraschendes Ergebnis, wurden doch bei beiden Besamungsmethoden die gleichen Spermachargen verwendet. Tatsache ist, dass in der vorliegenden Arbeit bei der HVB mehr weibliche Kälber als bei der Standardbesamungsmethode geboren wurden und bei der Standardbesamung ein Geschlechterverhältnis von ungefähr 30:70 (weiblich:männlich) vorzufinden war, dass signifikant von dem zu erwartenden ausgeglichenen Geschlechterverhältnis abwich ($p = 0,007$).

Diese Ergebnisse sind jedoch äußerst vorsichtig zu bewerten, da die Auswertung auf einer kleinen Anzahl an geborenen Kälbern ($n = 103$) beruht und der zu Grunde liegende Mechanismus nicht erklärlich ist. Um eine sichere Aussage treffen zu können, müssten diese Beobachtungen mit größeren Fallzahlen überprüft werden.

Die gezielte Beeinflussung des Geschlechts ist im Nutztiersektor bereits seit

Jahrzehnten Brennpunkt zahlreicher Forschungsarbeiten. Bis heute ist die Technologie des Sperma-Sexings die einzige wirtschaftlich rentable Methode, die mit einer Sicherheit von über 90 % das gewünschte Geschlecht liefert (JOHNSON, 2000; WRENZYCKI und NIEMANN, 2007). Allerdings geht der kostenintensive Sortierprozess mit einer verminderten Spermaqualität einher, die gemeinsam mit der reduzierten Spermienkonzentration (circa 2 Millionen Spermien/Paillette) gesexter Spermaportionen zu einer deutlich herabgesetzten Fertilität führt und den breiten Einsatz von gesextem Sperma verhindert (SEIDEL und SCHENK, 2008; FRIJTERS et al., 2009; DEJARNETTE et al., 2011; SEIDEL, 2014). Die Konzentrationserhöhung auf vier Millionen Spermien pro Paillette bei SexedULTRA™-Sperma führt zwar zu einer deutlichen Verbesserung der Konzeptionsraten (CRITES et al., 2018), hat aber zur Folge, dass weniger gesexzte Spermaportionen produziert werden können. Folgt man den Aussagen von STROUD (2015), könnte die HVB bei gesextem Sperma von Vorteil sein und zu einer Verbesserung der Konzeptionsraten sowohl bei Kalbinnen als auch bei Kühen führen.

3. Fazit für Wissenschaft und Praxis

In der vorliegenden Arbeit wurden in Laboruntersuchungen vier verschiedene Puffermedien auf ihre potentielle Eignung als Trägermedium für eine großvolumige Besamung getestet. Die Puffermedien erwiesen sich als unterschiedlich geeignet. Ein Medium (BSPREP) war auf Grund des stark reduzierten Anteils an progressiv motilen Spermien nicht als Trägermedium zu empfehlen. Die anderen drei Medien (EBB, mFert-TALP, BIVF) zeigten zwar Unterschiede hinsichtlich ihres Einflusses auf die Spermaqualität, erscheinen aber als geeignet. Für einen praktischen Einsatz ist im Fall von EBB und BIVF noch die genaue Zusammensetzung zu prüfen.

Die in dieser Studie untersuchte high-volume-Besamungsmethode erwies sich in der Routinebesamung im Rahmen der natürlichen Brunst und der Besamung superovulierter Rinder gegenüber der Standardbesamungsmethode als nicht vorteilhaft. Sie ist deshalb nicht zur Einführung als Standardmethode zu empfehlen, insbesondere weil sie in der praktischen Routine einen größeren Aufwand mit sich bringt. Allerdings erscheint die HVB-Methode interessant für weitere Untersuchungen, weil sie durch den Aufbau der Besamungsapparatur sowie das höhere Besamungsvolumen eine Spermienkonzentrationsverringering und dadurch die Möglichkeit zur Teilung von Besamungsportionen mit sich bringen könnte (STROUD, 2015). Dies wurde hier nicht untersucht und ist deshalb in Feldstudien mit einer entsprechend großen Anzahl zu besamender Kühe zu überprüfen. Wie von STROUD (2015) vorgeschlagen, könnte sich die HVB auch bei der Besamung mit gesextem Sperma als vorteilhaft erweisen, da durch das Trägermedium ein passiver Transport der Spermien in Richtung Eileiter denkbar wäre. Inwieweit das Trägermedium selbst Einfluss auf das Trächtigkeitsergebnis hat, muss in weiteren Studien abgeklärt werden. Die Laborergebnisse legen nahe, in einem nächsten Schritt die HVB mit EBB als Trägermedium durchzuführen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Einfluss von Puffermedien auf Spermaqualität und Fruchtbarkeit bei high-volume-Besamung beim Rind

Die künstliche Besamung stellt auf Grund ihrer Einfachheit, Wirtschaftlichkeit und Effizienz eine der bedeutsamsten Reproduktionstechnologien weltweit dar und ist aus der modernen Rinderzucht nicht mehr wegzudenken. Bis heute hat sich die bereits in den 1940er Jahren entwickelte tiefe zervikale bzw. intrauterine Besamung als Standardbesamungsmethode durchgesetzt. Eine high-volume-Besamungsmethode, bei der das Sperma vor der Besamung mit bis zu 30 ml eines Trägermediums vermischt wird, lieferte bei der Besamung superovulierter Fleischrinder erste vielversprechende Ergebnisse. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese high-volume-Besamungsmethode erstmals im Rahmen einer wissenschaftlichen Arbeit auf ihre Praxistauglichkeit zu testen.

In Laboruntersuchungen wurden vier Puffermedien (EasyBuffer B, modifiziertes Fert-TALP, BO-IVFTM, BO-SemenPrepTM) an bovinen Tiefgefrier ejakulaten (n = 10) auf ihre Spermienverträglichkeit und ihre potentielle Eignung als Trägermedium für die high-volume-Besamung (HVB) untersucht. Dabei kamen die computergestützte Spermienanalyse (CASA) (AndroVision[®]) zur Bestimmung der progressiven Motilität und die Durchflusszytometrie (Durchflusszytometer Guava[®] easyCyte 5HT Benchtop) zur Untersuchung von Plasmamembranintegrität (SYBR[®] 14/PI-Färbung) und Mitochondrienmembranpotential (JC-1-Färbung) zum Einsatz. Die CASA wurde nach 10- und 70-minütiger Inkubation durchgeführt.

Der praktische Teil der Arbeit war in zwei Abschnitte gegliedert. Zum einen wurden routinemäßige Besamungen (Standard: n = 100, HVB: n = 100) im Rahmen der natürlichen Brunst durchgeführt und die beiden Besamungsmethoden basierend auf den Konzeptionsraten miteinander verglichen. Die Erfassung des Trächtigkeitsstatus erfolgte ab dem 35. Tag post inseminationem mittels transrektaler Palpation. Zusätzlich wurde das Geschlecht der geborenen Kälber (n = 106) erfasst. Zum anderen wurden Spendertiere (n = 12) wiederholt im Zuge des routinemäßigen Embryotransfers mit der Standardbesamungsmethode (n = 21) und der HVB-Methode (n = 31) besamt und anhand der Spülsergebnisse miteinander verglichen. Die

Embryonengewinnung erfolgte nicht-chirurgisch sieben Tage nach der zweiten Besamung und die gewonnenen Embryonen/Oozyten wurden hinsichtlich des Entwicklungsstadiums und der Qualität beurteilt. Als Trägermedium für die HVB kam das modifizierte Fert-TALP zum Einsatz.

In den Laboruntersuchungen konnten für die Puffermedien deutliche Unterschiede hinsichtlich ihres Einflusses auf die Spermaqualität aufgezeigt werden. Bei der CASA wurde zu beiden Untersuchungszeitpunkten der größte Anteil an progressiv motilen Spermien bei Inkubation der Spermien mit Easybuffer B und der kleinste bei Inkubation mit BO-SemenPrepTM verzeichnet ($p < 0,01$). Während bei der Plasmamembranintegrität kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Medien bestand ($p > 0,267$), war bei EasyBuffer B und BO-SemenPrepTM ein signifikant höherer Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential im Vergleich zu den anderen beiden Medien (modifiziertes Fert-TALP, BO-IVFTM) zu beobachten ($p < 0,001$).

Bei den routinemäßigen Besamungen im Rahmen der natürlichen Brunst konnte kein signifikanter Einfluss der Besamungsmethoden auf das Trächtigkeitsergebnis aufgezeigt werden ($p = 0,670$). Die Konzeptionsrate lag bei insgesamt 54,5 % (HVB: 53 %, Standard: 56 %). Zwischen Besamungsmethode und Geschlecht des geborenen Kalbes konnte ein Zusammenhang aufgezeigt werden ($p = 0,011$), mit mehr weiblichen Kälbern bei der HVB als bei der Standardbesamung. Bei der Standardbesamungsmethode wurden signifikant mehr männliche als weibliche Kälber geboren ($p = 0,007$). Im Rahmen des routinemäßigen Embryotransfers wurden mit steigender Anzahl an insgesamt gewonnenen Embryonen/Oozyten bei beiden Besamungsmethoden mehr taugliche Embryonen gewonnen. Dieser Trend war bei beiden Besamungsmethoden signifikant ($p < 0,001$), zeigte aber keinen signifikanten Unterschied für HVB-Methode und Standardbesamungsmethode ($p = 0,405$).

Zusammenfassend wurde in den Laboruntersuchungen gezeigt, dass sich die vier Puffermedien unterschiedlich auf die Spermaqualität auswirken und daher nicht in gleichem Maße als Trägermedium für die HVB geeignet sind. Die besten Ergebnisse wurden mit EasyBuffer B erzielt, gefolgt von modifiziertem Fert-TALP, BO-IVFTM und BO-SemenPrepTM.

Der praktische Teil der Arbeit hat gezeigt, dass die HVB auf Grund der erzielten Konzeptionsraten bei der routinemäßigen Besamung im Rahmen der natürlichen

Brunst sowie den Ergebnissen der routinemäßigen Embryonengewinnungen mit der Standardbesamungsmethode gleichzusetzen ist. Da ihre praktische Anwendung aber im Vergleich zur Standardbesamungsmethode mit einem deutlichen Mehraufwand hinsichtlich Zeit, Logistik und Kosten verbunden ist, ist die HVB-Methode für einen breiten Routineeinsatz derzeit nicht zu empfehlen. Bevor allerdings eine endgültige Entscheidung hinsichtlich des Nutzens der HVB getroffen wird, sollte sie in weiteren Anwendungsgebieten (niedrigkonzentriertes Sperma, gesextes Sperma) mit größeren n-Zahlen an zu besamenden Tieren getestet werden.

VII. SUMMARY

Influence of buffer media on sperm quality and fertility in high-volume-insemination in cattle

Due to its simplicity, economy and efficiency artificial insemination is one of the most important reproductive technologies in the world and has become indispensable in modern cattle breeding. To this day, deep cervical or intrauterine insemination, which was developed back in the 1940s, has become the standard insemination method. A high-volume-insemination method, where semen is diluted with up to 30 ml of medium before insemination, has provided promising results with insemination of superovulated beef donors. The aim of the present study was to test this high-volume-insemination method for its practicability for the first time as a part of a scientific evaluation.

In laboratory tests, four buffer media (EasyBuffer B, modified Fert-TALP, BO-IVF™, BO-SemenPrep™) were examined for their sperm compatibility and their potential suitability as a carrier medium for high-volume-insemination (HVI) using bovine frozen-thawed ejaculates (n = 10). Computer-assisted sperm analysis (CASA) (AndroVision®) was used to determine progressive motility and flow cytometry (flow cytometer Guava® easyCyte 5HT Benchtop) to examine plasma membrane integrity (SYBR® 14/PI staining) and mitochondrial membrane potential (JC-1 staining). CASA has been done after 10 and 70 minutes of incubation.

The practical part was divided into two sections. On the one hand, routine inseminations (standard: n = 100, HVI: n = 100) were carried out during natural oestrus and the two insemination methods were compared based on conception rates. Pregnancy status was diagnosed by transrectal palpation beginning 35 days after insemination. In addition, sex of the calves born (n = 106) was recorded. Furthermore, donor animals (n = 12) were repeatedly inseminated during routine embryo transfer with the standard insemination method (n = 21) and the HVI method (n = 31) and compared based on embryo recovery results. Embryos were obtained non-surgically seven days after the second insemination, and their stage and quality were evaluated. The modified Fert-TALP was used as carrier medium for HVI.

In laboratory tests, obvious differences regarding the influence of the buffer media on semen quality were observed. At both examination times, in CASA, sperm cells

incubated with EasyBuffer B exhibited the greatest proportion of progressively motile sperm and those incubated with BO-SemenPrep™ exhibited the smallest ($p < 0.01$). While there was no significant difference between the four media in terms of plasma membrane integrity ($p > 0.267$), sperm cells incubated with EasyBuffer B and BO-SemenPrep™ exhibited a significantly higher proportion of sperm cells with high mitochondrial membrane potential than those incubated with the other two media (modified Fert-TALP, BO-IVF™) ($p < 0.001$).

Within routine inseminations during natural oestrus, the method of insemination had no significant influence on pregnancy rates ($p = 0,670$). Overall conception rate was 54,5 % (HVI: 53 %, standard: 56 %). A relationship was found between insemination method and sex of the calf born ($p = 0.011$), with more female calves in HVI than with standard insemination. When the standard insemination method was used, significantly more male than female calves were born ($p = 0.007$). Using routine embryo transfer, in both insemination methods, more viable embryos were collected as the total number of embryos/oocytes obtained increased. This trend was significant for both methods of insemination ($p < 0.001$), however, there was no significant difference for the trends of HVI method and standard insemination method ($p = 0.405$).

Overall, laboratory tests revealed that the four buffer media have different effects on sperm quality, indicating that they are not equally suitable as a carrier medium for HVI. Best results were obtained with EasyBuffer B, followed by modified Fert-TALP, BO-IVF™ and BO-SemenPrep™.

The practical part showed that the HVI method is equal to the standard insemination method due to the conception rates achieved in routine insemination during natural oestrus and the results of routine embryo recovery. Since the HVI method is associated with significant additional expenses in terms of time, logistics and costs compared with standard insemination, it is not currently recommended for widespread routine use. However, before a final decision regarding the benefits of the HVI method is made, it should be tested in other areas of application (low concentrated semen, sexed semen) with higher numbers of animals to be inseminated.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Agnihotri SK, Agrawal AK, Hakim BA, Vishwakarma AL, Narender T, Sachan R, Sachdev M. *Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 2016; 52: 953–960.

Ahlers D, Andresen P (1996), *Trächtigkeiten*. In: Grunert E (Ed.), *Buiatrik Band 1. Euterkrankheiten, Geburtshilfe und Gynäkologie, Andrologie und Besamung*. Verlag M. & H. Schaper, Hannover, 99-127.

Almquist JO. *Effects of sexual preparation on sperm output, semen characteristics and sexual activity of beef bulls with a comparison to dairy bulls*. *Journal of Animal Science* 1973; 36: 331-336.

Amadesi A, Frana A, Gandini LM, Bornaghi V, Parati K, Bongioni G, Puglisi R, Galli A. *Comparison between primary sex ratio in spermatozoa of bulls and secondary sex ratio in the deriving offspring*. *Theriogenology* 2015; 83: 199–205.

Amann RP, Katz DF. *Reflections on CASA after 25 Years*. *Journal of Andrology* 2004; 25: 317-325.

Amann RP, Waberski D. *Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments*. *Theriogenology* 2014; 81: 5-17.

Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. *Mitochondria functionality and sperm quality*. *Reproduction* 2013; 146: 163-174.

Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, Anton M. *Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender*. *Theriogenology* 2004; 61: 895-907.

Arbeitsgemeinschaft der Besamungsstationen in Bayern e. V., Landesverband Bayerischer Rinderzüchter e. V. (2016). *Jahresbericht: Rinderzucht, Besamung, Embryotransfer in Bayern 2015*.

Arbeitsgemeinschaft der Besamungsstationen in Bayern e. V., Landesverband Bayerischer Rinderzüchter e. V. (2019). *Jahresbericht: Rinderzucht, Besamung, Embryotransfer in Bayern 2018*.

Arbeitsgemeinschaft der Besamungsstationen in Bayern e. V., Landesverband Bayerischer Rinderzüchter e. V. (2020). *Jahresbericht: Rinderzucht, Besamung, Embryotransfer in Bayern 2019*.

Arbeitsgemeinschaft der Besamungsstationen in Bayern e. V., Landesverband Bayerischer Rinderzüchter e. V. (2021). *Jahresbericht: Rinderzucht, Besamung, Embryotransfer in Bayern 2020*.

Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e. V. *ADR-Empfehlung 8.2: Anforderungen an Zuchtbullen für den Einsatz in der KB und für Deckbullen*. 2006a: <https://www.rind-schwein.de/services/files/brs/richtlinien-empfehlungen/ADR-Empfehlung%208.2.pdf>. Zugriffsdatum: 11.02.2022.

Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e. V. *ADR-Empfehlung 8.3: Garantierte Qualität für Bullensperma im Handel*. 2006b: <https://www.rindschwein.de/services/files/brs/richtlinien-empfehlungen/ADR-Empfehlung%208.3.pdf>. Zugriffsdatum: 11.02.2022.

Asad L, Husain SS, Rahman MGM, Khandoker MAMY, Hossain ME, Rahman MZ. *Genetic and Non-genetic Factors Affecting the Semen Quality of Bulls*. Pakistan Journal of Biological Sciences 2004; 7: 1903-1907.

Assunção CM, Mendes VRA, Brandão FZ, Batista RITP, Souza ED, Carvalho BC, Quintão CCR, Raposo NRB, Camargo LSA. *Effects of resveratrol in bull semen extender on post-thaw sperm quality and capacity for fertilization and embryo development*. Animal Reproduction Science 2021; 226: 106697.

Avidor-Reiss T, Carr A, Fishman EL. *The sperm centrioles*. Molecular and Cellular Endocrinology 2020; 518: 110987.

Barth A (2015), *Testicular Degeneration*. In: Hooper RM (Ed.), Bovine Reproduction. Wiley Blackwell, Ames, USA, 103-108.

Bayern-Genetik GmbH. *Besamungsservice: Gebührenordnung*. 2021: <https://rind.bayern-genetik.de/de/service/besamungsservice-8.html>. Zugriffsdatum: 23.02.2022.

Bayril T, Yilmaz O. *Effect of timing of artificial insemination after synchronization of ovulation on reproductive performance in Holstein dairy cows*. Tropical Animal Health and Production 2013; 45: 411–416.

Behr M (2010). *Standardisierung der computergestützten Spermienanalyse durch Einsatz einer E-Learning-Applikation*. Tierärztliche Hochschule Hannover: Diss. med. vet.

Belala R, Briand-Amirat L, Martinot A, Thorin C, Michaud S, Desherces S, Youngs CR, Bencharif D. *A comparison of liquid and lyophilized egg yolk plasma to low density lipoproteins for freezing of canine spermatozoa*. Reproduction in Domestic Animals 2019; 54: 1131-1138.

Berruti G, Paiardi C. *Acrosome biogenesis*. Spermatogenesis 2011; 1: 95-98.

Berry DP, Cromie AR. *Artificial insemination increases the probability of a male calf in dairy and beef cattle*. Theriogenology 2007; 67: 346-352.

Berry DP, Eivers B, Dunne G, McParland S. *Genetics of bull semen characteristics in a multi-breed cattle population*. Theriogenology 2019; 123: 202-208.

Berry DP, Kearney JF, Roche JR. *Evidence of genetic and maternal effects on secondary sex ratio in cattle*. Theriogenology 2011; 75: 1039–1044.

Birck A, Christensen P, Labouriau R, Pedersen J, Borchersen S. *In vitro induction of the acrosome reaction in bull sperm and the relationship to field fertility using low-dose inseminations*. Theriogenology 2010; 73: 1180-1191.

Bó GA, Mapletoft RJ. *Evaluation and classification of bovine embryos*. Animal Reproduction 2013; 10: 344-348.

Bols PE, Langbeen A, Verberckmoes S, Leroy J. *Artificial insemination in livestock production: the Vet's perspective*. F, V & V in ObGyn, Monograph 2009; 6–12.

Boujenane I, Boussaq K. *Breed effects on semen traits of dairy and beef artificial insemination bulls*. Livestock Research for Rural Development 2014; 26: 64–69.

Brito LFC (2015a), *Bull Development: Sexual Development and Puberty in Bulls*. In: Hooper RM (Ed.), Bovine Reproduction. Wiley Blackwell, Ames, USA, 41-57.

Brito LFC (2015b), *Endocrine Control of Testicular Development and Initiation of Spermatogenesis in Bulls*. In: Hooper RM (Ed.), Bovine Reproduction. Wiley Blackwell, Ames, USA, 30-38.

Brito LFC, Silva AEDF, Rodrigues LH, Vieira FV, Deragon LAG, Kastelic JP. *Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil*. Theriogenology 2002a; 58: 1175-1186.

Brito LFC, Silva AEDF, Rodrigues LH, Vieira FV, Deragon LAG, Kastelic JP. *Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in Bos indicus and Bos taurus AI bulls in Brazil*. Animal Reproduction Science 2002b; 70: 181-190.

Brown BW. *A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams*. Reproduction Nutrition Development 1994; 34: 89-114.

Bucher K, Malama E, Siuda M, Janett F, Bollwein H. *Multicolor flow cytometric analysis of cryopreserved bovine sperm: A tool for the evaluation of bull fertility*. Journal of Dairy Science 2019; 102: 11652-11669.

Busch W (2001a), *Andrologie beim Bullen*. In: Busch W, Holzmann A (Eds.), Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, 119-216.

Busch W (2001b), *Diagnostische Aussagen spermatologischer Befunde*. In: Busch W, Holzmann A (Eds.), Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, 109-118.

Busch W (2007a), *Insemination*. In: Busch W, Waberski D (Eds.), Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, 168–188.

Busch W (2007b), *Reproduktionsorganisation*. In: Busch W, Waberski D (Eds.), Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, 188-197.

Busch W, Waberski D (2007), *Vorwort*. In: Busch W, Waberski D (Eds.), Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, V-VI.

Callaghan BD, King GJ. *Determination of the fertilization rate of A.I. sires*. Theriogenology 1980; 14: 403-410.

Chandler JE, Canal AM, Paul JB, Moser EB. *Collection frequency affects percent Y-chromosome bearing sperm, sperm head area and quality of bovine ejaculates*. Theriogenology 2002; 57: 1327-1346.

Chandler JE, Steinholt-Chenevert HC, Adkinson RW, Moser EB. *Sex Ratio Variation Between Ejaculates Within Sire Evaluated by Polymerase Chain Reaction, Calving, and Farrowing Records*. Journal of Dairy Science 1998; 81: 1855-1867.

Christensen P, Boelling D, Pedersen KM, Korsgaard IR, Jensen J. *Relationship Between Sperm Viability as Determined by Flow Cytometry and Nonreturn Rate of Dairy Bulls*. Journal of Andrology 2005; 26: 98-106.

Collins WJ, Bratton RW, Henderson CR. *The Relationship of Semen Production to Sexual Excitement of Dairy Bulls*. Journal of Dairy Science 1951; 34: 224-227.

Conti A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. *Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa*. Theriogenology 2010; 74: 424-435.

Cossarizza A, Ceccarelli D, Masini A. *Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level*. Experimental Cell Research 1996; 222: 84-94.

Cox JF, Alfaro V, Montenegro V, Rodriguez-Martinez H. *Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus*. Theriogenology 2006; 66: 860–867.

Crespilho AM, Papa FO, Sá Filho MF, Guasti PN, DellÁqua Jr JA, Vasconcelos JLM, Novaes JLC, Martins Jr A. *The influence of insemination dose on pregnancy per fixed-time artificial insemination in beef cows is affected by semen extender*. Animal Reproduction 2014; 11: 3-10.

Crites BR, Vishwanath R, Arnett AM, Bridges PJ, Burris WR, McLeod KR, Anderson LH. *Conception risk of beef cattle after fixed-time artificial insemination using either SexedUltra™ 4M sex-sorted semen or conventional semen*. Theriogenology 2018; 118: 126-129.

Davis RO, Katz DF. *Operational standards for CASA instruments*. Journal of Andrology 1993; 14: 385-394.

Dedkova EN, Sigova AA, Zinchenko VP. *Mechanism of action of calcium ionophores on intact cells: ionophore-resistant cells*. Membran & Cell Biology 2000; 13: 357-368.

DeJarnette JM, Leach MA, Nebel RL, Marshall CE, McCleary CR, Moreno JF. *Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible?* Journal of Dairy Science 2011; 94: 3477-3483.

DeJarnette JM, Saacke RG, Bame J, Vogler CJ. *Accessory Sperm: Their Importance to Fertility and Embryo Quality, and Attempts to Alter Their Numbers in Artificially Inseminated Cattle*. Journal of Animal Science 1992; 70: 484-491.

Del Río NS, Stewart S, Rapnicki P, Chang YM, Fricke PM. *An Observational Analysis of Twin Births, Calf Sex Ratio, and Calf Mortality in Holstein Dairy Cattle*. Journal of Dairy Science 2007; 90: 1255–1264.

Den Daas JHG, De Jong G, Lansbergen LMTE, Van Wagtenonk-de Leeuw AM. *The Relationship Between the Number of Spermatozoa Inseminated and the Reproductive Efficiency of Individual Dairy Bulls*. Journal of Dairy Science 1998; 81: 1714-1723.

Detterer J, Schmidt T, Harlizius B. *Factors influencing the variability in superovulation results in German holstein cattle*. Theriogenology 1997; 47: 169.

Didion BA, Graves CN. *In Vivo Capacitation and Acrosome Reaction of Bovine Sperm in Estrous and Diestrous Cows*. Journal of Animal Science 1986; 62: 1029-1033.

Diskin MG. *Review: Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle*. Animal 2018; 12: 75–84.

Dominko T, First NL. *Relationship between the maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos*. Theriogenology 1997; 47: 1041–1050.

Dransfield MBG, Nebel RL, Pearson RE, Warnick LD. *Timing of Insemination for Dairy Cows Identified in Estrus by a Radiotelemetric Estrus Detection System*. Journal of Dairy Science 1998; 81: 1874-1882.

Erb RE, Morrison RA. *Effects of Twinning on Reproductive Efficiency in a Holstein-Friesian Herd*. Journal of Dairy Science 1959; 42: 512-519.

ESHRE Andrology Special Interest Group. *Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa*. Human Reproduction 1998; 13: 142-145.

Everett RW, Bean B. *Environmental Influences on Semen Output*. Journal of Dairy Science 1982; 65: 1303-1310.

Faasch T (2009). *Untersuchungen zur wiederholten Embryoentnahme beim Rind durch Einsatz verschiedener zyklusunabhängiger Superovulationsschemata mit Progesteron-freisetzenden Vaginalspiralen und terminorientierten Besamungen*. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München: Diss. med. vet.

Farrell PB, Foote RH, McArdle MM, Trouern-Trend VL, Tardif AL. *Media and Dilution Procedures Tested to Minimize Handling Effects on Human, Rabbit, and Bull Sperm for Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA)*. Journal of Andrology 1996; 17: 293–300.

Fawcett DW. *The mammalian spermatozoon*. Developmental Biology 1975; 44: 394-436.

Fiaz M, Usmani RH, Abdullah M, Ahmad T. *Evaluation of Semen Quality of Holstein Friesian and Jersey Bulls Maintained under Subtropical Environment*. Pakistan Veterinary Journal 2010; 30: 75-78.

Fields M, Burns WC, Warnick AC. *Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls*. Journal of Animal Science 1979; 48: 1299-1304.

Fleisch A, Malama E, Witschi U, Leiding C, Siuda M, Janett F, Bollwein H. *Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen*. Theriogenology 2017; 89: 255-262.

Foote RH. *Sex ratios in dairy cattle under various conditions*. Theriogenology 1977; 8: 349-356.

Foote RH. *The history of artificial insemination: Selected notes and notables*. Journal of Animal Science 2002; 80: 1-10.

Fouz R, Gandoy F, Sanjuán ML, Yus E, Diéguez FJ. *Factors associated with 56-day non-return rate in dairy cattle*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 2011; 46: 648-654.

Frijters ACJ, Mullaart E, Roelofs RMG, Van Hoorne RP, Moreno JF, Moreno O, Merton JS. *What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process?* Theriogenology 2009; 71: 64-67.

Fuerst-Waltl B, Schwarzenbacher H, Perner C, Soelkner J. *Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls*. Animal Reproduction Science 2006; 95: 27-37.

Fuerst C, Dodenhoff J, Egger-Danner C, Emmerling R, Hamann H, Krogmeier D, Schwarzenbacher H. *Zuchtwertschätzung beim Rind - Grundlagen, Methoden und Interpretationen*. 2021: <https://zar.at/download/ZWS/ZWS.pdf>. Zugriffsdatum: 23.02.2022.

Fuerst C, Gredler B. *Genetic evaluation for fertility traits in Austria and Germany*. Interbull Bulletin 2009; 40: 3-9.

Gallagher GR, Senger PL. *Concentrations of spermatozoa in the vagina of heifers after deposition of semen in the uterine horns, uterine body or cervix*. Journal of Reproduction and Fertility 1989; 86: 19-25.

Garner DL, Johnson LA. *Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide*. Biology of Reproduction 1995; 53: 276-284.

Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP. *Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide*. Journal of Andrology 1994; 15: 620-629.

Garner DL, Thomas CA. *Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm*. Molecular Reproduction and Development 1999; 53: 222-229.

Gerton GL, Vadnais ML (2018), *Structure of the Spermatozoon*. In: Skinner MK (Ed.), Encyclopedia of Reproduction. Academic Press, Oxford, 123-128.

Gil J, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. *Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen*. Theriogenology 2000; 54: 93-108.

Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. *Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential*. Theriogenology 2005; 63: 445-457.

Givan AL (2001), *Flow cytometry: first principles*. Wiley-Liss Inc. New York, USA.

Globs S (2001), *Beeinflussung durch Pharmaka und Umweltgifte*. In: Busch W, Holzmann A (Eds.), *Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren*. Schattauer Verlag, Stuttgart, 461-474.

Graham JK. *Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach*. Animal Reproduction Science 2001; 68: 239-247.

Griffin DK, Abruzzo MA, Millie EA, Feingold E, Hassold TJ. *Sex ratio in normal and disomic sperm: evidence that the extra chromosome 21 preferentially segregates with the Y chromosome*. American Journal of Human Genetics 1996; 59: 1108-1113.

Grötter LG, Cattaneo L, Marini PE, Kjelland ME, Ferré LB. *Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization*. Reproduction in Domestic Animals 2019; 54: 655-665.

Gutiérrez-Adán A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B, De la Fuente J. *Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos*. Theriogenology 2001; 55: 1117-1126.

Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo SS, Granados J, Garde JJ, Pérez-Guzmán M, Pintado B, De La Fuente J. *Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte*. Zygote 1999; 7: 37-43.

Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. *Bovine Seminal Plasma Proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa Share Functional Roles in Storing Sperm in the Oviduct*. Biology of Reproduction 2006; 75: 501-507.

Hahn J. *Attempts to explain and reduce variability of superovulation*. Theriogenology 1992; 38: 269-275.

Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. *Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive*. Journal of Andrology 1990; 11: 73-88.

Hanstedt A (2009). *Beurteilung der Entwicklungskompetenz boviner Oozyten aus Follikeln mit unterschiedlicher Durchblutung der Follikelwand*. Tierärztliche Hochschule Hannover: Diss. med. vet.

Hardy ICW. *Possible factors influencing vertebrate sex ratios: an introductory overview*. Applied Animal Behaviour Science 1997; 51: 217-241.

Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC, Foote RH. *Superovulatory responses of Holstein cows*. Theriogenology 1983; 19: 83-99.

Hassanane M, Kovacs A, Laurent P, Lindblad K, Gustavsson I. *Simultaneous detection of X-and Y-bearing bull spermatozoa by double colour fluorescence in situ hybridization*. Molecular Reproduction and Development 1999; 53: 407-412.

Hawk HW. *Sperm Survival and Transport in the Female Reproductive Tract*. Journal of Dairy Science 1983; 66: 2645-2660.

Hawk HW. *Transport and Fate of Spermatozoa After Insemination of Cattle*. Journal of Dairy Science 1987; 70: 1487-1503.

Hawk HW, Tanabe TY. *Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single-ovulating cattle*. Journal of Animal Science 1986; 63: 551-560.

Hirwa CDA, Kugonza DR, Amahoro E, Ingabire C, Niyiragira V, Myambi C, Manzi M, Murekezi T, Nyabinwa P, Nshimiyimana AM, Kanyandekwe C, Gahakwa D. *Influence of breed, season and age on quality bovine semen used for artificial insemination*. International Journal of Livestock Production 2017; 8: 72-78.

Hoedemaker M, Mansfeld R, de Kruif A, Heuwieser W (2014), *Fruchtbarkeit*. In: de Kruif A, Mansfeld R, Hoedemaker M (Eds.), Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. Enke Verlag, Stuttgart, 46-90.

Holstein A-F, Schulze W, Davidoff M. *Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment*. Reproductive Biology and Endocrinology 2003; 1: 107.

Holt W, Watson P, Curry M, Holt C. *Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop*. Fertility and Sterility 1994; 62: 1277-1282.

Hossain MS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. *Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art*. Asian Journal of Andrology 2011; 13: 406-419.

Hosseini-Zadeh NG, Nejati-Javaremi A, Miraei-Ashtiani SR, Kohram H. *An Observational Analysis of Twin Births, Calf Stillbirth, Calf Sex Ratio, and Abortion in Iranian Holsteins*. Journal of Dairy Science 2008; 91: 4198-4205.

Hunter RHF. *Advances in deep uterine insemination: a fruitful way forward to exploit new sperm technologies in cattle*. Animal Reproduction Science 2003; 79: 157-170.

Hupka S (2000). *Erfolgsbeeinflussende Faktoren im Rahmen der Embryonengewinnung beim kommerziellen ET des Rindes unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Superovulationsschemata und Besamungstypen*. Tierärztliche Hochschule Hannover: Diss. med. vet.

Igboeli G, Foote RH. *Maturation Changes in Bull Epididymal Spermatozoa*. Journal of Dairy Science 1968; 51: 1703-1705.

Ignă V, Moje A, Mircu C, Roman M, Ghiurca C, Casalean D, Cernescu H. *The influence of some environmental factors and age on semen production of Fleckvieh bulls*. *Lucrări Științifice Medicină Veterinară* 2010; 43: 56-63.

Ignotz GG, Lo MC, Perez CL, Gwathmey TM, Suarez SS. *Characterization of a Fucose-Binding Protein from Bull Sperm and Seminal Plasma That May Be Responsible for Formation of the Oviductal Sperm Reservoir*. *Biology of Reproduction* 2001; 64: 1806-1811.

IMV Technologies France. *AlphaVision*: <https://www.alphavision-imv.com/de/>.
Zugriffsdatum: 23.02.2022.

IMV Technologies France. *EasyBuffer A and B*: <https://www.imv-technologies.com/product/easy-buffer-a-and-b>.
Zugriffsdatum: 23.02.2022.

Islam MM, Apu AS, Hoque SAM, Ali Y, Karmaker S. *Comparative study on the libido, semen quality and fertility of Brahman cross, Holstein Friesian cross and Red Chittagong breeding bulls*. *Bangladesh Journal of Animal Science* 2018; 47: 61-67.

IVF Limited. *Bovine Media*. 2016: <https://ivfbioscience.com/bovine-media/>.
Zugriffsdatum: 23.02.2022.

Janett F, Schilter E, Weber F, Witschi U, Thun R. *Auswirkungen der Handhabung von Pailletten während der Lagerung auf die Qualität von Stiersamen*. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 2008; 150: 591-597.

Johansson I, Lindhé B, Pirchner F. *Causes of variation in the frequency of monozygous and dizygous twinning in various breeds of cattle*. *Hereditas* 1974; 78: 201-234.

Johnson LA. *Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art*. *Animal Reproduction Science* 2000; 60-61: 93-107.

Kafi M, McGowan MR. *Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle*. *Animal Reproduction Science* 1997; 48: 137-157.

Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G. *Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System – A Review*. *Reproduction in Domestic Animals* 2011; 46: 165-172.

Kelly P, Duffy P, Roche JF, Boland MP. *Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns*. *Animal Reproduction Science* 1997; 46: 1-14.

Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AEB, Hassan MAE. *Impact of selenium nanoparticles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation*. *Theriogenology* 2019; 126: 121-127.

Khan S, Qureshi MS, Chand N, Sultan A, Rafiullah I, Ihsanullah K. *Effect of breeding method on calf sex and postpartum reproductive performance of cattle and buffaloes*. *Sarhad Journal of Agriculture* 2012; 28: 469-476.

Kimura K, Spate LD, Green MP, Murphy CN, Seidel GE, Jr., Roberts RM. *Sexual dimorphism in interferon-tau production by in vivo-derived bovine embryos*. Molecular Reproduction and Development 2004; 67: 193-199.

Knight CW, Patrick TE, Anderson HW, Branton C. *The Relation of Site of Semen Deposit to Breeding Efficiency of Dairy Cattle*. Journal of Dairy Science 1951; 34: 199-202.

Krienke M (2003). *Evaluierung durchflusszytometrischer Verfahren zur Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstsperma*. Tierärztlichen Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München: Diss. med. vet.

Kurykin J, Jaakma Ü, Jalakas M, Aidnik M, Waldmann A, Majas L. *Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers*. Theriogenology 2007; 67: 754-759.

Kurykin J, Jaakma Ü, Waldmann A, Jalakas M, Aidnik M, Majas L, Padrik P. *Low semen dose intracornual insemination of cows at fixed time after PGF₂alpha treatment or at spontaneous estrus*. Animal Reproduction Science 2006; 95: 116-124.

Larsson B, Larsson K. *Distribution of Spermatozoa in the Genital Tract of Artificially Inseminated Heifers*. Acta Veterinaria Scandinavica 1985; 26: 385-395.

Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. *Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders*. Animal Reproduction Science 2016; 172: 1-9.

Lechniak D, Strabel T, Bousquet D, King AW. *Sperm pre-incubation prior to insemination affects the sex ratio of bovine embryos produced in vitro*. Reproduction in Domestic Animals 2003; 38: 224-227.

Leite TG, Do Vale Filho VR, De Arruda RP, De Andrade AFC, Emerick LL, Zaffalon FG, Martins JAM, De Andrade VJ. *Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry*. Animal Reproduction Science 2010; 120: 31-38.

Lemma A, Shemsu T. *Effect of age and breed on semen quality and breeding soundness evaluation of pre-service young bulls*. Journal of Reproduction and Infertility 2015; 6: 35-40.

Leonhard-Marek S (2001), *Spurenelemente und Fertilität*. In: Busch W, Holzmann A (Eds.), Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, 474-484.

Liebich H-G (2004), *Männliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia masculina)*. In: Liebich H-G (Ed.), Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Schattauer Verlag, Stuttgart, 271-292.

López-Gatiús F. *Site of semen deposition in cattle: A review*. Theriogenology 2000; 53: 1407-1414.

López-Gatius F, Camón-Urgel J. *Increase of pregnancy rate in dairy cattle after preovulatory follicle palpation and deep cornual insemination*. Theriogenology 1988; 29: 1099–1103.

Lopez-Gatius F, Yaniz J. *Intraperitoneal insemination and retrograde sperm transport in dairy cows*. Journal of Veterinary Medicine Series A 2000; 47: 83-88.

Lunstra DD, Echternkamp SE. *Puberty in Beef Bulls: Acrosome Morphology and Semen Quality in Bulls of Different Breeds*. Journal of Animal Science 1982; 55: 638-648.

Luo S-M, Schatten H, Sun Q-Y. *Sperm Mitochondria in Reproduction: Good or Bad and Where Do They Go?* Journal of Genetics and Genomics 2013; 40: 549–556.

Lyashenko A. *Effect of different thawing procedures on the quality and fertility of the bull spermatozoa*. Asian Pacific Journal of Reproduction 2015; 4: 17-21.

Maatje K, Loeffler SH, Engel B. *Predicting Optimal Time of Insemination in Cows that Show Visual Signs of Estrus by Estimating Onset of Estrus with Pedometers*. Journal of Dairy Science 1997; 80: 1098-1105.

MacPherson JW. *Semen Placement Effects on Fertility in Bovines*. Journal of Dairy Science 1968; 51: 807-808.

Majić Balić I, Milinković-Tur S, Samardžija M, Vince S. *Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in simmental bulls*. Theriogenology 2012; 78: 423-431.

Malama E, Zeron Y, Janett F, Siuda M, Roth Z, Bollwein H. *Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality*. Theriogenology 2017; 87: 79-90.

Mapletoft RJ, Bó GA (2015), *Superovulation in Cattle*. In: Hooper RM (Ed.), Bovine Reproduction. Wiley Blackwell, Ames, USA, 696-702.

Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. *Recent advances in the superovulation in cattle*. Reproduction Nutrition Development 2002; 42: 601-611.

Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. *Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility*. Human Reproduction 2004; 19: 2267–2276.

Marshall CE, Graves WM, Meador JL, Swain JB, Anderson JI. *A fertility comparison of uterine body and bicornual semen deposition procedures in dairy cattle*. Journal of Animal Science 1989; 72: 455 (Abstr.).

Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel L, De Paz P. *Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry*. Reproduction in Domestic Animals 2010; 45: 67-78.

Martinez F, Kaabi M, Martinez-Pastor F, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, De Paz P, Anel L. *Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: a field study*. Theriogenology 2004; 62: 1264–1270.

Mathevon M, Buhr MM, Dekkers JCM. *Environmental, Management, and Genetic Factors Affecting Semen Production in Holstein bulls*. Journal of Dairy Science 1998; 81: 3321-3330.

McKenna T, Lenz RW, Fenton SE, Ax RL. *Nonreturn rates of dairy cattle following uterine body or cornual insemination*. Journal of Dairy Science 1990; 73: 1779–1783.

McKinnon KM. *Flow Cytometry: An Overview*. Current Protocols in Immunology 2018; 120: 5.1.1-5.1.11.

Meirelles C, Kozicki LE, Weiss RR, Segui MS, Souza A, dos Santos IW, dos Santos Breda JC. *Comparison between deep intracornual artificial insemination (dIAI) and conventional artificial insemination (AI) using low concentration of spermatozoa in beef cattle*. Brazilian Archives of Biology and Technology 2012; 55: 371–374.

Mendoza MAH, Niven M (1992). *Device to facilitate artificial insemination of bovines and similar animals* (5,147,299). United States Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US5147299>

Mendoza MAH, Niven WA (2000). *Device and method for artificial insemination of bovines and other animals* (6,071,231). United States Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US6071231A/en>

Mikkola M, Taponen J. *Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset*. Theriogenology 2017; 88: 84-88.

Minitüb GmbH (2018). *Minitüb Manual AndroVision® 12500/0000*.

Mitchell JR, Senger PL, Rosenberger JL. *Distribution and Retention of Spermatozoa with Acrosomal and Nuclear Abnormalities in the Cow Genital Tract*. Journal of Animal Science 1985; 61: 956-967.

Moller K, Macmillan KL, Shannon P. *Site of insemination and subsequent non-return rates in cows*. New Zealand Journal of Agricultural Research 1972; 15: 252-254.

Momont HW, Seguin BE, Singh G, Stasiukynas E. *Does intrauterine site of insemination in cattle really matter?* Theriogenology 1989; 32: 19–26.

Morrell JM, Nongbua T, Valeanu S, Lima Verde I, Lundstedt-Enkel K, Edman A, Johannisson A. *Sperm quality variables as indicators of bull fertility may be breed dependent*. Animal Reproduction Science 2017; 185: 42-52.

Mortimer ST. *CASA—practical aspects*. Journal of Andrology 2000; 21: 515-524.

Mostafapor S, Ardebili FF. *Effects of diluting medium and holding time on sperm motility analysis by CASA in ram*. Veterinary Research Forum 2014; 5: 101–105.

Murphy EM, Eivers B, O'Meara CM, Lonergan P, Fair S. *Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination*. Theriogenology 2018; 108: 217-222.

Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM. *A Triple-Stain Flow Cytometric Method to Assess Plasma- and Acrosome-Membrane Integrity of Cryopreserved Bovine Sperm Immediately after Thawing in Presence of Egg-Yolk Particles*. Biology of Reproduction 2003; 68: 1828-1835.

Nichi M, Bols P, Züge R, Barnabe V, Goovaerts I, Barnabe R, Cortada C. *Seasonal variation in semen quality in Bos indicus and Bos taurus bulls raised under tropical conditions*. Theriogenology 2006; 66: 822-828.

Nur Z, Dogan I, Soylu MK, Ak K. *Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen*. Revue de Medecine Vétérinaire 2003; 154: 487-490.

Panda SK, Nayak G, Mishra C. *Effect of Breed on Seminal Characters of Breeding Bulls of Odisha*. International Journal of Livestock Research 2017; 7: 63-68.

Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Baldi E, Francavilla S, Lenzi A, Lombardo F, Gandini L. *Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility*. Fertility and Sterility 2011; 95: 2315–2319.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. *Capacitation of Bovine Sperm by Heparin: Inhibitory Effect of Glucose and Role of Intracellular pH*. Biology of Reproduction 1989; 41: 683-699.

Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Tzur A. *JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry*. Cell Death and Disease 2012; 3: e430.

Perumal P, Barik A, Mohanty D, Das S, Mishra P, Chang S. *Comparison of Semen Characteristics of Good and Poor Freezable Jersey Crossbred Bulls*. International Journal of Bio-resource and Stress Management 2016; 7: 1177-1180.

Peters JL, Senger PL, Rosenberger JL, O'Connor ML. *Radiographic evaluation of bovine artificial inseminating technique among professional and herdsman-inseminators using .5- and .25-ml French straws*. Journal of Animal Science 1984; 59: 1671–1683.

Petrunkina A, Harrison R. *Fluorescence technologies for evaluating male gamete (dys)function*. Reproduction in Domestic Animals 2013; 48: 11-24.

Petrunkina A, Töpfer-Petersen E, Waberski D. *Moderne Verfahren in der spermatologischen Diagnostik*. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie 2008; 5: 262-271.

Pongsiri W, Rungruangsak J, Pant SD, Stephen CP. *The effect of false mount on quality of frozen-thawed semen in Bos indicus beef bulls*. The Journal of Veterinary Medical Science 2020; 82: 673-677.

Pratt NC, Huck UW, Lisk RD. *Offspring sex ratio in hamsters is correlated with Vaginal pH at certain times of mating*. Behavioral and Neural Biology 1987; 48: 310-316.

Pryce JE, Royal MD, Garnsworthy PC, Mao IL. *Fertility in the high-producing dairy cow*. Livestock Production Science 2004; 86: 125-135.

Pursley RJ, Silcox RW, Wiltbank MC. *Effect of Time of Artificial Insemination on Pregnancy Rates, Calving Rates, Pregnancy Loss, and Gender Ratio After Synchronization of Ovulation in Lactating Dairy Cows*. Journal of Dairy Science 1998; 81: 2139-2144.

Rahman MS, Pang M-G. *New biological insights on X and Y chromosome-bearing spermatozoa*. Frontiers in Cell and Developmental Biology 2020; 7: 388.

Ray PF, Conaghan J, Winston RML, Handyside AH. *Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following in vitro fertilization*. Journal of Reproduction and Fertility 1995; 104: 165-171.

Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB. *Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye*. Methods in Enzymology 1995; 260: 406-417.

Reers M, Smith TW, Chen LB. *J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential*. Biochemistry 1991; 30: 4480-4486.

Reurink A, Den Daas JHG, Wilmink JBM. *Effects of AI sires and technicians on non-return rates in the Netherlands*. Livestock Production Science 1990; 26: 107-118.

Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A. *Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer*. Theriogenology 2003; 60: 1553-1568.

Robayo I, Montenegro V, Valdés C, Cox J. *CASA Assessment of Kinematic Parameters of Ram Spermatozoa and their Relationship to Migration Efficiency in Ruminant Cervical Mucus*. Reproduction in Domestic Animals 2008; 43: 393-399.

Rorie RW. *Effect of timing of artificial insemination on sex ratio*. Theriogenology 1999; 52: 1273-1280.

Rorie RW, Lester TD, Lindsey BR, McNew RW. *Effect of timing of artificial insemination on gender ratio in beef cattle*. Theriogenology 1999; 52: 1035-1041.

Rovan E (2001), *Biochemie der Spermatozoa*. In: Busch W, Holzmann A (Eds.), Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, 23-54.

Sadava D, Hillis DM, Heller HC, Berenbaum MR (2011), *Purves Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

Salisbury GW, Vandemark NL. *The Effect of Cervical, Uterine and Cornual Insemination on Fertility of the Dairy Cow*. Journal of Dairy Science 1951; 34: 68-74.

Schenk JL. *Review: Principles of maximizing bull semen production at genetic centers*. Animal 2018; 12: 142-147.

Scherzer J. *persönliche Mitteilung*; Kumhausen, 2020.

Schnabel M (2009). *Zur experimentellen Darstellung von thermischen Effekten an isolierten Zellen: Eine Modellstudie an Rinderspermien*. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München: Diss. med. vet.

Seidel GE. *Update on sexed semen technology in cattle*. Animal 2014; 8: 160-164.

Seidel GE, Foote RH. *Influence of Semen Collection Interval and Tactile Stimuli on Semen Quality and Sperm Output in Bulls*. Journal of Dairy Science 1969; 52: 1074-1079.

Seidel GE, Schenk JL. *Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition*. Animal Reproduction Science 2008; 105: 129-138.

Seifi-Jamadi A, Zhandi M, Kohram H, Luceño NL, Leemans B, Henrotte E, Latour C, Demeyere K, Meyer E, Van Soom A. *Influence of seasonal differences on semen quality and subsequent embryo development of Belgian Blue bulls*. Theriogenology 2020; 158: 8-17.

Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EPC. *Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen*. Theriogenology 2015; 84: 1447-1454.

Senger PL, Becker WC, Davidge ST, Hillers JK, Reeves JJ. *Influence of cornual insemination on conception in dairy cattle*. Journal of Animal Science 1988; 66: 3010-3016.

Shannon P, Vishwanath R. *The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences*. Animal Reproduction Science 1995; 39: 1-10.

Sinowatz F (2001), *Morphologie und Histologie der männlichen Geschlechtsorgane*. In: Busch W, Holzmann A (Eds.), *Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung*. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1-22.

Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD, Jr., Chen LB. *Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1991; 88: 3671-3675.

Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Campo PC, Peregrín PC, Freitas A, Paiva A, Almeida-Santos T, Ramalho-Santos J. *Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential*. PLOS ONE 2011; 6: e18112.

Stälhammar E-M, Janson L, Philipsson J. *Genetic studies on fertility in A.I. bulls. I. Age, season and genetic effects on semen characteristics in young bulls*. Animal Reproduction Science 1989; 19: 1-17.

Staub C, Johnson L. *Review: Spermatogenesis in the bull*. Animal 2018; 12: 27-35.

Strothmeyer MS (2013). *Kryokonservierung von Bullensperma in kleinen Volumina*. Fakultät für Agrarwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen: Diss. sc. agr.

Stroud BK (2012). *Artificial breeding techniques for bovines including semen diluents and AI apparatus (US 8,202,210)*. United States Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US8202210B2/en>

Stroud BK, 2015. *A novel insemination system for superovulated beef donors*. 2015 CETA/ACTE and AETA Joint Convention Proceedings, Ontario, Kanada, 41-66.

Stroud BK (2016a). *Artificial breeding techniques for bovines including semen diluents and AI apparatus (US 9,433,484)*. United States Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US9433484B2/en>

Stroud BK. *persönliche Mitteilung*, 2016b.

Stroud BK (2017). *Method and apparatus to reduce the number of sperm used in artificial insemination of cattle (US 9,554,883)*. United States Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US9554883B2/en>

Stroud BK (2020). *Method, apparatus and kit for artificial insemination of bovine (US 10,610,343)*. United States Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US10610343B2/en>

Suarez SS. *Formation of a reservoir of sperm in the oviduct*. Reproduction in Domestic Animals 2002; 37: 140-143.

Swanepoel F, Taylor G, Webb E, Stroebel A. *Effect of nutrition on testicular traits of tropically adapted yearling beef bulls*. Australian Journal of Experimental Agriculture 2008; 48: 950-953.

Tardif AL, Farrell PB, Trouern-Trend V, Foote RH. *Computer-Assisted Sperm Analysis for Assessing Initial Semen Quality and Changes During Storage at 5°C*. Journal of Dairy Science 1997; 80: 1606–1612.

Taylor JF, Bean B, Marshall CE, Sullivan JJ. *Genetic and Environmental Components of Semen Production Traits of Artificial Insemination Holstein Bulls*. Journal of Dairy Science 1985a; 68: 2703-2722.

Taylor JF, Everett RW, Bean B. *Systematic environmental, direct, and service sire effects on conception rate in artificially inseminated Holstein cows*. Journal of Dairy Science 1985b; 68: 3004-3022.

- Tesfu F, Gebrekidan B, Afera B. *Assessment and Comparison of Sex Ratio Following Artificial Insemination and Natural Mating in Small Scale and Modern Dairy Cattle Farms in Mekelle*. Journal of Reproduction and Infertility 2014; 5: 58–64.
- Thérien I, Manjunath P. *Effect of Progesterone on Bovine Sperm Capacitation and Acrosome Reaction*. Biology of Reproduction 2003; 69: 1408-1415.
- Thermo Fisher Scientific Inc. *Molecular Probes™ MitoProbe™ JC-1 Assay Kit*. 2022: <https://www.fishersci.de/shop/products/mitoprobe-jc-1-assay-kit/10226762>. Zugriffsdatum: 23.02.2022.
- Thun R, Hurtado M, Janett F. *Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen*. Theriogenology 2002; 57: 1087-1094.
- Töpfer-Petersen E (2007), *Spermienreifung, Transport und Befruchtung*. In: Busch W, Waberski D (Eds.), *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren*. Schattauer Verlag, Stuttgart, 84–93.
- Töpfer-Petersen E, Waberski D (2001), *Spermienreifung und Befruchtung*. In: Busch W, Holzmann A (Eds.), *Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren*. Schattauer Verlag, Stuttgart, 67–82.
- Troppmann AT (2000). *Vergleich zwischen der Embryonengewinnung an mehrfach superovulierten Dauerspenderkühen und der Embryoerzeugung durch in vitro Punktion nach transvaginaler Follikelpunktion*. Tierärztlichen Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München: Diss. med. vet.
- Utt MD. *Prediction of bull fertility*. Animal Reproduction Science 2016; 169: 37-44.
- Van Wagendonk-de Leeuw AM, Haring RM, Kaal-Lansbergen LMTE, Den Daas JHG. *Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract*. Theriogenology 2000; 54: 57-67.
- Verberckmoes S, Van Soom A, De Pauw I, Dewulf J, Vervaeke C, de Kruif A. *Assessment of a new utero-tubal junction insemination device in dairy cattle*. Theriogenology 2004; 61: 103–115.
- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J, Thys M, de Kruif A. *Low dose insemination in cattle with the Ghent device*. Theriogenology 2005; 64: 1716–1728.
- Viana J. *2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Embryo industry on a new level: over one million embryos produced in vitro*. Embryo Technology Newsletter 2019; 37: 7-25.
- Viana J. *2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Divergent trends for IVD and IVP embryos*. Embryo Technology Newsletter 2020; 38: 7-26.

Viana J. 2020 *Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: World embryo industry grows despite the pandemic*. Embryo Technology Newsletter 2021a; 39: 24-43.

Viana JHM. *persönliche Mitteilung*, 2021b.

Vincent P, Underwood SL, Dolbec C, Bouchard N, Kroetsch T, Blondin P. *Bovine semen quality control in artificial insemination centers*. Animal Reproduction 2012; 9: 153-165.

Vincent P, Underwood SL, Dolbec C, Bouchard N, Kroetsch T, Blondin P (2021), *Bovine Semen Quality Control in Artificial Insemination Centers*. In: Hooper RM (Ed.), Bovine Reproduction. Wiley Blackwell, Hoboken, USA, 1019-1031.

Vishwanath R. *Artificial insemination: the state of the art*. Theriogenology 2003; 59: 571–584.

Vishwanath R, Shannon P. *Storage of bovine semen in liquid and frozen state*. Animal Reproduction Science 2000; 62: 23–53.

Waberski D (2007), *Spermien und Seminalplasma*. In: Busch W, Waberski D (Eds.), Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, 78-83.

Waberski D, Petrunkina AM (2007), *Spermatologie*. In: Busch W, Waberski D (Eds.), Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, 99-118.

Wehner GR, Wood C, Tague A, Barker D, Hubert H. *Efficiency of the OVATEC unit for estrus detection and calf sex control in beef cows*. Animal Reproduction Science 1997; 46: 27–34.

Wehrend A, 2014. *Kennzahlen zur Fruchtbarkeit und deren Interpretation*. 6. Tierärztetagung, Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein, 5-8.

Weitze KF (2001a), *Andrologischer Untersuchungsgang*. In: Busch W, Holzmann A (Eds.), Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, 119-137.

Weitze KF (2001b), *Prinzipien der Verdünnung und Konservierung*. In: Busch W, Holzmann A (Eds.), Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, 511-517.

Weitze KF (2001c), *Spermatologische Untersuchung*. In: Busch W, Holzmann A (Eds.), Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, 87-109.

Weitze KF, Petrunkina AM (2007), *Samenkonservierung, biochemische Grundlagen und Prinzipien der Einfrier- und Auftautechniken*. In: Busch W, Waberski D (Eds.), Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, 119-131.

Wendlinger W. *persönliche Mitteilung*, 2020.

Wendt H (2007). *Interaktionen von Spermien mit Immunzellen des Rinderuterus*. Tierärztliche Hochschule Hannover: Diss. med. vet.

Williams BL, Gwazdauskas FC, Whittier WD, Pearson RE, Nebel RL. *Impact of site of inseminate deposition and environmental factors that influence reproduction of dairy cattle*. Journal of Dairy Science 1988; 71: 2278–2283.

World Health Organization (2010), *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. World Health Organization Geneva, Schweiz.

Wrenzycki C, Niemann H (2007), *Embryo-assoziierte Biotechniken*. In: Busch W, Waberski D (Eds.), *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren*. Schattauer Verlag, Stuttgart, 132-145.

Wu C (2005). *Durchflusszytometrische Verfahren zur Beurteilung der Spermaqualität nach einer experimentell induzierten Hyperthermie am Bullenhoden*. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München: Diss. med. vet.

Xu Z, Johnson D, Burton L, 2000. *Factors affecting the sex ratio of dairy cattle in New Zealand*. Conference of New Zealand Society of Animal Production. New Zealand Society of Animal Production, Hamilton, New Zealand, 301-302.

Zaneveld LJD, De Jonge CJ (1991), *Mammalian Sperm Acrosomal Enzymes and the Acrosome Reaction*. In: Dunbar BS, O'Rand MG (Eds.), *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. Plenum Press, New York, 63-79.

IX. ANHANG

1. Puffermedien

EasyBuffer B (EBB) (Ref. 023862, Fa. IMV Technologies, L`Aigle, Frankreich)
(IMV TECHNOLOGIES FRANCE)

Beim EasyBuffer B handelt es sich um eine sterile Pufferlösung der Firma IMV Technologies. Sie dient zur Präparation von Bullensperma für die durchflusszytometrische Analyse.

modifiziertes Fert-TALP (mFert-TALP)

Dieses Medium wurde auf Basis von Maximate[®] (STROUD, 2016b) und Fert-TALP-Stocklösung (HANSTEDT, 2009) hergestellt. Bei Maximate[®] handelt es sich um ein von STROUD (2015) entwickeltes Medium für die HVB. Fert-TALP ist ein Befruchtungsmedium, das bei der IVF boviner Oozyten eingesetzt wird. In Tabelle 9 ist die stoffliche Zusammensetzung der beiden Medien zur Übersicht zusammengefasst. Tabelle 10 beinhaltet die stoffliche Zusammensetzung von mFert-TALP. Die Stoffe wurden über die Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Tabelle 9: Stoffliche Zusammensetzung von Maximate[®] und Fert-TALP-Stocklösung modifiziert nach STROUD (2016b) und HANSTEDT (2009)

Maximate[®]	Fert-TALP-Stocklösung
NaCl, Natriumchlorid	NaCl, Natriumchlorid
KCl, Kaliumchlorid	KCl, Kaliumchlorid
NaHCO ₃ , Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃ , Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, Natriumdihydrogenphosphat-Mono- hydrat	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, Natriumdihydrogenphosphat-Mono- hydrat
CaCl ₂ ·2H ₂ O, Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ ·2H ₂ O, Calciumchlorid-Dihydrat
NaC ₃ H ₅ O ₃ , Natriumlactat	NaC ₃ H ₅ O ₃ , Natriumlactat (Sirup 60%)
MgCl ₂ ·6H ₂ O, Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl ₂ ·6H ₂ O, Magnesiumchlorid-Hexahydrat
MOPs Puffer, 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	
Phenolrot	Phenolrot
NaOH, Natronlauge	
	Penicillamin
Reinstwasser	Reinstwasser

Tabelle 10: Stoffliche Zusammensetzung des modifizierten Fert-TALP

Inhaltsstoff	Sigma Bestellnummer	100 ml mFert-TALP <small>(Angabe in mg, wenn nicht anders vermerkt)</small>
NaCl	S5886	666,0
KCl	P5404	23,5
NaHCO ₃	S5761	210,3
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	71507	4,7
CaCl ₂ ·2H ₂ O	C7902	39,7
NaC ₃ H ₅ O ₃ , Sirup 60% in µl	L4263	186,0
MgCl ₂ ·6H ₂ O	M2393	10,0
MOPs Puffer	M3183	209,3
Phenolrot	P4633	1,0
Reinstwasser in ml	–	100,0

Osmolarität: 295-305 osmol/l; pH: 6,9-7,1

Für die Herstellung von mFert-TALP wurden die benötigten Mengen der Inhaltsstoffe mittels Laborwaage bzw. Pipetten abgemessen, in einen Glaskolben überführt und mit dem Magnetrührer bis zur vollständigen Lösung gerührt. Im Anschluss wurden mit Hilfe von pH-Meter und Osmometer der pH-Wert und die Osmolarität überprüft und gegebenenfalls eingestellt. Dann wurde die sterile Filtration von mFert-TALP in Laborglasflaschen durchgeführt. Eine Zugabe von Albumin und Pyruvat erfolgte nicht.

BO-IVF™ (BIVF) (Ref. 61003, Fa. IVF Bioscience, Falmouth, Vereinigtes Königreich) (IVF LIMITED, 2016)

BO-IVF™ ist ein Befruchtungsmedium, das bei der in vitro Fertilisation reifer Eizellen zum Einsatz kommt. Es ist serumfrei und enthält Heparin und Gentamycin. Es verfügt über eine optimierte PHE-(Penicillamin-Hypotaurin-Epinephrin)-Lösung, die sowohl die Spermienkapazitation als auch die Pronukleus-Formation sowie die Embryonalentwicklung unterstützt.

BO-SemenPrep™ (BSPREP) (Ref. 61004, Fa. IVF Bioscience, Falmouth, Vereinigtes Königreich) (IVF LIMITED, 2016)

BO-SemenPrep™ ist ein Spermienpräparationsmedium, das bei der in vitro Fertilisation beim Waschen des Spermas Einsatz findet. Es ist nicht kapazitierend und enthält Gentamycin. Laut Herstellerangaben schon es bis zur Überführung der Spermien in das eigentliche Fertilisationsmedium die Energie der Spermien und puffert spermientoxische Gradienten ab.

2. Geräte, (Verbrauchs)Materialien und Medikamente

2.1. Geräte

Brunsterkennungsprogramm Bayern-Watch	Fa. ENGS, Rosh Pina, Israel
CASA-System AndroVision®	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Digitalthermometer GMH 3210	Fa. GHM Group-Greisinger, Regenstauf
Durchflusszytometer Guava® easyCyte 5HT Benchtop	Fa. Millipore Corporation, Billerica, USA
Einfriermaschine Digitcool	Fa. IMV Technologies, L`Aigle, Frankreich
Gefrierschrank	Fa. Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Gefrierschrank	Fa. MMS E-Commerce GmbH, Ingolstadt
Heidolph Reagenzglasschüttler Reax top	Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Heizblöcke in verschiedenen Größen	Fa. Metalldesign Otto Maul, Hoheneggkofen
Herdüberwachungsprogramm HerdVision	Fa. MOFA Global Inc., Wisconsin, USA
Inkubator Esco ScanCell 37	Fa. LaboGene, Lillerød, Dänemark
IKA Magnetrührer mit Heizung	Fa. IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Klimabox mit variabler Temperatureinstellung einschließlich Netzgerät	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Kugelbad (Trockentemperiergerät)	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Kühlschrank Kirsch LABO-468	Fa. Philipp Kirsch GmbH, Offenburg
Künstliche Vagina	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Laborheizplatten mit fest eingestellter Temperatur	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Laborkühlschrank	Fa. Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Labor-pH-Meter inoLab®	Fa. WTW, Weilheim in Oberbayern

Laborschüttler Vortex-Genie 2	Fa. Scientific Industries Inc., Bohe- mia, USA
Laborwaage Analysenwaage Sartorius A201P	Fa. Sartorius AG, Göttingen
Laborwaage Präzisionswaage Kern EW	Fa. Kern & Sohn GmbH, Balingen
Mobile-Daten-Erfassungsgerät Typ Ho- neywell CT50	Fa. Scientific Industries Inc., Bohe- mia, USA
Moticam	Fa. Motic Instruments Inc., Rich- mond, Kanada
Osmometer	Fa. Löser Messtechnik, Berlin
Phasenkontrastmikroskop Olympus CH2	Fa. Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan
Photometer SDM5 (Wellenlänge 546 nm)	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Pipette Pipetman L P10, einstellbar (1- 10 ml)	Fa. Gilson Inc., Middleton, USA
Pipetten Pipetman Classic P2, P20, P100, P200, P1000, einstellbar (0,1-2 μ l, 2-20 μ l, 20-100 μ l, 20-200 μ l, 100- 1000 μ l)	Fa. Gilson Inc., Middleton, USA
Pipetten Pipetman Neo, 12-Kanal, ein- stellbar (2-20 μ l, 20-200 μ l)	Fa. Gilson Inc., Middleton, USA
Reinstwasseranlage arium [®] mini	Fa. Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG, Göttingen
SmartDispenser	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Software CytoSoft Version 5.4.1 beta2	Fa. IMV Technologies, L`Aigle, Frankreich
Warenwirtschaftssoftware KBPro	Fa. Bayern-Genetik GmbH, Kum- hausen
Stereomikroskop Nikon SMZ 745T	Fa. Nikon Deutschland, Düsseldorf
Steuergerät HT 200 S	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Vollautomatische Abfüll- und Ver- schleißmaschine für Spermapailletten MPP Quattro	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Wasserbad Model WBS-07	Fa. Fried Electric, Haifa, Israel
Wasserbad mit Einhängethermostat Exatherm U3 electronic	Fa. Julabo GmbH, Seelbach

2.2. (Verbrauchs)Materialien

0,9%ige Natriumchlorid-Lösung	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
96-Well-Platten, Polystyrol (PS), U-Boden, glasklar	Fa. Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Besamungshüllen	Fa. Müller, Nürnberg
Besamungspistole	Fa. Müller, Nürnberg
BoviFlush Spülmedium	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
BoviHold	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Deckgläschen Menzel-Gläser, [18x18mm]	Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Dimethyl Sulfoxid 99,5 % (DMSO)	Fa. Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Einfrierrampen	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Einmalküvetten aus PS	Fa. neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Einmaluteruskatheter, Mülletten, glasklar, ca. 6 mm Ø, beidseits abgerundet, ca. 51 cm lang	Fa. Müller, Nürnberg
EmSafe Filtersystems	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße 0,5ml, ambra, mit Deckel	Fa. neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße 1,5ml, ambra, mit Deckel	Fa. neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Erlenmeyerkolben, enghalsig	Fa. DWK Life Sciences GmbH, Wertheim
Ethanol reinst, min. 99,5 %	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Faltenbalg Squeeze-Jet™, 30 ml	Fa. Genesis Industries, Inc., Elmwood, USA
Kalibrierkit Guava® easyCheck Kit	Fa. Merck Millipore, Billerica, USA
Kimtech™ Purple Nitrile™ Handschuhe	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz
Laborglasfalschen mit Schraubverschluss	Fa. DWK Life Sciences GmbH, Wertheim
LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit	Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Mandrin für ET-Katheter	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach

Minipailletten Classic mini straws	Fa. IMV Technologies, L`Aigle, Frankreich
Objektträger Thermo Scientific Menzel-Gläser	Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
pH-Indikatorpapier	Fa. Dr. Gerhard Kloz GmbH, Neuhaus
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 10X Solution	Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipettenspitzen (Diamond® D10, DL10, D200, D1000, D10ML)	Fa. Gilson Inc., Middleton, USA
PS-Abdeckplatte, schwarz	Fa. Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Fa. neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Reaktionsgefäße m. Gewinde 1,5 ml, ungraduiert, konisch, ohne Kappe	Fa. neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Reaktionsgefäße mit Gewinde 0,5 ml, ungraduiert, selbststehend, ohne Kappe	Fa. neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Reinigungsflüssigkeit Guava® Instrument Clean Fluid	Fa. Merck Millipore, Billerica, USA
Röhrchen, Polypropylen (PP), 1,3 ml	Fa. Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Silikon ET Katheter CH 16, Luer Lock, 2-Wege, Ballon 5-30 ml, Länge 650 mm	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Silikonverbindung: Silikon-Schlauch, 5 x 1,5 mm, transparent, nach DIN 40628	Fa. MBM Lehrmittel- & Verlagsgesellschaft mbH, St. Goarshausen
Spermaauffangröhrchen, PP, 15 ml	Fa. Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Steridyl CSS One-step, Verdünnerkonzentrat	Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach
Steritop Flaschenaufsatzfilter	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Universalbesamungshüllen	Fa. Müller, Nürnberg
Waschflüssigkeit Easy Clean	Fa. IMV Technologies, L`Aigle, Frankreich
Zentrifugenröhrchen, PP, 15 ml	Fa. Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

2.3. Medikamente

Dinolytic [®] 5 mg/ml ad us. vet.	Fa. Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
CIDR [®] -Vaginalspiralen	Fa. Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
Folltropin [®] 700 IE	Fa. Vetoquinol, S.A., Lure, Frankreich
Pluset [®] 500 IE/500 IE	Fa. Calier, S.A., Barcelona, Spanien
Procamidor [®] 20 mg/ml	Fa. WDT, Garbsen

3. Fluorochrome

SYBR[®] 14

- LIVE/DEAD[®] Sperm Viability Kit
- Bezug: ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Artikelnummer: L7011
- Konzentration: 1 mM
- Aliquotierung: 0,5 µl Aliquots einfrieren

Propidiumiodid (PI)

- LIVE/DEAD[®] Sperm Viability Kit
- Bezug: ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Artikelnummer: L7011
- Konzentration: 2,4 mM
- Aliquotierung: 10 µl und 25 µl Aliquots einfrieren

5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Iodid (JC-1)

- Bezug: Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Artikelnummer: T4069
- Molekulargewicht: 652.23 g/mol
- Aliquotierung: 1 mg JC-1 Pulver mit 200 µl DMSO verdünnen, dann 1 µl Aliquots einfrieren

4. AndroVision® Setup-Einstellungen

Für die CASA wurden die von der Firma Minitüb GmbH festgelegten, tierspezifischen Setup-Einstellungen übernommen. Die Erkennung der Spermien basierte auf dem Spermienkopf und war mit einer Fläche von 15 bis 80 μm^2 sowie einem Formfaktor (Verhältnis Fläche zu Umfang des Spermienkopfes) von 1,3 bis 5 definiert (MINITÜB GMBH, 2018). Die Erfassung der kinetischen Spermienparameter mittels CASA-System ist in Abbildung 20 schematisch dargestellt und die Standardterminologie in Tabelle 11 aufgeführt. Die Klassifizierung der Spermien basierte auf den von der Firma Minitüb GmbH im AndroVision®-System hinterlegten Kriterien und ist in Abbildung 21 dargestellt.

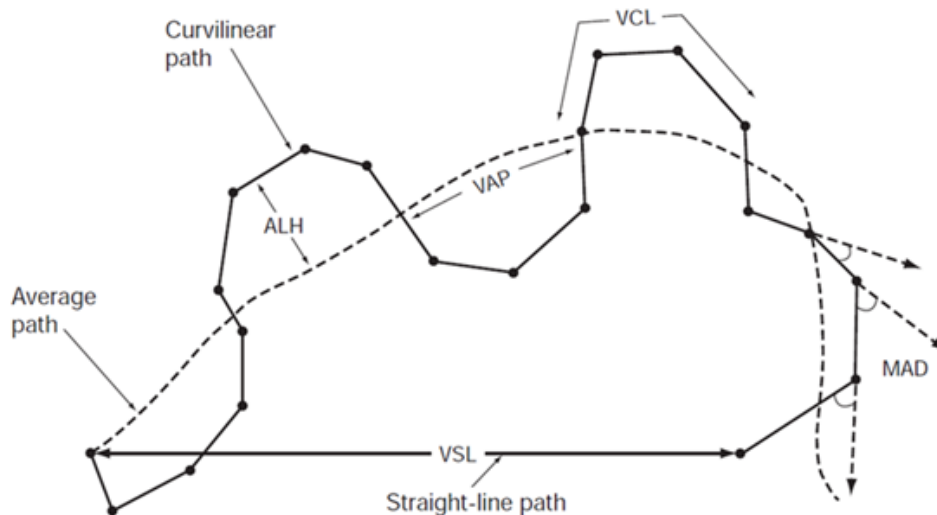


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Spermienmotilitätsanalyse mittels CASA-System (modifiziert nach WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010))

Für jedes Spermium werden, basierend auf den Positionsveränderungen des Spermienkopfes in den einzelnen Aufnahmen, verschiedene kinetische Parameter erhoben, die als Grundlage für die Spermienklassifizierung dienen.

Abk.: VCL: velocity curvilinear line; VSL: velocity straight line; VAP: velocity average path; ALH: amplitude of lateral head displacement; MAD: mean angular displacement

Tabelle 11: Standardterminologie der mittels CASA bestimmten kinetischen Parameter, die der Spermienklassifizierung zu Grunde liegen (modifiziert nach WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010))

Zurückgelegte Strecken [μm]		
DCL	distance curve line	Vom Spermium tatsächlich zurückgelegte Strecke zwischen Anfangs- und Endpunkt der Messung
DSL	distance straight line	Direkte Strecke zwischen Anfangs- und Endpunkt der Messung
DAP	distance average path	Gemittelte Strecke zwischen Anfangs- und Endpunkt der Messung
Geschwindigkeitsparameter der Spermien [$\mu\text{m/s}$]		
VCL	velocity curvilinear line	Geschwindigkeit bezogen auf die tatsächliche Strecke (DCL)
VSL	velocity straight line	Geschwindigkeit bezogen auf die direkte Strecke (DSL)
VAP	velocity average path	Geschwindigkeit bezogen auf die gemittelte Strecke (DAP)
weitere Parameter		
ALH [μm]	amplitude of lateral head displacement	Abweichung der Spermienkopfposition von der gemittelten Strecke \rightarrow seitlicher Spermienkopfausschlag
BCF [Hz]	beat cross frequency	Anzahl der Kreuzungspunkte zwischen tatsächlicher und gemittelter Strecke
HAC [rad] \cong MAD [$^\circ$]	head activity change \cong mean angular displacement	Zeitlich gemittelter Richtungswechsel des Spermienkopfes entlang der gemittelten Strecke
LIN = VSL/VCL	linearity	Linearität der tatsächlichen Strecke
WOB = VAP/VCL	wobble	Abweichung der tatsächlichen von der gemittelten Strecke
STR = VSL/VAP	straightness	Linearität der gemittelten Strecke

Abk.: DCL: distance curve line; DSL: distance straight line; DAP: distance average path; VCL: velocity curvilinear line; VSL: velocity straight line; VAP: velocity average path; ALH: amplitude of lateral head displacement, BCF: beat cross frequency; HAC: head activity change; MAD: mean angular displacement; LIN: linearity; WOB: wobble; STR: straightness; μm : Mikrometer; $\mu\text{m/sec}$: Mikrometer/Sekunde; Hz: Hertz; rad: Radiant; $^\circ$: Grad

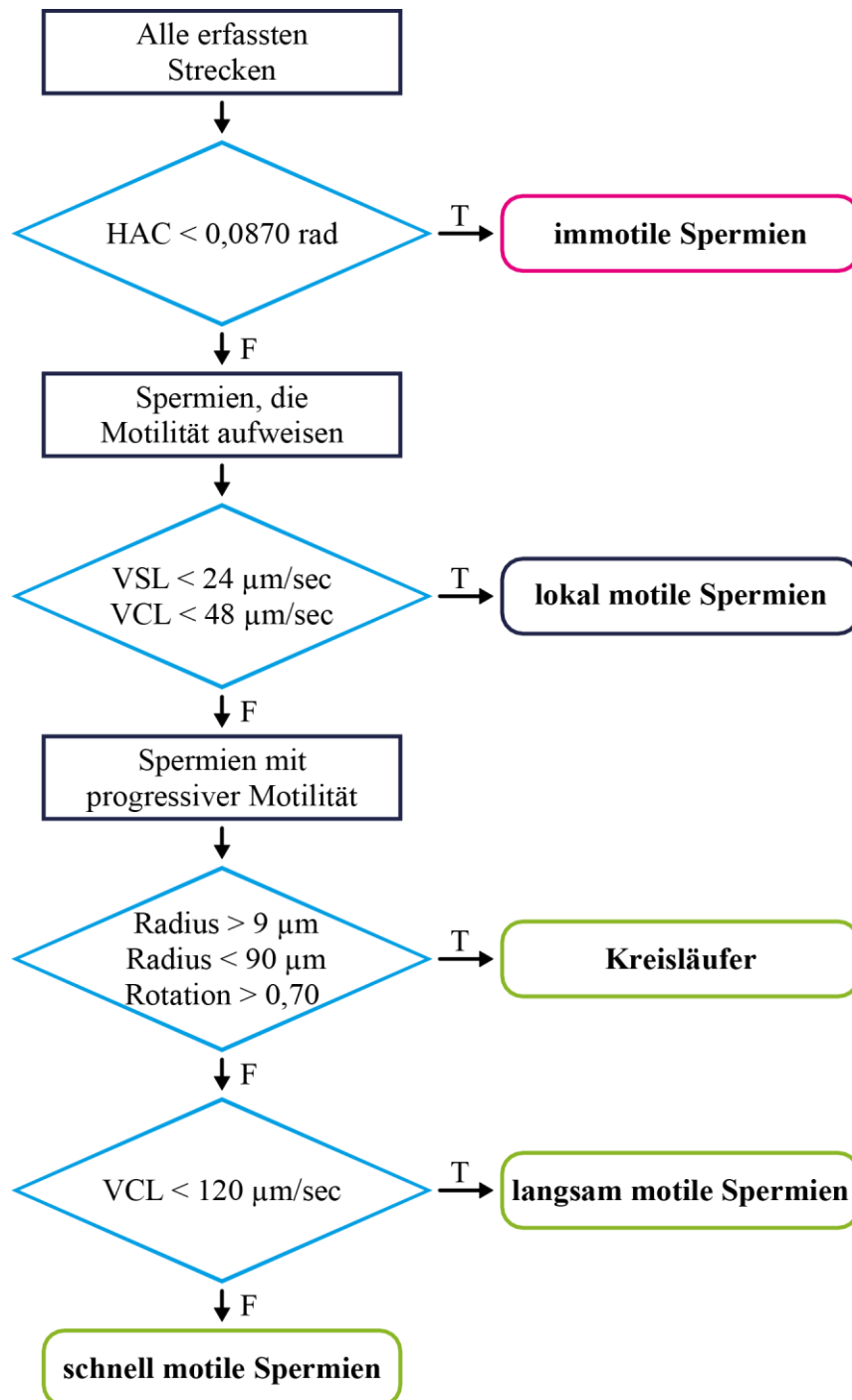


Abbildung 21: Flussdiagramm zur Spermienklassifizierung für die Spezies *Bulle* (modifiziert nach MINITÜB GMBH (2018))

Basierend auf dem Flussdiagramm werden die Spermien bei der Motilitätsanalyse anhand ihrer kinetischen Parameter durch die Software des AndroVision®-Systems den Spermienklassen zugeordnet.

Abk.: HAC: head activity change; VSL: velocity straight line; VCL: velocity curvilinear line; rad: Radiant; µm: Mikrometer; µm/sec: Mikrometer/Sekunde; T: trifft zu; F: trifft nicht zu

5. Mindestanforderungen an native Bullenejakulate

Tabelle 12: Modifizierte Zusammenfassung der Mindestanforderungen an native Bullenejakulate nach ADR-Empfehlung 8.2 (ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2006a)

Parameter	Mindestanforderungen nach ADR-Empfehlung
Aussehen <ul style="list-style-type: none"> • Farbe • Konsistenz 	elfenbeinfarben bis weiß, weiß/gelblich rahmig bis milchig
Beimengungen	keine
Ejakulatvolumen <ul style="list-style-type: none"> • Bulle ≤ 2 Jahre • Bulle > 2 Jahre 	2 ml 4 ml
Spermiendichte	600.000 Spermien/ μ l
Massenbewegung	ungestört [++]
Vorwärtsbeweglichkeit	70 %
Morphologisch abweichende Spermien <ul style="list-style-type: none"> • gesamt → Kopfveränderungen → Kopfkappenveränderungen 	maximal 20 % → maximal 5 % → maximale 10 %

Abk.: ml: Milliliter; μ l: Mikroliter; ++: gute/ungestörte Massenbewegung

6. Stationspezifische Definition von Erst-, Zweit- und Drittbesamungen

Tabelle 13: Stationspezifische Definition der Begriffe Erst-, Zweit- und Drittbesamungen (modifiziert nach BAYERN-GENETIK GMBH (2021))

Erstbesamung	<ul style="list-style-type: none"> • jede erste Besamung bei Rindern und nach dem Kalben • jede erste Besamung nach ET • jede Besamung im Rahmen des ET • jede vierte Besamung (Doppelbesamungen werden nicht gezählt) • jede erste Besamung nach Abort • jede Nachbesamung (=Zweitbesamung) mit mehr als 120 Tagen Abstand zur Erstbesamung • jede zweite Nachbesamung (=Drittbesamung) mit mehr als 180 Tagen Abstand zur Erstbesamung
Zweitbesamung	<ul style="list-style-type: none"> • erste Nachbesamung innerhalb von 120 Tagen nach Erstbesamung
Drittbesamung	<ul style="list-style-type: none"> • zweite Nachbesamung innerhalb von 180 Tagen nach Erstbesamung

8. Ergebnistabellen

8.1. Ergebnisse der Laboruntersuchungen

Tabelle 15: Modellierte Mittelwerte von Prozenten und Konfidenzintervalle für die Laboruntersuchungen

Parameter	Medium	modellierte Mittelwerte	Unteres 95 %-KI	Oberes 95 %-KI
prog. Sp. Zeitpunkt 1	EBB	63,5 %	57,1 %	70,0 %
	mFert-TALP	62,4 %	56,0 %	68,9 %
	BIVF	61,8 %	55,3 %	68,3 %
	BSPREP	59,2 %	52,8 %	65,7 %
prog. Sp. Zeitpunkt 2	EBB	57,8 %	51,4 %	64,3 %
	mFert-TALP	53,2 %	46,8 %	59,7 %
	BIVF	51,8 %	45,3 %	58,2 %
	BSPREP	41,0 %	34,6 %	47,5 %
PMI	EBB	41,7 %	37,8 %	45,6 %
	mFert-TALP	41,1 %	37,2 %	45,0 %
	BIVF	41,3 %	37,5 %	45,2 %
	BSPREP	40,3 %	36,5 %	44,2 %
hMMP	EBB	50,6 %	47,8 %	53,3 %
	mFert-TALP	45,0 %	42,2 %	47,7 %
	BIVF	45,2 %	42,5 %	47,9 %
	BSPREP	52,1 %	49,4 %	54,8 %

Abk.: EBB: EasyBuffer B; mFert-TALP: modifiziertes Fert-TALP, BIVF: BO-IVFTM; BSPREP: BO-SemenPrepTM; KI: Konfidenzintervall; prog. SP.: Anteil progressiv motiler Spermien; Zeitpunkt 1: nach 10 Minuten Inkubation; Zeitpunkt 2: nach 70 Minuten Inkubation; PMI: Plasmamembranintegrität (Anteil plasmamembranintakter Spermien); hMMP: hohes Mitochondrienmembranpotential (Anteil Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential)

8.2. Ergebnisse von routinemäßiger KB und ET

Tabelle 16: Modellierte Wahrscheinlichkeiten und Konfidenzintervalle der Konzeptionsraten gesamt und auf Bullenebene unter Berücksichtigung der Besamungsmethode

Parameter	Besamungsbulle	modellierte Wahrscheinlichkeit	Unteres 95 %-KI	Oberes 95 %-KI
KR HVB	gesamt	53,0 %	43,3 %	62,5 %
	Bulle I	51,0 %	33,3 %	68,5 %
	Bulle II	59,3 %	38,5 %	77,3 %
	Bulle III	53,9 %	33,6 %	73,0 %
	Bulle IV	45,6 %	26,7 %	66,0 %
	Bulle V	55,4 %	34,9 %	74,2 %
KR Standard	gesamt	56,0 %	46,2 %	65,3 %
	Bulle I	54,6 %	35,2 %	72,7 %
	Bulle II	60,2 %	38,7 %	78,3 %
	Bulle III	40,9 %	22,5 %	62,3 %
	Bulle IV	54,7 %	33,8 %	74,0 %
	Bulle V	69,4 %	47,3 %	85,1 %

Abk.: KI: Konfidenzintervall; KR: Konzeptionsrate; HVB: high-volume-Besamung; Standard: Standardbesamung

Tabelle 17: Modellierte Wahrscheinlichkeiten und Konfidenzintervalle der Konzeptionsraten unter Berücksichtigung der Anzahl vorangegangener Besamungen für die beiden Besamungsmethoden

Parameter	Anzahl vorangegangener Besamungen	modellierte Wahrscheinlichkeit	Unteres 95 %-KI	Oberes 95 %-KI
KR HVB	0	52,0 %	40,4 %	63,4 %
	1	63,2 %	44,1 %	78,9 %
	>1	34,5 %	13,9 %	63,1 %
KR Standard	0	53,6 %	41,3 %	65,5 %
	1	59,4 %	39,0 %	77,0 %
	> 1	59,7 %	37,2 %	78,8 %

Abk.: KI: Konfidenzintervall; KR: Konzeptionsrate; HVB: high-volume-Besamung; Standard: Standardbesamung; 0: keine vorangegangene Besamung; 1: eine vorangegangene Besamung; > 1: mehr als eine vorangegangene Besamung

Tabelle 18: Modellierte Wahrscheinlichkeiten und Konfidenzintervalle der Konzeptionsraten in Bezug auf den Paritätsstatus für die beiden Besamungsmethoden

Parameter	Paritätsstatus	modellierte Wahrscheinlichkeit	Unteres 95 %-KI	Oberes 95 %-KI
KR HVB	Kalbin	47,4 %	29,2 %	66,3 %
	Kuh	54,8 %	43,8 %	65,3 %
KR Standard	Kalbin	60,8 %	44,3 %	75,1 %
	Kuh	53,3 %	41,4 %	64,8 %

Abk.: KI: Konfidenzintervall; KR: Konzeptionsrate; HVB: high-volume-Besamung; Standard: Standardbesamung

Tabelle 19: Einfluss der Besamungsmethode auf das Ergebnis der Embryonengewinnung

Parameter	Besamungsmethode	Anzahl Embryonen			
		25 %-Quartil	Median	75 %-Quartil	Mittelwert
Embryonen gesamt	HVB (n = 31)	11,5	16,0	26,0	18,2
	Standard (n = 21)	10,0	14,0	24,0	18,9
Embryonen tauglich	HVB (n = 31)	3,5	8,0	15,5	10,3
	Standard (n = 21)	7,0	10,0	14,0	11,9
Embryonen unbefruchtet	HVB (n = 31)	1,5	5,0	10,5	6,6
	Standard (n = 21)	0,0	3,0	7,0	5,9
Embryonen degeneriert	HVB (n = 31)	0,0	0,0	2,0	1,3
	Standard (n = 21)	0,0	0,0	1,0	1,1

Abk.: HVB: high-volume-Besamung; Standard: Standardbesamung; n: Anzahl an Spülungen, bei denen die Spender mit der jeweiligen Besamungsmethode besamt wurden.

X. DANKSAGUNG

DANKE an alle, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe bedanken. Ich danke Ihnen für die kritischen Durchsichten der Arbeit und Ihre stets freundliche Unterstützung. Vor allem aber danke ich Ihnen, dass Sie sich als Doktorvater für diese externe Arbeit bereiterklärt haben. Das ist keine Selbstverständlichkeit und ich weiß das sehr zu schätzen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Christiane Otdorff. Auch wenn es leider zu Beginn nicht nach Plan verlaufen ist, hast du mich nie aufgegeben und mich weiterhin unterstützt. Dafür und für deine Ideen und Korrekturen danke ich dir sehr.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Yury Zablotki für seine geduldige und professionelle Hilfe bei der statistischen Auswertung. Deine Unterstützung und dein Statistik-Blog haben sehr zur Fertigstellung meiner Arbeit beigetragen.

Der Bayern-Genetik GmbH danke ich für die Zurverfügungstellung des Themas und die finanzielle Unterstützung bei der praktischen Umsetzung. Ein besonderer Dank ist an dieser Stelle Herrn Dr. Thomas Grupp, ehemaliger Geschäftsführer der Bayern-Genetik GmbH, auszusprechen, der bei einer Konferenz auf die high-volume-Besamungsmethode aufmerksam wurde und den Kontakt zu Dr. Brad Stroud hergestellt hat. Herrn Ing. Günter Hutterer, Leiter der EDV-Abteilung der Bayern-Genetik GmbH danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der erfassten Besamungsdaten und Dipl.-Ing. Christine Adler für die Einarbeitung im Labor und die Revisionen. Dr. Simone Jung danke ich für ihre Ideen und Hilfestellungen während der Dissertation. Den beiden ET-Technikern Christian Prantler und Udo Heller danke ich für ihre gewissenhafte Arbeit im Rahmen der Embryonengewinnungen.

Ein herzlicher Dank gebührt meinem Mentor, Herrn Dr. Jakob Scherzer, dem tierärztlichen Leiter der Besamungsstation Bayern-Genetik GmbH. Als mein direkter Ansprechpartner stand er mir mit Rat und Tat zur Seite und ich konnte immer auf seine Unterstützung zählen. Er war außerdem für die praktische Anwendung der high-volume-Besamung im ET-Bereich verantwortlich. Danke für deine Ideen und vor allem die schnellen Korrekturen.

Ein außerordentlich großes Dankeschön gilt Dr. Myriam Reichenbach. Durch ihre langjährige Arbeit am Lehrstuhl für Tierzucht und Genetik der LMU München in Badersfeld und ihre Erfahrung, was das wissenschaftliche Arbeiten und Schreiben betrifft, war sie sozusagen mein Ass im Ärmel. Danke für die Hilfe bei der Herstellung der Medien, fürs Korrekturlesen und vor allem danke für deinen guten Zuspruch.

Beim Besamungstechniker Willi Wendlinger möchte ich mich für die Durchführung der praktischen Besamungen recht herzlich bedanken. Danke für dein gewissenhaftes Arbeiten und die viele Zeit, die du dir für die Durchführung der Besamungen, die Erfassung der zusätzlichen Daten und die Besprechung der Ergebnisse genommen hast. Danke auch den Landwirten für ihre Mithilfe.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Dr. Anika Helfrich und Dr. Josef Niedernhuber für die unzähligen Hilfestellungen rund um das Thema Dissertation bedanken. Liebe Anika und lieber Josef, ich danke euch für eure akribischen Korrektur- und Formatierungsarbeiten, die viele konstruktive Kritik und die aufmunternden Worte. Aber vor allem danke ich euch für eure Freundschaft.

Danke an all meine Freunde und nahestehenden Verwandten, die in letzter Zeit leider oft viel zu kurz gekommen sind. Ich freue mich, wenn wir in Zukunft wieder mehr Zeit für gemeinsame Abenteuer haben.

Und zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, der ich diese Arbeit widme. Danke, dass ihr immer hinter mir gestanden seid und mir meinen Rücken gestärkt habt. Liebe Mama, lieber Papa: Danke für eure bedingungslose Liebe und die unendliche Unterstützung, die ich auf meinem bisherigen Lebensweg von euch erfahren durfte. Und liebe Vroni: Du bist nicht nur meine Schwester, sondern auch meine beste Freundin. Danke für deine Hilfe mit den Abbildungen. Ich bin stolz auf dich. Schön, dass es euch gibt!