

**Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Flüssigkonservierung von Bullensperma:  
Status quo und Ergebnisse aus einer randomisierten  
klinischen Feldstudie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Veterinärmedizin  
- Doctor medicinae veterinariae -  
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von  
Marie Wiebke  
Berlin

Hannover 2023

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Árpád Csaba Bajcsy  
Klinik für Rinder  
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Prof. Dr. Martin Schulze  
Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönau e.V.

1. Gutachter: Prof. Dr. Árpád Csaba Bajcsy  
Prof. Dr. Martin Schulze

2. Gutachterin: Prof. Dr. Dagmar Waberski

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2023

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in folgenden internationalen Fachzeitschriften mit Gutachtersystem veröffentlicht:**

1. WIEBKE, M., HENSEL, B., NITSCHKE-MELKUS, JUNG, M., SCHULZE, M. (2021):  
**Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion**  
Animal Reproduction Science 2021 (246) 106822
2. WIEBKE, M., PIEPER, L., GÜRLER, H., JANOWITZ, U., JUNG, M., SCHULZE, M. (2023):  
**Effect of using liquid semen on fertility in German Holstein Friesian dairy cattle: a randomized controlled clinical trial.**  
Theriogenology 2023 (199) 50-56

**Weiterhin wurden Teilergebnisse im Rahmen folgender Konferenz vorgestellt:**

WIEBKE, M., PIEPER, L., JANOWITZ, U., SCHULZE, M., JUNG, M. (2021):  
**Use of liquid semen leads to higher pregnancy rates in cattle with delayed ovulations.**  
54th Annual Conference Physiology and Pathology of Reproduction and simultaneously 46th Joint Congress of Veterinary and Human Medicine, Zurich, 10th to 12th of February 2021, Reproduction in Domestic Animals 56 (Suppl. 1)

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>II</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Publikation 1</b>	<b>6</b>
2.1. Abstract	6
2.2. CRediT authorship statement	7
<b>3. Publikation 2</b>	<b>8</b>
3.1. Abstract	8
3.2. CRediT authorship statement	9
<b>4. Übergreifende Diskussion</b>	<b>10</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>18</b>
<b>6. Summary</b>	<b>20</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>22</b>

## **I. Abkürzungsverzeichnis**

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>AI</b>	Artificial insemination
<b>d</b>	Tage
<b>et al.</b>	et alii
<b>FK</b>	Flüssigkonservierung
<b>FS</b>	Frozen semen
<b>h</b>	Stunden
<b>KB</b>	Künstliche Besamung
<b>LS</b>	Liquid semen
<b>min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Milliliter
<b>n</b>	Probandenzahl (numerus)
<b>P</b>	Signifikanzwert
<b>P/AI</b>	Pregnancy per AI
<b>pH</b>	Potentia hydrogenii
<b>TG</b>	Tiefgefrierkonservierung



## 1. Einleitung

Die künstliche Besamung (KB) ist eine altbewährte Technologie, deren Entwicklung im 18. Jahrhundert begann. Durch ihren Einsatz konnte die Versorgung der schnellwachsenden Bevölkerung von Industriestaaten mit Lebensmitteln tierischen Ursprungs sichergestellt und gleichzeitig die Ausbreitung venerisch übertragbarer Tierseuchen eingedämmt werden. In der Rinderzucht findet die KB seit dem 20. Jahrhundert Anwendung. Die KB ist als grundlegende Technik nicht aus der Landwirtschaft wegzudenken und trägt auch heute noch bedeutend zur Versorgung der Weltbevölkerung bei (VISHWANATH, 2003). In Deutschland wurden 2020 ca. 7,2 Millionen KB an Rindern durchgeführt, rund 6,1 Millionen davon an Milch- und Zweinutzungsrindern und davon wiederum 3,7 Millionen an Holstein-Kühen ("Rinder- und Schweineproduktion in Deutschland 2020", Bundesverband Rind und Schwein e.V., 2021). Die in Deutschland vorherrschende Konservierungsmethode für Bullensperma ist die Tiefgefrierkonservierung (TG). Daneben wird in geringem Maße auch die Flüssigkonservierung (FK) angewendet. So setzte die Rinderproduktion Berlin-Brandenburg GmbH in den vergangenen Jahren bei 4 - 8 % der Besamungen FK-Sperma ein (Dr. J.-H. Osmer, Geschäftsführer RBB GmbH; Mail vom 08.11.2022 an Marie Wiebke). Ein ähnliches Verhältnis von FK und TG findet man weltweit vor. THIBIER & WAGNER (2002) erfassten mittels Umfrage die weltweite Produktion von Bullensperma im Jahre 1998 und konnten so darstellen, dass 95 % der 206 Millionen Besamungsportionen durch TG hergestellt wurden. Nur die Spermaproduktion in Neuseeland unterscheidet sich deutlich vom Rest der Welt. Die Besamungsindustrie in Neuseeland muss während der saisonalen Zuchtsaison der Milchkühe extreme Nachfragepeaks bewältigen. Der hohe Bedarf an Besamungsportionen von Elite-Bullen kann während dieser kurzen Phase nur durch die Produktion flüssigkonservierten Spermas gedeckt werden.

Die Verwendung von FK und TG hat jeweils Vor- und Nachteile. Um diese zu verstehen, muss das Grundkonzept der Konservierung von Ejakulaten bekannt sein. Das Ziel der Konservierung von Spermien ist es, deren Befruchtungsfähigkeit über einen möglichst langen Zeitraum zu erhalten. Unabhängig von der Konservierungsmethode müssen dazu verschiedene Maßnahmen erfolgen. An erster Stelle steht die Reduzierung der Stoffwechselrate der Spermien. Dies wird hauptsächlich durch eine deutli-

che Temperaturabsenkung erreicht und kann durch Verdrängung bzw. Ausschluss von Sauerstoff unterstützt werden. Zum Schutz der Spermienmembranen vor Kälteeinflüssen können Substanzen wie z.B. Hühnereigelb und Sojalecithine eingesetzt werden (DE LEEUW et al., 1993; SINGH et al., 2012). Doch auch bei stark gesenkter Stoffwechselrate kommt es zur Bildung von Metaboliten, welche im Fall der reaktiven Sauerstoffspezies zur Beeinträchtigung der Spermienviabilität führen können. Diese Metaboliten gilt es mit Hilfe weiterer Zusatzstoffe zu inhibieren. Gleichzeitig muss eine Versorgung der Spermien über einfache Energiequellen, zumeist Monosaccharide, erfolgen. Da eine sterile Gewinnung von Ejakulaten in der Routine nicht gewährleistet werden kann (THIBIER & GUERIN, 2000), muss auch das Keimwachstum im konservierten Sperma durch Antibiotika gehemmt werden. Die Zugabe von Antibiotika ist außerdem gesetzlich geregelt (Delegierte Verordnung (EU) 2020/686 der Kommission, geändert durch (EU) 2021/880). Die genannten Komponenten sind in einer, für die Spermien physiologischen, Pufferlösung enthalten. Die Verdünnung des frisch gewonnenen Ejakulates sollte so zeitig wie möglich nach der Gewinnung und vor allem isotherm erfolgen.

Die Verdünnung erfolgt entsprechend eines zuvor berechneten Verdünnungsgrades, dessen Dimension sich zwischen FK und TG grundlegend unterscheidet. Für TG liegt die Spermiengesamtzahl pro Besamungsportion üblicherweise zwischen 15 - 20 Millionen. In Neuseeland führen FK-Besamungsportionen mit lediglich 1 - 2 Millionen Spermien zu zufriedenstellenden Ergebnissen (YANG et al., 2018). Die FK ermöglicht also eine deutlich höhere Ausbeute pro Ejakulat und hat darin auch einen ihrer größten Vorteile. Der Verdünnung folgt im Falle der TG eine Äquilibrationsphase über 4 - 72 h (MURPHY et al., 2018a). Diese Phase wird unter anderem dazu benötigt, dass es zur Interaktion zwischen Lecithinen aus Hühnereigelb oder pflanzlichen Alternativen mit der Spermienmembran kommen kann. Auch für FK-Sperma ist bekannt, dass die Non-Return-Raten höher sind, wenn das Sperma erst am Folgetag (24 - 48 h nach Produktion) und nicht bereits am Produktionstag (6 - 18 h nach Produktion) eingesetzt wird (SHANNON, 1968). Der Äquilibrationsphase folgt bei der TG der zweistufige Tiefgefrierprozess. In der ersten Stufe wird das in Pailletten abgefüllte Sperma von 4 °C auf -140 °C abgekühlt. In der zweiten Stufe werden die Pailletten direkt in flüssigen Stickstoff verbracht (CURRY, 2007), welcher eine Temperatur von -196 °C hat. Auch die Lagerung von TG-Sperma hat bei entsprechend tiefen



Temperaturen zu erfolgen und bringt hohe Kosten und einen aufwändigen Arbeitsschutz mit sich. FK-Sperma wird je nach verwendetem Verdüner bei 5 °C oder „Umgebungstemperatur“ (10 - 20 °C) gelagert. Auch wenn Lagerung und Handhabung von FK-Sperma deutlich einfacher und weniger fehleranfällig sind, ist die benötigte Logistik doch anspruchsvoll. Weil nach den ersten Tagen der Lagerung sowohl die Spermienmotilität (MURPHY et al., 2017) als auch die Befruchtungskapazität (VISHWANATH & SHANNON, 1997) deutlich abnimmt, wird FK-Sperma in der Regel nicht für mehr als 3 d nach der Produktion eingesetzt und muss dementsprechend schnell in den Umlauf gebracht werden. Das bedeutet auch, dass die Einhaltung einer 30-tägigen Quarantäne, und somit ein weltweiter Handel, ausgeschlossen sind. Es wird postuliert, dass FK-Sperma aufgrund der ausbleibenden Gefrierschäden seine Viabilität über einen längeren Zeitraum nach der KB behält als TG-Sperma (CURRY, 2000). In Feldstudien zeigten FK und TG bislang immerhin ebenbürtige Resultate (BUCHER et al., 2009; MURPHY et al., 2016).

Im Folgenden werden zwei Aspekte der Rinderzucht vorgestellt, welche den Einsatz von FK-Sperma rechtfertigen könnten.

Die Einführung der genomischen Zuchtwertschätzung (MEUWISSEN et al., 2001) beschleunigte den Zuchtfortschritt bei Milchrindern enorm und führte gleichzeitig zu einer bedeutenden Verkürzung des Generationsintervalls (GODDARD & HAYES, 2007). Für Jungbullen mit hohem genetischen Wert besteht stets eine hohe Nachfrage. Dies führt zu einem immer früheren Einsatz der Bullen auf den Besamungsbullenstationen. Doch Spermienanzahl und -viabilität nehmen erst mit der Zeit und einem steigenden Ejakulatsvolumen zu (BRITO et al., 2002). Durch den frühzeitigen Beginn bleiben Qualität und Quantität der Produktion von Bullen, welche jünger als 12 Monate sind, meist hinter der Nachfrage bzw. den Erwartungen zurück (MURPHY et al., 2018c). Mit Hilfe der FK könnte sich zum einen die Verarbeitung der geringvolumigen Ejakulate durch eine höhere Ausbeute amortisieren und zum anderen kann durch die Schonung der Spermien aufgrund des ausbleibenden Tiefgefrierprozesses der Anteil einsatztauglicher Ejakulate erhöht werden.

Der zweite Aspekt betrifft die weibliche Seite der Rinderzucht. Während der letzten Jahrzehnte wurde der Zuchtfortschritt durch eine zunehmend schlechte Reproduktionsleistung in den Milchviehherden eingeschränkt. Eine schlechte Reproduktionslei-

tion ist der häufigste Grund für Abgänge bei Milchkühen und stellt die Milchwirtschaft vor große Herausforderungen (DALLAGO et al., 2021; ROYAL et al., 2000).

Entscheidend für den Erfolg einer KB ist unter anderem der richtige Zeitpunkt der Durchführung. Dieser kann durch verschiedene Brunstbeobachtungsmethoden ermittelt werden (ROELOFS et al., 2010). Heutzutage wird auf den meisten Milchviehbetrieben nur noch einmal täglich besamt. Das steht im Widerspruch zur altbekannten Morgens-Abends-Regel (im Englischen „*a.m.-p.m.-rule*“). Der Morgens-Abends-Regel zufolge sollten Brunstbeobachtungen und Besamungen zu zwei Zeitpunkten am Tag stattfinden (TRIMBERGER, 1944; TRIMBERGER & DAVIS, 1943). So werden Kühe, welche abends erstmalig in Brunst gesehen wurden, am folgenden Morgen und Kühe, welche morgens erstmalig in Brunst gesehen wurden, am folgenden Abend besamt. Durch das Fehlen des zweiten Besamungszeitpunktes kann es nun passieren, dass Tiere vorsorglich früher besamt werden und das Intervall von KB bis zur Ovulation sich empfindlich verlängert. Ist das Intervall von KB bis zur Ovulation größer als 24 h ist, kann der Fall eintreten, dass beim Eintreffen der Oozyte nicht mehr ausreichend fertile Spermien im Eileiter vorhanden sind (CURRY, 2000) und die Befruchtung der Oozyte ausbleibt. Da FK-Sperma im Vergleich mit TG-Sperma nach der KB über eine längere Zeit fertil bleibt (VISHWANATH & SHANNON, 2000), würde sich eine zweite Besamung eventuell erübrigen. Abgesehen von der organisatorischen Problematik der KB auf den Betrieben, gibt es noch einen Aspekt, auf welchen Landwirte, Tierärzte und Besamungsbeauftragte keinen Einfluss nehmen können. Das Intervall zwischen Brunstbeginn und Ovulation ist tierindividuell und kann beachtlich variieren. Dieser Umstand wurde bereits durch mehrere Studien dargestellt, welche beispielsweise durchschnittliche Intervalle von  $27,6 \pm 5,4$  h (WALKER et al., 1996),  $28,7 \pm 8,1$  h (VALENZA et al., 2012) und  $30,0 \pm 5,1$  h (ROELOFS et al., 2005) nachweisen konnten. Für den zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Ovulationen, welche 24 h nach KB noch nicht erfolgt waren, als „*verzögerte Ovulationen*“ definiert. In einer Feldstudie traten solche verzögerten Ovulationen mit einer Prävalenz von 46 % auf (BRAUN & SARMENTO, 2004). Eine derart hohe Prävalenz verdeutlicht die Relevanz dieses Phänomens als Beeinträchtigung der Herdenfruchtbarkeit.

Wie bereits erwähnt, wurden FK- und TG-Sperma schon mehrfach in Feldstudien gegenübergestellt (BORCHARDT et al., 2018; BUCHER et al., 2009; MURPHY et al., 2016; MURPHY et al., 2018b; MURPHY et al., 2017). Jedoch ist es schwierig, deren Ergebnisse zu vergleichen, da Rahmenbedingungen wie Verdünner, Spermiengeamtzahl pro Paillette, Lagertemperatur, Lagerzeit, Brunstinduktion (spontane Brunst verglichen mit unterschiedlichen Brunstsynchronisationsprogrammen) und auch die Rasse der Tiere sich stark unterscheiden. Dennoch ist es offensichtlich, dass FK-Sperma bei ungleich höherem Verdünnungsgrad die gleiche Befruchtungskapazität wie TG-Sperma aufweist und darüber hinaus ein Potenzial für eine höhere Spermienviabilität über die Zeit birgt.

Die vorliegende Dissertation hat zum Ziel, den Status quo der Flüssigkonservierung von Bullensperma zu erfassen, diesem die Situation bei anderen landwirtschaftlichen Nutztieren (Eber und Hengst) gegenüberzustellen sowie aktuelle Entwicklungen und Fragestellungen darzulegen. Außerdem soll in einer aufwändigen Feldstudie eruiert werden, mit welcher Prävalenz verzögerte Ovulationen in Holstein-Rinder-Beständen auftreten und ob der Einsatz von FK-Sperma bei Kühen mit verzögerter Ovulation einen Effekt zeigt. Hierfür haben wir uns zu einer randomisierten klinischen Studie mit einem starken Split-Sample-Design entschieden. Die geteilten Ejakulate wurden sowohl zu FK- als auch zu TG-Sperma verarbeitet und zeitgleich im Feld eingesetzt. Die Versuchstiere wurden engmaschig verfolgt. Zur statistischen Auswertung wird darüber hinaus, anstelle der leichter verfügbaren Non-Return-Rate, die Konzeptionsrate (prozentualer Anteil tragender Kühe 32 ± 1 d nach KB an besamten Kühen) verwendet.

## 2. Publikation 1

### **„Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion.“**

Publiziert in *Animal Reproduction Science* 2021 (246) 106822  
[doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106822](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106822)

M. Wiebke, B. Hensel, E. Nitsche-Melkus, M. Jung, M. Schulze\*

*Institute for Reproduction of Farm Animals Schönow, Bernauer Allee 10, D-16321, Bernau, Germany*

\*Corresponding author. E-Mail address: [m.schulze@ifn-schoenow.de](mailto:m.schulze@ifn-schoenow.de) (M. Schulze)

#### 2.1. Abstract

This review is part of the Festschrift in honor of Dr. Duane Garner and provides an overview of current techniques for cooled storage of semen from livestock animals. The first part describes the current state of the art of liquid semen preservation in boars, bulls and stallions, including the diluents, use of additives, processing, temperature, and cooling of semen. The species-specific physiology and varying extents of cold shock sensitivity are taken into consideration. In addition, factors influencing the quality of cooled-stored semen are discussed. Methods, trends, and the most

recent advances for improving sperm quality during cold-temperature storage are highlighted and their respective advantages are contrasted. There has been much progress in recent years regarding cold-temperature storage of boar sperm and there is great potential for a large-scale use to replace the current 17 °C temperature storage regime and the associated use of antibiotics in the future. For stallion sperm, there is an opposite trend away from previous low-temperature storage towards storage at higher temperatures to increase sperm viability and longevity. In bulls, liquid storage of sperm is mostly used in the seasonal dairy production systems of New Zealand and Ireland, but with further research focussing on shelf-life elongation of liquid preserved sperm, there is potential for an application in breeding programs worldwide.

## 2.2. Author contribution

**MW, BH, ENM, MJ** and **MS** wrote the initial draft of this invited review article. **MS** critically revised the draft. All authors worked together on final revisions.

### 3. Publikation 2

#### **“Effect of using liquid semen on fertility in German Holstein Friesian dairy cattle: a randomized controlled clinical trial.”**

Publiziert in *Theriogenology* 2023 (199) 50-56  
doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.01.012

Marie Wiebke<sup>1,2\*</sup>, Laura Pieper<sup>1</sup>, Hakan Gürler<sup>1</sup>, Ulrich Janowitz<sup>2</sup>, Markus Jung<sup>1</sup>, Martin Schulze<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute for Reproduction of Farm Animals Schönau, Bernauer Allee 10, 16321 Bernau, Germany*

<sup>2</sup>*Rinder-Union West eG, Schiffahrter Damm 235 A, 48147 Münster, Germany*

\*Corresponding author. E-Mail address: m.wiebke@ifn-schoenow.de (M. Wiebke)

#### 3.1. Abstract

Low fertility rates in lactating dairy cows as well as restricted availability of semen doses of young bulls with high genetic merit are two major problems in the reproduction of dairy cows. By using liquid semen (LS), the number of doses per ejaculate can be increased. One of the challenges of optimizing the reproductive performance of dairy cows is the phenomenon of variable estrus lengths. The objective of this study was to determine whether the use of LS affects pregnancy outcome of dairy cows with delayed ovulation, when compared with frozen semen (FS). A randomized controlled clinical trial was implemented. In a split-sample procedure, 131 ejaculates

were processed into LS (Caprogen, LIC, New Zealand) and FS (BioXcell, IMV, France). Both semen types of each ejaculate were inseminated under the same field conditions to cows showing natural or induced heat. Cows and semen type were allocated according to the last digit of the cow's identification number (even = frozen semen, odd = liquid semen). Inseminations ( $n = 667$ ) were conducted after localization of the pre-ovulatory follicle. Determination of ovulation was performed 24 h post AI per transrectal ultrasonographic examination. Ovulations were classified as delayed when the pre-ovulatory follicle was still present at ovulation control. The prevalence of delayed ovulations was 25.2 %. Data of 667 inseminations were analyzed with a generalized linear mixed model including semen type ( $P = 0.016$ ), parity ( $P = 0.014$ ), backfat thickness ( $P = 0.006$ ), estrus induction ( $P = 0.010$ ), ovulation ( $P = 0.265$ ) and the interaction term 'semen type by ovulation' ( $P = 0.094$ ). Overall, a higher pregnancy per AI (P/AI) of LS (45.4 %) than P/AI of FS (33.7 %) was found. In cases of delayed ovulations, use of LS resulted in higher P/AI (46.8 %) compared with FS (27.7 %;  $P = 0.017$ ). We concluded that the fertilizing capacity of LS in prolonged intervals from AI to ovulation might be greater when compared with FS and could be an efficient tool to improve fertility of lactating dairy cows with delayed ovulations.

### 3.2. CrediT authorship contribution statement

**Marie Wiebke:** Methodology, Validation, Formal Analysis, Investigation, Data curation, Writing – Original Draft, Writing – Review & Editing, Visualization

**Laura Pieper:** Validation, Formal analysis, Writing – Review & Editing

**Hakan Gürler:** Conceptualization, Methodology

**Ulrich Janowitz:** Resources, Supervision

**Markus Jung:** Conceptualization, Project administration

**Martin Schulze:** Writing – Review & Editing, Project administration, Supervision

#### 4. Übergreifende Diskussion

Mit einem Anteil von 5 % an allen 1996 aus Bullenejakulaten hergestellten Besamungsportionen weltweit (THIBIER & WAGNER, 2002), war die Bedeutung von flüssigkonserviertem Sperma in der Rinderzucht nicht sehr groß und findet auch heute im großen Maßstab nur in Neuseeland und in kleinerem Maßstab in Irland und Australien Anwendung. Die aufwändige Logistik, welche benötigt wird, um FK-Sperma rechtzeitig auszuliefern, macht im Zusammenhang mit gestiegenen Transportkosten eine bedeutende Zunahme der Nachfrage auch zeitnah unwahrscheinlich. Im Vergleich mit den Besamungsindustrien der Pferde- und Schweinezucht, bei denen hauptsächlich die FK eingesetzt wird (**Publikation 1**), ist festzustellen, dass die Weiterentwicklung der FK von Bullensperma eher stagnierte. So ist der in den 1960er Jahren in Neuseeland entwickelte Verdünner Caprogen® (SHANNON, 1964, 1965) noch immer der Goldstandard der FK (**Publikation 1**). Ziel dieser Dissertation war es, zum einen den aktuellen Stand der Forschung zur FK von Bullensperma darzustellen und diesen mit der Eber- und Hengstspermakonservierung abzugleichen und zum anderen aktuelle Hinweise aus der Forschung zu höheren Fertilitätsraten von FK-Bullensperma bei einem verlängerten Intervall von KB bis zur Ovulation im Rahmen einer eigenen Feldstudie abzubilden.

Schon die metrischen Daten der nativen Ejakulate unterscheiden sich zwischen Bulle, Eber und Hengst bedeutend. Eber liefern mit durchschnittlich 250 ml die größten Ejakulate. Hengstejakulate umfassen im Durchschnitt 40 ml und Ejakulate von Altbullen nur 4 ml. Die Spermienkonzentration von Bullenejakulaten liegt im sehr hohen Bereich von  $0,5 - 2,5 \times 10^9$  Spermien / ml, während Eber Durchschnittswerte von  $0,15 \times 10^9$  Spermien / ml und Hengste  $0,1 \times 10^9$  Spermien / ml erreichen. Diese Unterschiede spiegeln sich auch in der Gestaltung der Besamungsportionen wider. Besamungsportionen für Rinder fassen heutzutage meist 0,23 ml (Mini-Pailletten) oder 0,5 ml (Midi-Paillette) und enthalten bei TG-Sperma in der Regel 15 - 20 Millionen Spermien und bei FK-Sperma 1 - 10 Millionen Spermien. Eine Besamungsportion für Sauen umfasst 50 - 90 ml und enthält 1,5 - 3,5 Milliarden Spermien. Eine Portion konserviertes Hengstsperma enthält mindestens 600 Millionen motile Spermien auf 10 - 20 ml (**Publikation 1**).



Obwohl sich Volumen und Spermienkonzentration zwischen diesen Spezies sowohl im nativen Ejakulat als auch in den Besamungsportionen stark unterscheiden, folgt die FK bei allen dem gleichen Prinzip. Die verwendeten FK-Verdüner beinhalten stets folgende Komponenten: (1) Pufferlösung (z.B. TRIS, HEPES) als Basis, (2) Monosaccharide (z.B. Glucose, Fructose) als Energiequelle für die Spermien, (3) Substanzen zum Schutz vor Kälteeinwirkung auf die Spermienmembran (z.B. Lipoproteine, Phospholipide) und (4) Antibiotika zur Hemmung des Keimwachstums nach gesetzlicher Vorschrift ((Delegierte Verordnung (EU) 2020/686 der Kommission, geändert durch (EU) 2021/880). Die Reduzierung des Spermienstoffwechsels findet bei allen Spezies zwar hauptsächlich durch das Absenken der Temperatur statt, jedoch gibt es, im Gegensatz zum Bullensperma, für Eber- und Hengstsperma bereits Erkenntnisse über besonders vorteilhafte Kühlraten nach der Endverdünnung. Hengstsperma wird üblicherweise um 1,8 - 6 °C / h abgekühlt, sollte jedoch im Bereich von 19 bis 8 °C langsam um nur 0,05 °C / min abgekühlt werden (KATILA, 1997). Ebersperma wird um etwa 4 °C / h abgekühlt, wobei bekannt ist, dass Haltezeiten die Abkühlung von verdünntem Ebersperma derart verlangsamen, dass die Struktur des Lipidbilayers der Spermienmembran vor Kälteeinflüssen geschützt wird (CASAS & ALTHOUSE, 2013). Dies wurde durch eine aktuelle Studie bestätigt, welche die optimale Kühlungsrate bei der Verwendung von antibiotikafreien Verdünnern für die Kältelagerung bei 5°C ermittelte und eine Haltezeit von 6 h bei 22 °C integrierte (PASCHOAL et al., 2020). Für flüssigkonserviertes Rindersperma liegen derartige Veröffentlichungen noch nicht vor, doch gerade die Erkenntnisse aus der Eberspermatologie machen deutlich, welches Potenzial in der Verwendung von definierten Kühlungsraten liegt.

FK-Bullensperma wird je nach verwendetem Verdünner bei ca. 5 °C oder „*Umgebungstemperatur*“ gelagert und kann während der folgenden 3 d nach der Produktion eingesetzt werden. Obwohl FK-Hengstsperma eine große Bandbreite an Temperaturen über dem Gefrierpunkt toleriert (MORAN et al., 1992), wird es in der Regel bei 5 °C gelagert bzw. transportiert und für 48 - 72 h nach Gewinnung des Ejakulates eingesetzt. Ebersperma wird aktuell noch bei 15 - 18 °C gelagert. Die Länge der Einsatztauglichkeit richtet sich bei FK-Ebersperma nach dem verwendeten Verdünnertyp und kann bis zu 10 d nach Produktion betragen (kurz: 1 - 2 d; mittel: 3 - 4 d; lang: 7 - 10 d). Für die Rinderzucht wäre ein Langzeit-FK-Verdüner wie in der Ebersperma-

tologie sehr attraktiv, da so nur noch einmal in der Woche FK-Sperma produziert und verteilt werden müsste. In der Pferdezucht ist die Entwicklung von FK-Verdüner für eine Lagerung der Spermien über 7 d aktueller Forschungsgegenstand (GIBB et al., 2018). Die Weiterentwicklung bei der FK von Hengstsperma geht auch mit einem Umdenken bei der Lagertemperatur einher, da immer mehr Studien zu guten Ergebnissen bei Lagertemperaturen von 15 - 20 °C kamen (**Publikation 1**). In der Eberspermatologie ist ein entgegengesetzter Trend zu beobachten. Wie bereits erwähnt, wird FK-Ebersperma standardgemäß derzeit bei 15 - 18 °C gelagert. Es wird jedoch eine Lagerung bei 5 °C angestrebt. Grund dafür ist, dass bei einer 5 °C-Lagerung das Keimwachstum im Ejakulat bereits deutlich eingeschränkt wird und so der Einsatz von Antibiotika reduziert werden kann (WABERSKI et al., 2019; MENEZES et al., 2020). Aufgrund der besonders hohen Empfindlichkeit von Eberspermien gegenüber Kälteschock, gingen Versuche der Niedrigtemperaturlagerung stets mit zu hohen Qualitätsverlusten einher. In den vergangenen Jahren führte jedoch die Verbesserung von Produktions- und Lagerungsfaktoren zu vielversprechenden Ergebnissen (**Publikation 1**). Die Verwendung von Antibiotika bei der Konservierung von Sperma ist zwar auf EU-Ebene gesetzlich vorgeschrieben, doch verpflichtet die stetig wachsende Bedrohung durch multiresistente Keime zur Entwicklung von Alternativen zum Antibiotikaeinsatz (PRESTINACI et al., 2015; SCHULZE et al., 2020). Das Absenken der Lagerungstemperatur ist in der Eberspermatologie nur ein wichtiger Ansatzpunkt. Daneben wurden bereits mehrere antimikrobielle Zusatzstoffe auf Wirksamkeit, Spermienverträglichkeit und Praktikabilität im Zusammenhang mit einer Lagerung bei 5 °C untersucht. Antimikrobielle Peptide und Algenextrakte zeigten eine ergänzende antimikrobielle Wirkung zur Lagerung bei 5 °C. Obwohl beide Zusätze keine Breitbandwirkung wie herkömmliche Antibiotika zeigten, wäre ein bakterienspezifischer Einsatz in Einzelfällen denkbar (HENSEL et al., 2020; HENSEL et al., 2021). Bei der Forschung zu Antibiotikaalternativen nimmt die Eberspermatologie offensichtlich eine Vorreiterrolle ein, an welcher die Bullenspermatologie sich durchaus orientieren kann.

Die bereits häufiger angesprochene Kälteschock-Problematik betrifft sowohl Eber-, Hengst- als auch Bullenspermien. Der Kälteschock besteht darin, dass frischejakulierte Spermien in bestimmtem Maße ihre Viabilität verlieren, wenn sie schnell von Körpertemperatur auf unter 15 °C gekühlt werden. Der Grad der Empfindlichkeit ge-

gen Kälteeinflüsse ist tierartsspezifisch und besonders ausgeprägt, wenn das Sperma in hohem Tempo weiter auf 1 - 2 °C gekühlt wird (FISER & FAIRFULL, 1986). Ursächlich dafür ist, dass durch die Einwirkung von Kälte Umlagerungen am Lipidbilayer der Spermienmembran stattfinden, welche die Fluidität dieser verändern (DROBNIS et al., 1993). Durch Zusätze wie Hühnereigelb und Magermilch kann dem Kälteschock entgegengewirkt werden. Diese tierischen Produkte enthalten z.B. Lecithine und Lipoproteine, welche eine schützende Interaktion mit der Spermienmembran eingehen (BERGERON & MANJUNATH, 2006). Auch pflanzliche Alternativen aus Soja oder Kokosnuss werden bereits erfolgreich eingesetzt (CRESPILO et al., 2014; TARIG et al., 2017) und sind aus tierseuchenhygienischer Sicht zu bevorzugen. Die bisher besprochenen Substanzen dienen dem Schutz der Spermienmembran vor Kälteeinflüssen und werden auch als „äußere Kälteschutzmittel“ bezeichnet. Für die TG ist Glycerin als weiteres Kälteschutzmittel unerlässlich. Glycerin dringt in die Spermien ein und wird deshalb als „inneres Kälteschutzmittel“ bezeichnet. Das Triglycerid besitzt toxische Eigenschaften gegenüber Spermien, welche von den Tierarten unterschiedlich gut toleriert werden (CURRY, 2000). Bullenspermien haben eine besonders hohe Toleranz gegenüber Glycerin, worin der Erfolg der TG in der Rinderzucht begründet ist. Auch in FK-Verdünnern für Bullensperma findet Glycerin Anwendung (SHANNON, 1964). Dies wurde allerdings aufgrund der toxischen und dehydrierenden Eigenschaften des Zusatzstoffes schon früh in Frage gestellt (ALMQUIST, 1962). Auch aktuelle Untersuchungen zweifeln an dem Nutzen Glycerins bei der FK (CRESPILO et al., 2012; PAPA, 2015). Umso widersprüchlicher scheint es, dass ausgerechnet der weltweit am erfolgreichsten eingesetzte Verdünner Caprogen® aus Neuseeland Glycerin enthält (SHANNON, 1964).

Ein Themengebiet, welches alle Spezies betrifft, bislang aber kaum erforscht wurde, ist die Beeinträchtigung der Spermaqualität durch Vibrationsemission während des Transportes. Das Ausmaß der Beeinträchtigung wird durch Faktoren wie Frequenz, Dauer der Exposition und Verdünner beeinflusst (SCHULZE et al., 2018; PASCHOAL et al., 2021). Die Mechanismen der Schädigung sind bislang noch nicht erschlossen. Mittlerweile liegen reale Daten von Vibrationsemissionen auf Transportwegen in Deutschland vor. Diese sollen künftig genutzt werden, um unter anderem Grenzwerte für Vibrationsemissionen zu eruiieren (HAFEMEISTER et al., 2022). Auch auf diesem

Gebiet schreitet die Besamungsindustrie der Schweinezucht voran und liefert wichtige Anhaltspunkte für die Rinderzucht.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es viele Ansatzpunkte gibt, bei denen eine Weiterentwicklung die Qualität und Attraktivität von FK-Bullensperma steigern würde.

Auch mit den heutigen FK-Verfahren zeigt FK-Bullensperma ebenbürtige Fertilitätsraten im Vergleich mit TG-Bullensperma. Beachtet man jedoch, dass TG-Spermien durch den Gefrier- und Auftauprozess eine kapazitationsähnliche Veränderung erfahren (CURRY, 2000), welche gleichzeitig die kontinuierliche Destabilisierung der Spermienzelle bis zum Zelltod anstößt (HARRISON, 1996), müsste FK-Sperma, welches diese Prozesse nicht durchläuft, zu besseren Ergebnissen als TG-Sperma führen. Es ist ebenfalls bekannt, dass TG-Sperma nach der KB im weiblichen Genitaltrakt eine kürzere Lebenszeit hat als Nativsperma (HAWK, 1983). Eine aktuellere Studie provozierte mit einem CoSynch56-Brunstsynchronisationsprotokoll relativ lange Intervalle zwischen KB und Ovulation bei Milchkühen (BORCHARDT et al., 2018). Diese Studie diente als Orientierung für die Fragestellung in **Publikation 2**. Jedoch kamen im Versuch zu **Publikation 2** keine Brunstsynchronisationsprotokolle zum Einsatz.

In der randomisierten kontrollierten Feldstudie in **Publikation 2** wurden Kühe mit spontaner und durch Prostaglandin-2-alpha induzierter Brunst mit optionaler Terminierung der Ovulation durch GnRH-Gabe zur Besamung vorgestellt und einer Voruntersuchung mit transrektaler Palpation unterzogen. Bei besamungstauglichen Kühen wurde der sprungreife Follikel lokalisiert. Anschließend wurden die Tiere mit FK- oder TG-Sperma besamt. Ungeachtet der Lokalisation des sprungreifen Follikels wurde das Sperma im Gebärmutterkörper abgelegt. Durch eine transrektale Ultraschalluntersuchung 24 h nach KB wurde eine Ovulationskontrolle durchgeführt. War eine Ovulation zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgt, wurde sie als „*verzögerte Ovulation*“ eingeordnet. Auf diese Weise wurde das Intervall zwischen KB und Ovulation grob bestimmt. Dieses Vorgehen ist aussagekräftig, da die Intervalle durch Untersuchung der Tiere bestimmt wurden, während in der vorangegangenen Studie nur das theoretische Intervall beachtet wurde. Das Intervall zwischen KB und Ovulation beträgt beim OvSynch56-Protokoll theoretisch ~ 24 h, doch Tiere reagieren individuell auf hormonelle Stimuli und zeigen, auch ohne diese, variable Intervalle von Brunst-

beginn bis zur Ovulation (ROELOFS et al., 2005; VALENZA et al., 2012; WALKER et al., 1996). Das bedeutet, dass die tatsächlichen Intervalle für die Besamungen in der Studie von BORCHARDT et al. (2018) gar nicht bekannt sind. Ein Nachteil der Methode der eigenen Studie ist, dass nur eine Ultraschalluntersuchung 24 h nach der KB durchgeführt wurde. So konnte nicht zwischen verzögerten Ovulationen und Fällen, in denen die Ovulation ganz ausblieb, unterschieden werden. Es ist bekannt, dass in 6 - 7 % der Fälle die Ovulation ausbleibt (BURNETT et al., 2018; LÓPEZ-GATIUS et al., 2005). In unserem Feldversuch traten verzögerte Ovulationen oder ein Ausbleiben der Ovulation bei gut einem Viertel aller besamten Tiere auf. Das ist zwar deutlich weniger als BRAUN & SARMENTO (2004) berichteten (46 %), dennoch macht es die Relevanz dieses Phänomens deutlich. Unter normalen Praxisbedingungen wäre ein großer Teil dieser Tiere am Folgetag der KB erneut besamt worden, wenn sie sich zuvor noch in Brunst zeigten. Nachbesamungen sind allerdings ein nicht zu vernachlässigender Kostenfaktor für landwirtschaftliche Betriebe, welche auch oft mit einer mangelhaften Brunstbeobachtung einhergehen (SENGER, 1994).

Für den Versuch wurden insgesamt 131 Ejakulate im Split-Sample-Verfahren mit dem FK-Goldstandard Caprogen® und mit TG-Verdünner BioXcell® gemäß der Produktionsroutine der Besamungsstation zu zwei Chargen verarbeitet. Das Besondere an dem Versuch war, dass wöchentlich FK- und TG-Sperma desselben Ejakulates zeitgleich im Einsatz waren. Die Trächtigkeitsergebnisse wurden per ultraschallgestützter transrektaler Trächtigkeitsuntersuchung  $32 \pm 1$  d nach der KB erfasst.

In der eigenen Studie wurden höhere Trächtigkeitsraten (prozentualer Anteil tragender Kühe  $32 \pm 1$  d nach KB an besamten Kühen) für FK-Sperma (45,4 %) als für TG-Sperma (33,7 %) festgestellt ( $P = 0,016$ ). Das steht im Kontrast zu einigen früheren Studien (BUCHER et al., 2009; MURPHY et al., 2017). Zugleich bestätigen wir damit die Ergebnisse anderer Studien, welche den Effekt von FK- und TG-Sperma auf die Fertilität von Kühen untersuchten (BORGES-SILVA et al., 2016; CRESPILO et al., 2012; PAPA, 2015). Die heterogene Gestaltung der zitierten Studien (z.B. Rassen, Brunstsynchronisation, Verdünner, Spermienkonzentration) erschwert jedoch einen profunden Vergleich der Ergebnisse. Wie bereits erwähnt, orientierte sich die Fragestellung der eigenen Studie in **Publikation 2** an einer vorherigen Veröffentlichung (BORCHARDT et al., 2018). Die Autoren stellten damals fest, dass die Trächtigkeits-

raten von FK-Sperma bei dem relativ langen Intervall von KB bis zur Ovulation nach OvSynch56 denen von TG-Sperma tatsächlich überlegen war (27,5 % und 20,0 %;  $P = 0,032$ ). Mittlerweile liegt eine weitere Veröffentlichung zu der Thematik vor (TIPPENHAUER et al., 2021), bei der zur Brunstbeobachtung und Bestimmung des KB-Zeitpunktes ein automatisches Aktivitäts-Monitoring-System verwendet wurde. TIPPENHAUER et al. (2021) stellten eine Tendenz für höhere Trächtigkeitsraten bei KB mit FK-Sperma fest, wenn der Besamungszeitpunkt etwa 5 h vor Brunstende lag ( $P = 0,03$ ). Beide Studien verwendeten mit  $10 \times 10^6$  Spermien / Portion ähnlich hohe Spermienkonzentrationen wie in der eigenen Studie ( $9 \times 10^6$  Spermien / Portion). Die hohe Spermienkonzentration stellt eine Einschränkung von **Publikation 2** dar, denn mit 9 Millionen Spermien in einer FK-Portion und 25 Millionen Spermien in einer TG-Portion wird bei beiden Konservierungsmethoden das Kompensationslevel für bullspezifische Fruchtbarkeitsmängel klar überschritten (AMANN & DEJARNETTE, 2012). Zum Vergleich: In Neuseeland enthalten FK-Portionen lediglich  $1 - 2 \times 10^6$  Spermien / Portion und führen trotzdem zu zufriedenstellenden Ergebnissen (YANG et al., 2018).

Wie zuvor erwähnt, berichteten einige Studien von ebenbürtigen Fertilitätsraten beim Vergleich von FK- und TG-Sperma unter verschiedenen Bedingungen. Es gibt jedoch auch eine Studie, welche niedrigere Fertilitätsraten für den Einsatz von FK-Sperma feststellte (SCHÜLLER et al., 2016). Diese Studie verglich den Effekt von FK- und TG-Sperma auf Fertilitätsraten bei Kühen unter akutem Hitzestress und diskutierte folglich, dass die hohen Umgebungstemperaturen während des Versuches wohlmöglich zur Erhöhung der Lagertemperatur und so zur Beeinträchtigung der Qualität des FK-Spermas führten. Auch während des Feldversuches für **Publikation 2** traten im Sommer 2019 sehr hohe Außentemperaturen über längere Zeiträume auf. Allerdings folgten wir einem strikten Temperaturmanagement. Das Wasser, in dem die Portionen lagerten, hatte initial eine Temperatur von  $13 \pm 1$  °C und wurde am Anfang und Ende jeden Arbeitstages sowie bei jeder Entnahme von Portionen überprüft. Sobald die Wassertemperatur 20 °C überschritt, wurde der Einsatz des darin gelagerten Spermas eingestellt. In der statistischen Auswertung konnte keine Interaktion von Konservierungsmethode und Saison festgestellt werden. Das zeigt, dass ein konsequentes Monitoring von passiv-gekühltem FK-Sperma während hoher Außentemperaturen den Einsatz beeinträchtigten FK-Spermas verhindern kann. Aber nicht nur

hohe Temperaturen können die Spermaqualität mindern. MURPHY et al. (2017) zeigten, dass Temperaturschwankungen zwischen 4 und 18 °C, wie sie bei Wechsel zwischen Tag und Nacht auftreten, die Befruchtungskapazität von Spermien herabsetzen können. Eine Sorgfalt wie unter Versuchsbedingungen ist in der Besamungspraxis eher unwahrscheinlich, deshalb sollte die Nutzung von Klimaboxen zum Transport von FK-Sperma in Betracht gezogen werden.

Die Verwendung von FK kann, verglichen mit TG-Sperma, also zu positiven Effekten bei der weiblichen Reproduktionsleistung führen. Für den Effekt der FK auf die Spermaqualität bzw. Fertilität von prämaternen Jungbullen gibt es bisher noch keine Untersuchungen. Die bisherigen Studien verwendeten Ejakulate von Bullen mit stabiler Spermatogenese. Für sehr junge Bullen ist bekannt, dass die Spermaqualität sich erst mit zunehmendem Alter verbessert und stabilisiert und die Länge dieses Prozesses zwischen Individuen äußerst variabel sein kann (HURRI et al., 2022). Allerdings ist klar, dass das durch die FK die Ausbeute pro Ejakulat das Zehnfache als bei TG betragen kann (YANG et al., 2018). Das ist ein bedeutendes Argument für die Verwendung der FK bei Jungbullen, da Volumen und Spermienkonzentration ihrer Ejakulate deutlich geringer als die von älteren Bullen sind (BRITO et al., 2002). In Zukunft sollten Jungbullenejakulate vor Stabilisierung der Spermatogenese untersucht werden. Eine betriebswirtschaftliche Auswertung könnte Produktions- und Logistikkosten für FK dem Verlust von prämaternen Ejakulaten gegenüberstellen, welche wegen zu geringen Volumina und Spermienkonzentrationen oder wegen zu geringer Spermienqualität nach dem Tiefgefrierprozess verworfen werden müssen.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass FK-Sperma bereits mit heutigen Methoden positive Effekte auf die weibliche Fruchtbarkeit beim Rind hat, die Ejakulateffizienz gegenüber der TG bedeutend erhöht und als schonendes Verfahren besonders für Ejakulate prämaterner Bullen von Vorteil sein könnte. Doch um den Einsatz der FK auch in der asaisonalen Rinderzucht attraktiv zu machen, ist vor allem die Entwicklung eines Langzeitverdünners nötig, welcher den Einsatz von FK-Sperma über 7 d nach der Produktion ermöglicht. Dass eine Weiterentwicklung der FK von Bullensperma in vielen Bereichen möglich ist, zeigt der Vergleich mit anderen Spezies.

## 5. Zusammenfassung

**Marie Wiebke (2023):**

### **Flüssigkonservierung von Bullensperma: Status quo und Ergebnisse aus einer randomisierten klinischen Feldstudie**

Die in den vergangenen Jahrzehnten gesunkene Reproduktionsleistung von laktierenden Milchkühen und die eingeschränkte Verfügbarkeit von Besamungsportionen junger Bullen hohen genetischen Werts stellen zwei Hauptprobleme der modernen Rinderzucht dar. Die Anwendung der Flüssigkonservierung (FK) könnte bei prämaturen Ejakulaten die Menge an produzierten Besamungsportionen erhöhen und durch Schonung der Spermien zu einer besseren Qualität und weniger verworfenen Chargen führen. Auf weiblicher Seite gab es Hinweise, dass FK-Sperma bei verlängerten Intervallen zwischen künstlicher Besamung (KB) und Ovulation zu besseren Ergebnissen führen könnte als Sperma nach Tiefgefrierkonservierung (TG). Das wäre angesichts der hohen Variabilität dieses Intervalls zwischen Individuen ein großer Vorteil. Dennoch findet FK in der asaisonalen Rinderzucht kaum Anwendung. Ziel der Dissertation war es, den aktuellen Forschungsstand der FK von Bullensperma darzulegen und mit dem Stand der FK von Eber- und Hengstsperma ins Bild zu setzen. Weiterhin sollte dem Hinweis auf überlegene Fertilitätsraten von FK-Sperma bei einem verlängerten Intervall zwischen KB und Ovulation im Rahmen einer Feldstudie nachgegangen werden.

Durch **Publikation 1** wurde ersichtlich, dass in den letzten Jahren besonders bei der FK von Ebersperma große Fortschritte gemacht wurden und auch in der Hengstspermakonservierung Anstrengungen unternommen werden, um die Qualität und Praktikabilität von FK-Hengstsperma zu steigern. In der Bullenspermakonservierung gab es zuletzt keine entscheidende Weiterentwicklung der FK, was nicht zuletzt an der geringen Nachfrage außerhalb der saisonalen Rinderzucht liegt.

In der randomisierten kontrollierten Feldstudie in **Publikation 2** wurden insgesamt 131 Ejakulate von sieben Bullen im Split-Sample-Verfahren jeweils zu FK- und TG-Sperma verarbeitet. Beide Chargen wurden stets zur gleichen Zeit bei Milchkühen auf fünf landwirtschaftlichen Betrieben in Deutschland eingesetzt. Durch eine trans-



rektale Ultraschalluntersuchung 24 h nach KB wurde eine Ovulationskontrolle durchgeführt. War eine Ovulation zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgt, wurde sie als „*verzögerte Ovulation*“ eingeordnet. Die statistische Auswertung von 667 KB mittels verallgemeinerten linearen gemischten Modells zeigte generell eine signifikant ( $P = 0,016$ ) höhere Konzeptionsrate für FK-Sperma (45,4 %) als für TG-Sperma (33,7 %). In der Gruppe der KB mit „*verzögerten Ovulationen*“ betrug die Differenz zwischen den Trächtigkeitsraten von FK- und TG-Sperma fast 20 % (FK: 46,8 %; TG: 27,7 %;  $P = 0,017$ ). Somit konnten die Tendenzen vorausgegangener Studien bestätigt werden.

Die Flüssigkonservierung kann auch mit den derzeitigen Methoden ein Produkt hervorbringen, welches der Befruchtungskapazität von TG-Sperma überlegen ist. Wird ähnlich wie in der Eberspermakonservierung an neuen Produktionsprotokollen geforscht, welche beispielsweise definierte Kühlungsraten nach der Endverdünnung umfassen, könnte die Qualität von FK-Sperma weiter gesteigert werden. Weiterhin könnte ein Monitoring und eventuell Eindämmen von Vibrationsemissionen während des Transportes von FK-Sperma eine Beeinträchtigung der Spermaqualität verhindern. Dazu muss jedoch zunächst eruiert werden, wie empfindlich Bullenspermien gegenüber Vibrationsemissionen sind. Eine weitere Aufgabe stellt die Forschung an Alternativen zur Verwendung Antibiotika dar, welche auch die TG betrifft. Zentrales Ziel der Weiterentwicklung der FK sollte eine Lager- bzw. Einsatzfähigkeit des Bullenspermas von bis zu 7 d sein.

## 6. Summary

**Marie Wiebke (2023):**

### **Liquid preservation of bull semen: status quo and results of a randomized controlled clinical trial**

The progressive decline in the reproductive performance of lactating dairy cows in recent years as well as the limited availability of insemination doses of young bulls with high genetic merit are two major issues of modern cattle breeding. The use of liquid semen (LS) could help resolve this dilemma by increasing the yield of insemination doses per ejaculate of premature bulls and lead to better quality and fewer discarded batches by sparing sperm from cryo-injury. In addition, there is evidence in female cattle that LS could lead to higher P/AI when the interval from AI until ovulation is elongated. This would be a great advantage given the high variability of this interval between individuals. Despite this, LS is rarely used in non-seasonal cattle breeding. The aim of this dissertation was to collect and present information on the current state of research concerning liquid preservation of bull semen and relate it to the status of LS preservation of boar and stallion. Furthermore, the previously published evidence of higher fertility rates of LS in cases with prolonged interval from AI until ovulation were supposed to be investigated in a field study.

Publication 1 has shown that great progress has been made in recent years regarding the liquid preservation of boar semen. There have also been efforts made to improve the quality and practicability of LS of stallions, however, there has been no crucial progression of LS preservation in bulls. A reason for this might be the limited interest in LS outside of seasonal cattle breeding.

In the randomized controlled study of Publication 2, 131 ejaculates of seven bulls were processed into LS and frozen semen (FS) by split-sample-procedure. Both batches of each ejaculate were used at the same time for AI of lactating dairy cows housed on five farms in Germany. Ovulation control was conducted 24 h after AI. Ovulations were classified as '*delayed*' when the pre-ovulatory follicle was still present at ovulation control. The statistical analysis of 667 AI's, using a general linear mixed model, showed an overall significantly higher ( $P = 0.016$ ) P/AI for LS (45.4 %)

## Summary

compared to FS (33.7 %). In cows with delayed ovulations the difference of P/AI between LS and FS was almost 20 % (LS: 46.8 %; FS: 27.7 %;  $P = 0.017$ ). These results confirmed the findings of previous studies.

This study has shown that even when using current LS methods for preservation of bull semen, potent AI doses of superior fertility in comparison to FS can be produced. If further research would be conducted focused on the improvement of LS methods, such as is the case for boar semen, incorporating for example defined cooling curves for semen after dilution, then the quality of liquid bull semen could be further increased. In addition, monitoring and minimization of vibration emissions during transport of LS could prevent quality loss after production. Therefore, it has yet to be investigated how sensitive bull spermatozoa react to vibration emissions. Another topic will be examining alternatives for use of antibiotics in semen doses, which is relevant for FS as well. Finally, research focusing on methods to extend the shelf life of LS to 7 d will greatly improve its practicability in the field.

## 7. Literaturverzeichnis

ALMQUIST, J. O. (1962):

Diluents for bovine semen. XI. Effect of glycerol on fertility and motility of spermatozoa in homogenized milk and skim milk.  
Journal of Dairy Science, 45, 911-916.

AMANN, R. P. & DEJARNETTE, J. M. (2012):

Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: A paradigm shift.  
Theriogenology, 77, 795-817.

BERGERON, A. & MANJUNATH, P. (2006):

New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk.  
Molecular reproduction and development, 73, 1338-1344.

BORCHARDT, S., SCHULLER, L., WOLF, L., WESENAUER, C. & HEUWIESER, W. (2018):

Comparison of pregnancy outcomes using either an Ovsynch or a Cosynch protocol for the first timed AI with liquid or frozen semen in lactating dairy cows.  
Theriogenology, 107, 21-26.

BORGES-SILVA, J. C., SILVA, M. R., MARINHO, D. B., NOGUEIRA, E., SAMPAIO, D. C., OLIVEIRA, L. O. F., ABREU, U. G., MOURAO, G. B. & SARTORI, R. (2016):

Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle.  
Reproduction, Fertility and Development, 28, 1004-1008.

BRAUN, J. & SARMENTO, S. (2004):

Delayed ovulation in dairy cattle a field study.  
Tierärztliche Umschau, 59, 64-68.

BRITO, L. F., SILVA, A. E., RODRIGUES, L. H., VIEIRA, F. V., DERAGON, L. A. & KASTELIC, J. P. (2002):

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, 58, 1175-1186.

BUCHER, A., KASIMANICKAM, R., HALL, J. B., DEJARNETTE, J. M., WHITTIER, W. D., KAHN, W. & XU, Z. (2009):

Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows.  
Theriogenology, 71, 1180-1185.

BURNETT, T. A., POLSKY, L., KAUR, M. & CERRI, R. L. A. (2018):

Effect of estrous expression on timing and failure of ovulation of Holstein dairy cows using automated activity monitors.  
Journal of Dairy Science, 101, 11310-11320.

CASAS, I. & ALTHOUSE, G. (2013):

The protective effect of a 17 C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5 C.

Cryobiology, 66, 69-75.

CRESPILHO, A. M., NICHI, M., GUASTI, P. N., FREITAS-DELL'AQUA, C. P., SA FILHO, M. F., MAZIERO, R. R., DELL'AQUA, J. A., JR. & PAPA, F. O. (2014):

Sperm fertility and viability following 48h of refrigeration: evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state.

Animal reproduction science, 146, 126-133.

CRESPILHO, A. M., PAPA, F. O., SANTOS, M. D. P. & SÁ FILHO, M. F. D. (2012):

Use of cooled bull semen as a strategy to increase the pregnancy rate in fixed-time artificial insemination programs-case report.

American Journal of Animal and Veterinary Sciences, 7, 175-179.

CURRY, M. R. (2000):

Cryopreservation of semen from domestic livestock.

Reviews of reproduction, 5, 46-52.

CURRY, M. R. (2007):

Cryopreservation of mammalian semen.

Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, 303-311.

DALLAGO, G. M., WADE, K. M., CUE, R. I., MCCLURE, J. T., LACROIX, R., PELLERIN, D. & VASSEUR, E. (2021):

Keeping dairy cows for longer: a critical literature review on dairy cow longevity in high milk-producing countries.

Animals, 11.

DE LEEUW, F., DE LEEUW, A., DEN DAAS, J., COLENBRANDER, B. & VERKLEIJ, A. (1993):

Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing.

Cryobiology, 30, 32-44.

DROBNIS, E. Z., CROWE, L. M., BERGER, T., ANCHORDOGUY, T. J., OVERSTREET, J. W. & CROWE, J. H. (1993):

Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model.

Journal of experimental zoology, 265, 432-437.

FISER, P. & FAIRFULL, R. (1986):

The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing.

Cryobiology, 23, 518-524.

GIBB, Z., CLULOW, J., AITKEN, R. & SWEGEN, A. (2018):

First publication to describe a protocol for the liquid storage of stallion spermatozoa for 7 days.

Journal of Equine Veterinary Science, 66, 37-40.

GODDARD, M. & HAYES, B. (2007):

Genomic selection.

Journal of Animal breeding and Genetics, 124, 323-330.

HAFEMEISTER, T., SCHULZE, P., BORTFELDT, R., SIMMET, C., JUNG, M., FUCHS-KITTOWSKI, F. & SCHULZE, M. (2022):

Boar semen shipping for artificial insemination: current status and analysis of transport conditions with a major focus on vibration emissions.

Animals, 12, 1331.

HARRISON, R. (1996):

Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals.

Reproduction, Fertility and Development, 8, 581-594.

HAWK, H. (1983):

Sperm survival and transport in the female reproductive tract.

Journal of Dairy Science, 66, 2645-2660.

HENSEL, B., JAKOP, U., SCHEINPFLUG, K., MÜHLDORFER, K., SCHRÖTER, F., SCHÄFER, J., GREBER, K., JUNG, M. & SCHULZE, M. (2020):

Low temperature preservation of porcine semen: Influence of short antimicrobial lipopeptides on sperm quality and bacterial load.

Scientific Reports, 10, 1-12.

HENSEL, B., JAKOP, U., SCHEINPFLUG, K., SCHRÖTER, F., SANDMANN, M., MÜHLDORFER, K. & SCHULZE, M. (2021):

Low temperature preservation: Influence of putative bioactive microalgae and hop extracts on sperm quality and bacterial load in porcine semen.

Sustainable Chemistry and Pharmacy, 19, 100359.

HURRI, E., LIMA-VERDE, I., JOHANNISSON, A., STÅLHAMMAR, H., NTALLARIS, T. & MORRELL, J. M. (2022):

Post-thaw semen quality in young bull ejaculates before being accepted for commercial semen doses.

Veterinary Record, 191, 1-11.

KATILA, T. (1997):

Procedures for handling fresh stallion semen.

Theriogenology, 48, 1217-1227.

LÓPEZ-GATIUS, F., LÓPEZ-BÉJAR, M., FENECH, M. & HUNTER, R. (2005):

Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects.

Theriogenology, 63, 1298-1307.

MENEZES, T. D. A., MELLAGI, A. P. G., DA SILVA OLIVEIRA, G., BERNARDI, M. L., WENTZ, I., DA ROSA ULGUIM, R. & BORTOLOZZO, F. P. (2020):

Antibiotic-free extended boar semen preserved under low temperature maintains acceptable in-vitro sperm quality and reduces bacterial load.

Theriogenology, 149, 131-138.

- MEUWISSEN, T. H., HAYES, B. J. & GODDARD, M. (2001):  
Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps.  
*genetics*, 157, 1819-1829.
- MORAN, D., JASKO, D., SQUIRES, E. & AMANN, R. (1992):  
Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa.  
*Theriogenology*, 38, 999-1012.
- MURPHY, C., HOLDEN, S. A., MURPHY, E. M., CROMIE, A. R., LONERGAN, P. & FAIR, S. (2016):  
The impact of storage temperature and sperm number on the fertility of liquid-stored bull semen.  
*Reproduction, Fertility and Development*, 28, 1349-1359.
- MURPHY, E. M., EIVERS, B., O'MEARA, C. M., LONERGAN, P. & FAIR, S. (2018a):  
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*, 108, 217-222.
- MURPHY, E. M., EIVERS, B., O'MEARA, C. M., LONERGAN, P. & FAIR, S. (2018b):  
Effect of storage temperature, nitrogen gassing and sperm concentration on the in vitro semen quality and in vivo fertility of liquid bull semen stored in INRA96.  
*Theriogenology*, 108, 223-228.
- MURPHY, E. M., KELLY, A. K., O'MEARA, C., EIVERS, B., LONERGAN, P. & FAIR, S. (2018c):  
Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre.  
*Journal of Animal Science*, 96, 2408-2418.
- MURPHY, E. M., MURPHY, C., O'MEARA, C., DUNNE, G., EIVERS, B., LONERGAN, P. & FAIR, S. (2017):  
A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen.  
*Journal of Dairy Science*, 100, 1541-1554.
- PAPA, P. M. (2015):  
Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen.  
*Theriogenology*, 83, 107-113.
- PASCHOAL, A. F., LUTHER, A.-M., JÄKEL, H., SCHEINPFLUG, K., MÜHLIDORFER, K., P. BORTOLOZZO, F. & WABERSKI, D. (2020):  
Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5 C.  
*PLoS One*, 15, 1-14.

PASCHOAL, A. F., LUTHER, A.-M., JAKOP, U., SCHULZE, M., BORTOLOZZO, F. P. & WABERSKI, D. (2021):  
Factors influencing the response of spermatozoa to agitation stress: Implications for transport of extended boar semen.  
*Theriogenology*, 175, 54-60.

PRESTINACI, F., PEZZOTTI, P. & PANTOSTI, A. (2015):  
Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon.  
*Pathogens and global health*, 109, 309-318.

Rinder- und Schweineproduktion in Deutschland 2020. (2021). Bundesverband Rind und Schwein e.V.

ROELOFS, J., LOPEZ-GATIUS, F., HUNTER, R. H., VAN EERDENBURG, F. J. & HANZEN, C. (2010):  
When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects.  
*Theriogenology*, 74, 327-344.

ROELOFS, J. B., VAN EERDENBURG, F. J. C. M., SOEDE, N. M. & KEMP, B. (2005):  
Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle.  
*Theriogenology*, 63, 1366-1377.

ROYAL, M., MANN, G. E. & FLINT, A. P. (2000):  
Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle.  
*The Veterinary Journal*, 160, 53-60.

SCHÜLLER, L. K., BURFEIND, O. & HEUWIESER, W. (2016):  
Effect of short- and long-term heat stress on the conception risk of dairy cows under natural service and artificial insemination breeding programs.  
*Journal of Dairy Science*, 99, 2996-3002.

SCHULZE, M., BORTFELDT, R., SCHÄFER, J., JUNG, M. & FUCHS-KITTOWSKI, F. (2018):  
Effect of vibration emissions during shipping of artificial insemination doses on boar semen quality.  
*Animal reproduction science*, 192, 328-334.

SCHULZE, M., NITSCHKE-MELKUS, E., HENSEL, B., JUNG, M. & JAKOP, U. (2020):  
Antibiotics and their alternatives in Artificial Breeding in livestock.  
*Animal reproduction science*, 220, 106284.

SENGER, P. L. (1994):  
The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities.  
*Journal of Dairy Science*, 77, 2745-2753.

SHANNON, P. (1964):  
The effects of diluents containing glycine, and glycine and glycerol, on the fertility of diluted bovine semen.  
*New Zealand Journal of Agricultural Research*, 7, 357-363.



- SHANNON, P. (1965):  
Contribution of seminal plasma, sperm numbers, and gas phase to dilution effects of bovine spermatozoa.  
Journal of Dairy Science, 48, 1357-1361.
- SHANNON, P. (1968):  
Advances in semen dilution.  
Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 28, 23-31.
- SINGH, A., SINGH, V., NARWADE, B., MOHANTY, T. & ATREJA, S. (2012):  
Comparative Quality Assessment of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Semen Chilled (5 C) in Egg Yolk-and Soya Milk–Based Extenders.  
Reproduction in Domestic Animals, 47, 596-600.
- TARIG, A. A., WAHID, H., ROSNINA, Y., YIMER, N., GOH, Y. M., BAIEE, F. H., KHUMRAN, A. M., SALMAN, H., ASSI, M. A. & EBRAHIMI, M. (2017):  
Effect of different concentrations of soybean lecithin and virgin coconut oil in Tris-based extender on the quality of chilled and frozen-thawed bull semen.  
Veterinary World, 10, 672-678.
- THIBIER, M. & GUERIN, B. (2000):  
Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination.  
Animal reproduction science, 62, 233-251.
- THIBIER, M. & WAGNER, H. G. (2002):  
World statistics for artificial insemination in cattle.  
Livestock Production Science, 74, 203-212.
- TIPPENHAUER, C. M., PLENIO, J. L., MADUREIRA, A. M. L., CERRI, R. L. A., HEUWIESER, W. & BORCHARDT, S. (2021):  
Timing of artificial insemination using fresh or frozen semen after automated activity monitoring of estrus in lactating dairy cows.  
Journal of Dairy Science, 104, 3585-3595.
- TRIMBERGER, G. (1944):  
Conception rate in dairy cattle by artificial insemination at various intervals before and after ovulation.  
Journal of Dairy Science, 27, 659-660.
- TRIMBERGER, G. & DAVIS, H. (1943):  
Breeding efficiency in dairy cattle bred at various stages of estrus by artificial insemination.  
Journal of Dairy Science, 26, 31.
- VALENZA, A., GIORDANO, J. O., LOPES, J. G., VINCENTI, L., AMUNDSON, M. C. & FRICKE, P. M. (2012):  
Assessment of an accelerometer system for detection of estrus and treatment with gonadotropin-releasing hormone at the time of insemination in lactating dairy cows.  
Journal of Dairy Science, 95, 7115-7127.

VISHWANATH, R. (2003):

Artificial insemination: the state of the art.

Theriogenology, 59, 571-584.

VISHWANATH, R. & SHANNON, P. (1997):

Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during ambient temperature storage.

Reproduction, Fertility and Development, 9, 321-332.

VISHWANATH, R. & SHANNON, P. (2000):

Storage of bovine semen in liquid and frozen state.

Animal reproduction science, 62, 23-53.

WABERSKI, D., LUTHER, A. M., GRÜNTHER, B., JÄKEL, H., HENNING, H., VOGEL, C., PERALTA, W., WEITZE, K. F. (2019):

Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen.

Scientific Reports, 9, 14748.

WALKER, W. L., NEBEL, R. L. & MCGILLIARD, M. L. (1996):

Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle.

Journal of Dairy Science, 79, 1555-1561.

YANG, D. H., STANDLEY, N. T. & XU, Z. Z. (2018):

Application of liquid semen technology under the seasonal dairy production system in New Zealand.

Animal reproduction science, 194, 2-10.

