



## **Einfluss der Samenqualität auf die Fruchtbarkeit nach hetero- und homospermer Insemination beim Rind**

Inversini, M

**Abstract:** Das Ziel der vorliegenden Studie war, die Auswirkungen der Samenqualität auf die Fruchtbarkeit nach homospermer und heterospermer Insemination beim Rind abzuklären. Dazu wurden Ejakulate der drei Stiere EDLOCK (Simmentaler Fleckvieh), GLOBI (Limousin) und NEW TRANSIT (Angus) während 64 Wochen gewonnen und sowohl homo- wie auch heterosperme Dosen (Mischsamen, SILIAN-2) für die künstliche Besamung produziert. Zur Beurteilung der Qualität des aufgetauten Gefriersamens wurden die Spermienmotilität mittels CASA sowie die DNA-, Membran- und Akrosomintegrität und der intrazelluläre Kalziumgehalt mittels Durchflusszytometrie (FACS) gemessen. Die Erhebung der Fruchtbarkeit nach heterospermer und homospermer Besamung im Feld erfolgte mit Hilfe der Non-Return-Raten (NRR) nach Erstbesamung. Nach heterospermer Insemination mit SILIAN-2 wurde die Vaterschaft bei den Kälbern sowohl phänotypisch wie auch genotypisch bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Samenqualität des Mischsamens SILIAN-2 besser war als diejenige des besten im Samengemisch enthaltenen Stieres. Bei der Vaterschaft der Kälber nach heterospermer Insemination mit SILIAN-2 konnte ein signifikanter Einfluss der Rasse des Muttertieres festgestellt werden. Dabei war bei Kälbern von rotweissen Müttern (Schweizer Fleckvieh) der Simmentaler Stier EDLOCK (58.7%) am häufigsten der Vater und bei Nachkommen von braunen Müttern (Schweizer Braunvieh) der Limousin Stier GLOBI (50.8%).

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich  
ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-59352>

Originally published at:

Inversini, M. Einfluss der Samenqualität auf die Fruchtbarkeit nach hetero- und homospermer Insemination beim Rind. 2011, University of Zurich, Vetsuisse Faculty.

Departement für Nutztiere, Klinik für Fortpflanzungsmedizin  
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich  
Direktor a.i.: Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun

und

Swissgenetics Zollikofen  
Direktor: Dr. S. Felder

## **Einfluss der Samenqualität auf die Fruchtbarkeit nach hetero- und homospermer Insemination beim Rind**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

**Mirjam Claudia Inversini**

Tierärztin

von Utzenstorf/BE

genehmigt auf Antrag von

PD Dr. F. Janett, Referent

PD Dr. Annette Liesegang, Korreferentin

Zürich 2011



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</b>	<b>5</b>
3.1	HETEROSPERME INSEMINATION	5
3.2	FRAGESTELLUNG	8
<b>4</b>	<b>TIERE, MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>9</b>
4.1	TIERE	9
4.2	GEWINNUNG, UNTERSUCHUNGEN UND VERARBEITUNG DER EJAKULATE	9
4.2.1	Samengewinnung	9
4.2.2	Untersuchung der Ejakulate	10
4.2.3	Verarbeitung der Ejakulate	10
4.3	UNTERSUCHUNGEN IM GEFRIERSAMEN	11
4.3.1	Motilität	13
4.3.2	Membran-, Akrosomintegrität und intrazellulärer Kalziumgehalt	15
4.3.3	DNA-Integrität	17
4.4	BESTIMMUNG DER VATERSCHAFT DER KÄLBER VON SILIAN-2	18
4.4.1	Phänotypische Bestimmung der Vaterschaft	19
4.4.2	Genetische Bestimmung der Vaterschaft	19
4.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	26



<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
5.1	EINFLUSS VERSCHIEDENER FAKTOREN AUF DIE SAMENQUALITÄT	29
5.2	SAMENQUALITÄT DER STIERE	31
5.2.1	Totale Motilität	31
5.2.2	Progressive Motilität	32
5.2.3	Rapide Motilität	33
5.2.4	Pfadgeschwindigkeit (VAP)	34
5.2.5	Spurgeschwindigkeit (VCL)	36
5.2.6	Progressivgeschwindigkeit (VSL)	38
5.2.7	Seitliche Kopfauslenkung (ALH)	39
5.2.8	Vitale und akrosomintakte Spermien	41
5.2.9	Vitale und akrosomreagierte Spermien	42
5.2.10	Intrazellulärer Kalziumgehalt	43
5.2.11	DNA-Integrität	45
5.3	EINSATZ UND FRUCHTBARKEIT DER STIERE IM FELD	46
5.4	VATERSCHAFT DER KÄLBER NACH BESAMUNG MIT SILIAN-2	47
5.4.1	Vaterschaft nach phänotypischer Beurteilung	48
5.4.2	Vaterschaft nach genotypischer Bestimmung	49
5.4.3	Unterschiede in der phäno- und genotypischen Vaterschaft	50
5.4.4	Vaterschaft bei Zwillingskälbern von SILIAN-2	51
5.5	FRUCHTBARKEIT NACH HOMOSPERMER BESAMUNG BEI BRAUNEN UND ROTWEISSEN RASSEN	51
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>DANK</b>	<b>65</b>



## 1 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie war, die Auswirkungen der Samenqualität auf die Fruchtbarkeit nach homospermer und heterospermer Insemination beim Rind abzuklären. Dazu wurden Ejakulate der drei Stiere EDLOCK (Simmentaler Fleckvieh), GLOBI (Limousin) und NEW TRANSIT (Angus) während 64 Wochen gewonnen und sowohl homo- wie auch heterosperme Dosen (Mischsamen, SILIAN-2) für die künstliche Besamung produziert. Zur Beurteilung der Qualität des aufgetauten Gefriersamens wurden die Spermienmotilität mittels CASA sowie die DNA-, Membran- und Akrosomintegrität und der intrazelluläre Kalziumgehalt mittels Durchflusszytometrie (FACS) gemessen. Die Erhebung der Fruchtbarkeit nach heterospermer und homospermer Besamung im Feld erfolgte mit Hilfe der Non-Return-Raten (NRR) nach Erstbesamung. Nach heterospermer Insemination mit SILIAN-2 wurde die Vaterschaft bei den Kälbern sowohl phänotypisch wie auch genotypisch bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Samenqualität des Mischsamens SILIAN-2 besser war als diejenige des besten im Samengemisch enthaltenen Stieres. Bei der Vaterschaft der Kälber nach heterospermer Insemination mit SILIAN-2 konnte ein signifikanter Einfluss der Rasse des Muttertieres festgestellt werden. Dabei war bei Kälbern von rotweissen Müttern (Schweizer Fleckvieh) der Simmentaler Stier EDLOCK (58.7%) am häufigsten der Vater und bei Nachkommen von braunen Müttern (Schweizer Braunvieh) der Limousin Stier GLOBI (50.8%).





## 2 Summary

### **Effect of semen quality on fertility after hetero- and homospermic insemination in cattle**

The objective of this study was to investigate the effects of bull semen quality on fertility after homospermic and heterospermic insemination. Ejaculates were collected during 64 weeks from 3 bulls, EDLOCK (Simmental), GLOBI (Limousin) and NEW TRANSIT (Angus) for the production of homo- and heterospermic (mixed semen, SILIAN-2) semen doses for artificial insemination. In homo- and heterospermic post-thaw semen samples sperm motility was evaluated using CASA and DNA-, membrane as well as acrosome integrity and the intracellular calcium concentration were analyzed by flow cytometry (FACS). The determination of homo- and heterospermic fertility in the field was performed using non-return-rates (NRR) after first insemination. After heterospermic insemination the paternity of calves originating from SILIAN-2 was determined pheno- and genotypically. The results show that the heterospermic quality of SILIAN-2 was better than the best bull present in the mixed semen. Regarding the paternity of calves after heterospermic insemination with SILIAN-2, a significant effect of the breed of the dam was detected. In red and white dams (Swiss Fleckvieh) most calves were sired by the Simmental bull EDLOCK (58.7%) and in brown dams (Brown Swiss) by the Limousin bull GLOBI (50.8%).



### **3 Einleitung und Fragestellung**

Die künstliche Besamung (KB) ist das wichtigste Verfahren in der Rinderzucht. In der Schweiz werden heute mehr als 90% aller Kühe und Rinder mit Gefriersamen besamt. Entscheidend für den Besamungserfolg ist neben der Wahl des richtigen Besamungszeitpunktes und der korrekten Technik bei der Samenübertragung auf das weibliche Tier auch die Qualität des verwendeten Samens. Die Besamungsorganisationen sind ständig bestrebt, die Samenproduktion zu optimieren und damit den Erfolg und die Wirtschaftlichkeit der KB zu maximieren. Eine Verbesserung der Fruchtbarkeit lässt sich durch die Verwendung von Mischsperma verschiedener Vatertiere, der sogenannten heterospermen Insemination, erreichen.

#### **3.1 Heterosperme Insemination**

Von heterospermer Insemination (HI) im weiteren Sinn spricht man, wenn sich ein Weibchen in der gleichen Brunst mit mehreren Männchen paart. Dieses Verhalten ist im Tierreich weit verbreitet und wird als Polyandrie bezeichnet. HI im engeren Sinn bedeutet, dass die Befruchtung einer oder mehrerer Eizellen durch Spermien mehrerer Vatertiere im selben Zyklus erfolgt. Durch die höhere genetische Variabilität bei der HI ist einerseits der Selektionsdruck für motile, befruchtungsfähige Spermien stark erhöht, andererseits nimmt das Risiko einer frühembryonalen Mortalität infolge genetischer Inkompatibilität deutlich ab (Stockley, 2003). Damit erlangt neben der sozialen Konkurrenz der Männchen vor der Paarung auch die direkte Konkurrenz der Spermien vor der Befruchtung eine evolutionäre Bedeutung (Stockley, 2004).

Die HI ist eine sehr empfindliche und effiziente Methode, um die Auswirkungen verschiedenster Einflüsse auf die Befruchtung zu untersuchen. So konnte der schädliche Einfluss von Alkohol auf die Spermien mit nur zwei Kaninchen gezeigt werden (Cole, 1914). Der Rammler, der Alkoholdämpfen ausgesetzt war, zeugte deutlich weniger Nachkommen als der Kontrollbock. Zusätzlich kann mit der HI auch die Fruchtbarkeit verschiedener Vatertiere untersucht werden. Dabei sind Unterschiede in Libido oder Deckverhalten ausgeschaltet und die Anzahl Spermien kann standardisiert werden (Berger, 1995). Laut Beatty et al. (1969) ist die HI im Vergleich zur homospermen Inseminationen bis 170-mal empfindlicher, um Unterschiede in der Fruchtbarkeit zwischen zwei Stieren zu erkennen.

Zur Bestimmung der Vaterschaftsverteilung nach HI muss die Abstammung der Nachkommen zwingend bestätigt werden. In der Regel dominiert ein bestimmtes Vatertier, selbst wenn das Mischverhältnis der Ejakulate und die Samenqualität vergleichbar sind. Diese Überlegenheit ist reproduzierbar und konnte bei verschiedenen Spezies gezeigt werden (Berger, 1995; Vicente et al., 2004). Untersuchungen beim Hahn (Martin, 1974) haben gezeigt, dass sich die Vaterschaft je nach Mischverhältnis der Ejakulate änderte. Bei einem Mischverhältnis der Ejakulate von 50% zu 50% betrug das Vaterschaftsverhältnis nach HI 3:7 und bei einem Verhältnis von 70% zu 30% schlüpften Küken mit einem Verhältnis von 1:1 (Martin et al., 1974).

Vorhandene Unterschiede in der Fruchtbarkeit von Vatertieren werden durch verschiedene Faktoren wie Transport und Vitalität der Spermien im weiblichen Genitaltrakt, Eintritt und Ablauf der Kapazitation sowie durch den eigentlichen Befruchtungsvorgang beeinflusst. Overstreet und Adams (1971) konnten mit Versuchen beim Kaninchen zeigen, dass 6 Stunden nach einer HI die Verteilung der Spermien von zwei Böcken in verschiedenen Abschnitten des weiblichen Genitaltraktes gleich war. Nach 13 Stunden jedoch fanden sich in allen Abschnitten mehr Spermien des fruchtbareren Bockes. Auch war die Anzahl akzessorischer Spermien sowohl nach vaginaler wie auch nach intratubaler Insemination beim fruchtbareren Bock höher (Overstreet und Adams, 1971). Beim Rind korreliert die Menge der akzessorischen Spermien zum Zeitpunkt der Befruchtung direkt mit der Embryonenqualität (DeJarnette et al., 1992; Nadir et al., 1993) und beim Eber kann die Fruchtbarkeit anhand der Anzahl akzessorischer Spermien nach HI zuverlässiger bestimmt werden als anhand der Befruchtungsrate nach homospermen Besamungen (Stahlberg et al., 2000). Diese und andere Untersuchungen (Parrish und Foote, 1985; Davis et al., 1987) zeigen, dass die Vitalität der Spermien und die Penetration der Eizelle, nicht aber der Spermientransport im weiblichen Genitaltrakt die entscheidenden Faktoren für die Vaterschaft nach HI sind. Individuelle Unterschiede in der Kapazitation der Spermien verschiedener Vatertiere sollen jedoch keinen Einfluss auf die Fruchtbarkeit haben (Dziuk, 1965; Parrish und Foote, 1985, 1986; Robl und Dziuk, 1987).

Untersuchungen zur Korrelation zwischen verschiedenen Samenqualitätsparametern und der Fruchtbarkeit nach HI haben gezeigt, dass Spermien hochfertiler Stiere eine höhere Motilität sowie eine bessere Membran- und DNA-Integrität aufweisen als jene

weniger fruchtbarer Stiere (Ballachey et al., 1988; Januskauskas et al., 2001; Kasimanickam et al., 2006). Es gilt jedoch zu beachten, dass sich die Überlegenheit eines Vatertieres in einem Samengemisch durch die Kryokonservierung des Samens ändern kann (Beatty et al., 1976). Auch haben verschiedene Untersuchungen beim Rind (Beatty et al., 1969), Schwein (Martin und Dziuk, 1977), Kaninchen (Beatty, 1960) und Huhn (Martin und Dziuk, 1977) gezeigt, dass die Fruchtbarkeit der Vatertiere nach HI direkt mit der Konzeptionsrate nach homospermer Insemination korreliert (Beatty, 1960; Beatty et al., 1969; Martin und Dziuk, 1977). Daraus entwickelten Flint et al. (2003) ein mathematisches Modell zur Berechnung eines heterospermen Indexes beim Rind aus möglichst wenigen Inseminationen. Dazu wurden 15 Tage nach HI die Embryonen gewonnen und die Abstammung bestimmt. Um eine signifikante Aussage über den überlegenen Stier eines Zweierpaares zu treffen, benötigten die Autoren 17 Embryonen, die entweder von 34 nicht superovulierten oder von 5 superovulierten Spendertieren stammten (Flint et al., 2003). Auch die Kombination von *in vitro* Fertilisation und HI ist besonders geeignet, aus mehreren Vatertieren das fruchtbarste Tier zu identifizieren (Robl und Dziuk, 1987).

Ob das Muttertier die Vaterschaft der Nachkommen nach HI mitbestimmt, wurde beim Schaf näher abgeklärt. Dazu wurden Auen in 2 aufeinanderfolgenden Zuchtsaisons mit Mischsamen von Merino und Suffolk Widdern belegt und die Vaterschaft der Lämmer bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Verteilung der Vaterschaft beim Nachwuchs in beiden Jahren unterschiedlich war, was darauf hinweist, dass das Muttertier bei HI keinen wesentlichen Einfluss auf die Vaterschaft der Nachkommen hat (Berger und Dally, 2001).

Da nach HI die fruchtbarsten Stiere identifiziert werden können und damit eine Optimierung des Besamungserfolges möglich ist, stand diese Methode immer schon im Interesse von Besamungsorganisationen. In der Schweiz lancierte Swissgenetics 2004 das neuartige Mischsamenprodukt SILIAN. Es handelte sich dabei um ein Mischejakulat dreier ausgewählter Stiere mit hoher Fruchtbarkeit der Rassen Simmentaler Mast (SI), Limousin (LI) und Angus (AN). Durch den Einsatz von SILIAN erhoffte man sich eine erhöhte Fruchtbarkeit bei Milchkühen mit Fruchtbarkeitsproblemen. In einer früheren Arbeit (Scherrer und Wagner, 2005) konnte gezeigt werden, dass SILIAN betreffend Besamungserfolg deutlich über dem Durchschnitt der Vergleichsstiere lag. Zudem war die Non-Return-Rate von SILIAN

+1.8 % höher als diejenige des besten Stieres im Gemisch. SILIAN hatte sich im Markt rasch durchgesetzt, so dass das Samenlager schnell aufgebraucht war. Als Nachfolgeprodukt erfolgte 2006 die Einführung von SILIAN-2 mit anderen Stieren, jedoch der gleichen Rassenzusammensetzung.

### **3.2 Fragestellung**

Im Rahmen der Produktion von SILIAN-2 war das Ziel vorliegender Studie folgende Fragen näher abzuklären:

- Wie gut ist die Samenqualität von SILIAN-2 und im Vergleich zu derjenigen der beteiligten Stiere?
- Wie häufig können die Nachkommen von SILIAN-2 einem der drei Stiere zugeordnet werden?
- Wie hoch ist die Non-Return-Rate von SILIAN-2 im Vergleich zu denjenigen der beteiligten Stiere?
- Lassen sich mögliche Unterschiede der Vaterschaftsverteilung und der Non-Return-Raten einzelner Stiere durch die Samenqualität erklären?

## **4 Tiere, Material und Methoden**

### **4.1 Tiere**

Für die Produktion von SILIAN-2 standen drei Stiere der Fleischrassen Simmentaler Fleckvieh (SI), Limousin (LI) und Angus (AN) zur Verfügung. Alle drei Stiere mussten positiv nachzuchtgeprüft sein, eine hohe Non-Return-Rate (NRR) aufweisen, einen leichten Geburtsablauf haben und Samen in genügender Menge und von guter Qualität produzieren. Weiter sollte der Vater der Kälber aufgrund der Fellfarbe einfach zu identifizieren sein, damit die Abstammung korrekt in die Tierverkehrsdatenbank übertragen werden kann. Aufgrund dieser Bedingungen wurden für SILIAN-2 CH 900.2000.0000.3 die Stiere EDLOCK CH 120.0314.7268.2 (SI), GLOBI CH 120.0193.4574.8 (LI) und NEW TRANSIT DE 9837.9929.5 (AN) ausgewählt. Die Stiere wurden in der Besamungsstation von Swissgenetics in Mülligen in Anbindehaltung auf Stroh gehalten und regelmässig im Karussell bewegt. Die tägliche Futterration pro Stier setzte sich aus Heu, Grassilage, 1.5-2 kg Maiswürfel, 1-1.5 kg Kraftfutter sowie Mineralstoff- und Vitaminsubstituierung zusammen.

### **4.2 Gewinnung, Untersuchungen und Verarbeitung der Ejakulate**

#### **4.2.1 Samengewinnung**

Für die Samenproduktion wurden die Stiere regelmässig zweimal in der Woche mittels künstlicher Scheide (Scheideninnentemperatur 40-42°C) abgesamt. Vor der Samengewinnung wurden die Stiere ca. 30 Minuten in der Sprunghalle angebunden und anschliessend mit mehreren sogenannten „Leersprüngen“ sexuell stimuliert. Dabei erfolgte der Aufsprung nach individuellen Vorlieben auf ein Phantom oder auf einen männlichen Artgenossen als Deckpartner. Unmittelbar nach der Gewinnung des Ejakulates wurde dieses elektronisch mittels Ohrmarkenscanner erfasst, das Samenröhrchen etikettiert und zur Weiterverarbeitung in der Laborschleuse bei 38°C inkubiert.



#### 4.2.2 Untersuchung der Ejakulate

Im Produktionslabor von Swissgenetics wurde die Qualität der frisch gewonnenen Ejakulate grobsinnlich auf Farbe, Menge und Beimengungen untersucht sowie Dichte und Motilität bestimmt. Zur Bestimmung des Volumens wurde das Ejakulat gewogen (Mettler Toledo PB 1501-S, Mettler Toledo GmbH, Schweiz) und mit dem Faktor 1.05 für das spezifische Gewicht von Stiersamen multipliziert. Die Bestimmung der Spermiedichte erfolgte mit Hilfe eines Spektrophotometers (Accucell, IMV Technologies, Aîgle, Frankreich). Zur Bestimmung der Motilität wurde ein kleiner Tropfen Ejakulat auf einen vorgewärmten Objektträger gegeben, mit einem Deckglas versehen und der Prozentsatz an vorwärtsbeweglichen Samenzellen im Phasenkontrastmikroskop (Axiolab, Carl Zeiss AG, Feldbach, Schweiz) bei 100- und 200-facher Vergrößerung geschätzt. Zusätzlich erfolgte eine grobe Beurteilung der Spermienmorphologie. Sämtliche Ejakulate mussten für die Weiterverarbeitung folgende Qualitätsanforderungen erfüllen:

Mindestvolumen  $\geq 1$  ml, Dichte  $>300'000$  Spermien/ $\mu$ l, Motilität  $>75\%$ , keine von Auge sichtbaren Beimengungen und nur geringe morphologische Abweichungen. Alle Ejakulatdaten wurden über das Computerprogramm SMILE (IMV Technologies, Aîgle, Frankreich) elektronisch erfasst und gespeichert.

#### 4.2.3 Verarbeitung der Ejakulate

Von Mai 2006 bis Oktober 2007 wurde von den drei Stieren wöchentlich sowohl homospermer Samen wie auch heterospermer Mischsamen kryokonserviert. Für die Herstellung homospermer Dosen wurden die Ejakulatanteile mit Triladyl<sup>®</sup> (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) -Eigelb Medium (250 g Triladyl<sup>®</sup>, 750 ml bi-distilliertes Wasser, 250 ml Eigelb) auf eine Endkonzentration von 71 Millionen Spermien pro ml verdünnt. Dies entspricht einer Besamungsdosis von 15 Millionen Spermien pro 0.25 ml Paillette mit einem Nutzvolumen von 210  $\mu$ l.

Für SILIAN-2 Dosen wurden Ejakulatanteile mit gleicher Spermienzahl von GLOBI, EDLOCK und NEW TRANSIT gemischt und mit Triladyl<sup>®</sup>-Eigelb Medium auf eine Endkonzentration von 114 Millionen Spermien pro ml verdünnt. Eine Besamungsdosis SILIAN-2 bestand daher aus insgesamt 24 Millionen Spermien, wobei jeder der drei Stiere einen Anteil von 8 Millionen Spermien zum Mischsamen beitrug. Das Samengemisch war für die Besamung von Milchkühen vorgesehen, um

eine gute Fruchtbarkeit und einen möglichst hohen Schlachterlös der Kälber zu erzielen.

Die Konfektionierung in 0.25 ml Pailletten erfolgte maschinell (MRS 3, IMV Technologies, Aîgle, Frankreich) bei einer Raumtemperatur zwischen 18°C und 22°C. Die Pailletten wurden auf Racks verteilt und 5 Racks zusammen in einer Kartonschachtel während 4 Stunden im Kühlraum auf 4°C abgekühlt und aequilibriert. Anschliessend an die Aequilibrationszeit erfolgte die computergesteuerte Samengefrierung (Digitcool 5300 3T, IMV Technologies, Aîgle, Frankreich). Während insgesamt 7 Minuten wurden die Pailletten vorerst von +4°C auf -10°C mit einer Abkühlgeschwindigkeit von -5°C/min, weiter von -10°C auf -110°C mit -40°C/min und schliesslich von -110°C bis -140°C mit -20°C/min abgekühlt. Die Lagerung der Pailletten erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

### **4.3 Untersuchungen im Gefriersamen**

Für die Untersuchungen des aufgetauten Samens standen Pailletten von 64 Produktionsdaten zur Verfügung. Von jedem Stier und von SILIAN-2 wurden je 3 Samendosen von vier aufeinanderfolgenden Daten während 25 Sekunden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und der Inhalt in je 16 Pools zusammengegeben (Tab. 1).

Tabelle 1: Probenpools für die Untersuchungen.

Pool	Produktionsdatum			
1	30.05.2006	07.06.2006	13.06.2006	20.06.2006
2	27.06.2006	04.07.2006	11.07.2006	18.07.2006
3	25.07.2006	03.08.2006	08.08.2006	15.08.2006
4	22.08.2006	29.08.2006	05.09.2006	12.09.2006
5	26.09.2006	03.10.2006	10.10.2006	17.10.2006
6	24.10.2006	31.10.2006	07.11.2006	14.11.2006
7	21.11.2006	28.11.2006	19.12.2006	28.12.2006
8	04.01.2007	09.01.2007	16.01.2007	23.01.2007
9	30.01.2007	06.02.2007	13.02.2007	27.02.2007
10	06.03.2007	13.03.2007	20.03.2007	27.03.2007
11	03.04.2007	17.04.2007	24.04.2007	01.05.2007
12	22.05.2007	30.05.2007	05.06.2007	12.06.2007
13	19.06.2007	26.06.2007	03.07.2007	10.07.2007
14	17.07.2007	24.07.2007	31.07.2007	07.08.2007
15	21.08.2007	27.08.2007	04.09.2007	11.09.2007
16	18.09.2007	25.09.2007	02.10.2007	09.10.2007

Aus jedem Pool wurden nach 30 Sekunden Mischen auf dem Vortex-Schüttler 10 µl Samenprobe für die Bestimmung der DNA-Integrität entnommen. Nach erneutem Mischen wurden je zwei Proben von 37.5 µl entnommen und für weitere Untersuchungen mit und ohne Induktion der Akrosomreaktion in ein 1.5 ml Eppendorfröhrchen gegeben.

a) Ohne Induktion der Akrosomreaktion

Eine Probe von 37.5 µl wurde jeweils in einem Verhältnis von 1:40 mit TALP-Ca (Tab. 2) Medium verdünnt und während 6 Stunden im geschlossenen Eppendorfröhrchen bei 37°C inkubiert.

Tabelle 2: Zusammensetzung TALP-Ca Medium.

NaCl	97.40 mM
KCl	3.10 mM
NaHCO <sub>3</sub>	24.90 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·x H <sub>2</sub> O	0.15 mM
Na-Laktat	25.30 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10.00 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.40 mM
HEPES	10.00 mM
Na-Pyruvat	0.20 mM
Glucose	5.00 mM
Bovines Serumalbumin	0.30 % (w/v)

#### b) Mit Induktion der Akrosomreaktion

Der anderen Probe von 37.5 µl wurden jeweils 1.5 ml TALP-Ca (Tab. 2) und 10 µM Ionomycin (I-24222, Invitrogen, Basel) zugefügt, gemischt und während 6 Stunden im geschlossenen Eppendorfröhrchen bei 37°C inkubiert. Ionomycin ist ein Kalzium-Ionophor, das mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen Komplexe bildet und diese durch die Plasmamembran der Spermien transportiert. Die Zugabe von Ionomycin führt zu einer raschen Anreicherung von Kalzium im Zytosol der Spermien, wodurch die Akrosomreaktion induziert wird (O'Toole et al., 2000).

Von den Proben mit und ohne Induktion der Akrosomreaktion wurden zu Beginn der Inkubation sowie 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Stunden später je 50 µl zur Bestimmung der Spermienmotilität und je 10 µl für die durchflusszytometrischen Analysen der Membran- und Akrosomintegrität sowie des intrazellulären Kalziumgehaltes der Spermien entnommen.

#### 4.3.1 Motilität

Die Bestimmung der Motilität der Spermien erfolgte mittels computerassistierter Spermienanalyse (CASA, Hamilton Thorne IVOS, Version 14, Beverly, MA, USA). Um Fehlzählungen von Eigelbpartikeln des Verdünners durch das System zu

vermeiden, wurden die Spermien mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff auf der Basis von Hoechst 33342 (IDENT™, Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA) angefärbt (Tardif et al., 1998). Dazu wurde eine Färbelösung mit 1 ml Kulturmedium (Embryo Holding Medium ART 019449, IMV, Aîgle, Frankreich) und 40 µg IDENT hergestellt. 50 µl der Färbelösung wurden zu 50 µl Samen gegeben und während 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden je 5 µl der gefärbten Samenprobe in eine standardisierte Kammer von 20 Mikrometer Tiefe (standard count analysis chambers, Art. no. SC 20-01-C, Leja, Nieuw-Vennep, Niederlande) gegeben und mindestens 10 Felder und 200 Spermien mit dem CASA beurteilt. Die Messungen erfolgten mit den Analyseinstellungen für Stiersamen und IDENT-Färbung gemäss Herstellerangaben des Gerätes (Tab. 3). Für die Auswertung wurden die Parameter totale Motilität, progressive Motilität, rapide Motilität (rapid cells, velocity average path VAP > 50 µm/s), die Spurgeschwindigkeit (velocity curvilinear, VCL), die Pfadgeschwindigkeit (velocity average path, VAP), die Progressivgeschwindigkeit (velocity straight line, VSL) sowie die seitliche Kopfauslenkung (amplitude of lateral head displacement, ALH) berücksichtigt.

Tabelle 3: Analyse-Einstellungen CASA für mit IDENT™ angefärbten Stiersamen.

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Frames per second	60	Min. intensity gate	0.30
Number of frames	30	Max. intensity gate	1.70
Minimum contrast	20	Min. size gate	0.10
Minimum size	5pix	Max. size gate	3.40
Default cell size	5pix	Min. elongation gate	8
Default cell intensity	70	Max. elongation gate	97
VAP	50	Standard objective	10x UV
STR	70	Target photometer	45-55
Slow Cells	static	Field type	dark
VAP Cut Off	30	Chamber depth	20
Temperature	37		

### 4.3.2 Membran-, Akrosomintegrität und intrazellulärer Kalziumgehalt

Die Bestimmung der Membran- und Akrosomintegrität sowie des intrazellulären Kalziumgehaltes der Spermien erfolgte im Durchflusszytometer mit Hilfe der Mehrfachfärbung SYTO<sup>®</sup>60/PI/PNA-PE/FLUO-4. Der Farbstoff SYTO<sup>®</sup>60 färbt die DNA aller Spermien und emittiert nach Laseranregung Licht im Wellenbereich um 755 nm. Propidium-Iodid (PI) durchdringt beschädigte Zellmembranen und bindet an die DNA toter Spermien, so dass diese nach Anregung im Wellenbereich um 620 nm fluoreszieren. PNA-PE besteht aus Arachis hypogaea Lektin (PNA), das selektiv an die äussere Akrosommembran bindet und einem daran gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff (PE), der nach Laseranregung im Wellenbereich um 575 nm emittiert. Der veresterte Farbstoff FLUO-4-AM (1-[2-Amino-5-(difluoro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methyl-phenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetra-aceticacidpentaacetoxymethylester) bindet an Kalziumionen und wird durch die Zellmembran transportiert. Im Zytoplasma erfolgt die Abspaltung der Estergruppe durch zelleigene Esterasen. Dabei ist die Konzentration an freiem Fluoreszenzfarbstoff FLUO-4 proportional zum intrazellulären Kalziumgehalt (Fukami et al., 2003) und kann nach Anregung mit einem Argonionenlaser im Wellenbereich um 525 nm gemessen werden.

Bei vitalen und akrosomintakten Spermien ist die Plasmamembran nur für SYTO<sup>®</sup>60, nicht aber für PNA-PE oder PI permeabel. Spermien mit intakter Plasmamembran und intaktem Akrosom färben sich somit nur mit SYTO<sup>®</sup>60 und fluoreszieren bei 755 nm. Kommt es bei vitalen Spermien im Rahmen der Akrosomreaktion zur Vesikulation, kann sich PNA an die äussere Akrosommembran binden, so dass diese Spermien ein PE-positives Signal (575 nm) zeigen. Spermien mit geschädigter Plasmamembran, die aber noch Teile der äusseren Akrosommembran besitzen, zeigen ein positives PI (620 nm) und PE Signal (575nm). Spermien deren Plasmamembran geschädigt ist und deren Akrosom völlig degeneriert, verloren oder auch vollkommen intakt ist, lassen sich nur mit PI anfärben (Cheng et al., 1996; Garner et al., 1999). Durch die zusätzliche Färbung mit FLUO-4 AM kann bei den vitalen Spermien die Intensität der Fluoreszenz von FLUO-4 direkt als Mass für den intrazellulären Kalziumgehalt verwendet werden (Baarz, 2006).

Zur Herstellung der Färbelösung wurden 10 ml TALP-HEPES-Pufferlösung mit 1 µl SYTO<sup>®</sup>60 (S11342, Invitrogen, Basel), 10 µl Propidium Iodid (P3566, Invitrogen,

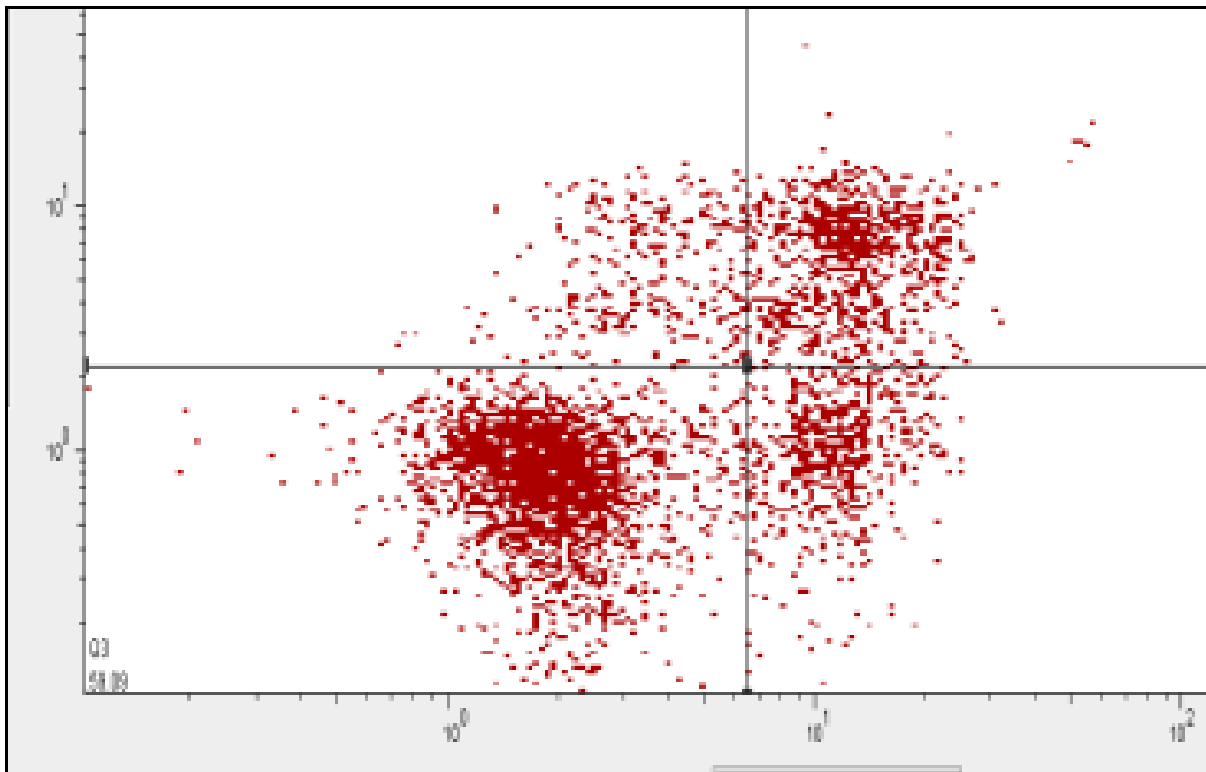
Basel), 10 µl FLUO-4 AM (F-14217, Invitrogen, Basel) und 2 µl PNA-PE (P 44 BOM, Stehelin & Cie AG, Basel) gemischt. Danach wurden 10 µl der Samenprobe zu 200 µl Färbelösung in eine Mikrotiterplatte gegeben, gemischt und während 15 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Alle Messungen erfolgten mit dem Durchflusszytometer Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc., Fullerton Kanada, USA). Das Gerät ist mit einem Argonionen- (488nm) sowie einem Helium-Neon-Laser (633 nm) ausgestattet und kann fünf verschiedene Fluoreszenzen messen (525 nm, 575 nm, 620 nm, 675 nm, 755 nm). Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software FlowJo7.2.2 (TreeStar Inc., Ashland, Oregon, USA). Von jeder Probe wurden 5'000 Spermien auf die Integrität von Plasmamembran und Akrosom untersucht und in vier verschiedene Populationen eingeteilt (Baarz, 2006). Die Zuordnung zu den einzelnen Subpopulationen erfolgte mit Hilfe des Analyseprogramms FlowJo 7.2.2 wie folgt:

- Spermien mit intakter Plasmamembran und intaktem Akrosom (PI und PNA-PE neg.)
- Spermien mit intakter Plasmamembran und reagiertem Akrosom (PI neg. und PNA-PE pos.)
- Spermien mit defekter Plasmamembran und reagiertem Akrosom (PI und PNA-PE pos.)
- Spermien mit defekter Plasmamembran und Akrosomverlust (PI pos. und PNA-PE neg.).

Bei den vitalen Spermien mit intaktem Akrosom (PI und PNA-PE neg.) wurde als Mass für den intrazellulären Kalziumgehalt die mittlere Fluoreszenzintensität von FLUO-4 im Detektor FL-1 (525 nm) bestimmt.

In Abbildung 1 sind die vier verschiedenen Subpopulationen dargestellt, die sich nach Färbung mit SYTO<sup>®</sup>60/PI/PNA-PE/FLUO-4 und durchflusszytometrischer Analyse unterscheiden lassen. Links unten sind die vitalen und akrosomintakten Spermien (PI und PNA-PE neg.), links oben die vitalen und akrosomreagierten (PI neg. und PNA-PE pos.), rechts oben die toten und akrosomreagierten (PI und PNA-PE pos.) und rechts unten die toten Spermien mit aufgelöstem Akrosom (PI pos. und PNA-PE neg.) zu erkennen.

Abbildung 1: Verschiedene Subpopulationen nach durchflusszytometrischer Analyse von angefärbten Spermien mit SYTO<sup>®</sup>60/PI/PNA-PE/FLUO-4.



#### 4.3.3 DNA-Integrität

Die Beurteilung der DNA-Integrität der Spermien wurde mittels durchflusszytometrischer Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA<sup>™</sup>) durchgeführt (Evenson et al., 1994, 2002). Dieses Analyseverfahren beruht auf dem Prinzip, dass abnormal strukturiertes Chromatin in situ eine höhere Empfindlichkeit für eine physikalisch oder chemisch induzierte Denaturierung besitzt, als normal verdichtetes Chromatin. Eine Denaturierung der DNA durch Säure führt zur teilweisen Auftrennung der normalerweise doppelsträngig vorliegenden DNA in Einzelstränge. Bei der anschließenden Färbung mit Akridinorange kommt es zu einer Anlagerung des Farbstoffs an die DNA. Doppelsträngige DNA emittiert Licht im Wellenbereich um 525 nm (grün), einzelsträngige DNA hingegen zeigt eine Fluoreszenz bei 675 nm (rot). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wird die Intensität der verschiedenen Fluoreszenzen gemessen und für jedes Spermium der Anteil der roten Fluoreszenz an der gesamten Fluoreszenz (rot und grün) bestimmt und mit einer Zahl zwischen 0 und 1 angegeben. Dieser Wert wird als DNA-Fragmentations-Index (DFI-Wert)



bezeichnet (Evenson et al., 2002). Die DFI-Werte der einzelnen Spermien werden in einem Histogramm dargestellt und in eine Spermienpopulation mit niedrigen und erhöhten DFI-Werten aufgeteilt. Aus dem Histogramm lässt sich der prozentuale Anteil an Spermien mit erhöhtem DFI-Wert (DFI %) ableiten.

Für die Durchführung des SCSA<sup>TM</sup> wurden 10 µl der Samenprobe mit 200 µl eines Säuredetergens (Aqua dest, NaCl, Triton-X100, HCl N2, pH = 1.2) während 30 Sekunden auf einem Vortex-Schüttler gemischt. Anschliessend wurden 600 µl (10 mg/ml) Akridinorange (A6014, Sigma Aldrich, Buchs, Schweiz) hinzugefügt und während 3 Minuten inkubiert. Für jede Probe wurden 5'000 Spermien im Durchflusszytometer Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc., Fullerton Kanada, USA) mit Filtern von 525 nm (grüne Fluoreszenz) sowie 675 nm (rote Fluoreszenz) und mit einer Durchflussrate von 200-300 Zellen pro Sekunde analysiert. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software FlowJo7.2.2 (TreeStar Inc., Ashland, Oregon, USA).

#### **4.4 Bestimmung der Vaterschaft der Kälber von SILIAN-2**

Zur Überprüfung der Fruchtbarkeit der SILIAN-2 Stiere EDLOCK, GLOBI und NEW TRANSIT wurde bei einer Stichprobe der Kälber von SILIAN-2 die Vaterschaft phänotypisch und molekulargenetisch bestimmt. Dazu erfolgte mit Hilfe der Tierverkehrsdatenbank (TVD) die Identifizierung von Kälbern, bei denen der Landwirt im Zeitraum vom 03.02.2010 bis zum 23.02.2010 SILIAN-2 als Vater angegeben hatte. Durch Abfragen der TVD-Nummer der Mutter des Kalbes in der Datenbank von Swisshgenetics wurde zusätzlich überprüft, ob das Kalb tatsächlich aus einer SILIAN-2 Besamung stammt und wie häufig das Muttertier vorher belegt worden war. Da Nachkommen schwarz-weisser Kühe aufgrund der dominanten schwarzen Fellfarbe phänotypisch schwierig einem Vater zuzuordnen sind, wurden nur Kälber von braunen und rotweissen Müttern weiter berücksichtigt. Anhand der Rassezugehörigkeit der Mutter erfolgte eine Einteilung in 2 Gruppen:

- Kälber von braunen Müttern der Rassen Brown Swiss (BS) und Original Braunvieh (OB)

- Kälber von rotweissen Müttern der Rassen Red Holstein (RH), Schweizer Fleckvieh (SF) und Simmentaler Fleckvieh (SI).

Es wurden zudem bewusst möglichst junge Kälber ausgewählt, um eine Vorselektion der Kälber aufgrund von Geschlecht oder Masteeigenschaften zu verhindern und um die Probenerhebung zu erleichtern.

#### **4.4.1 Phänotypische Bestimmung der Vaterschaft**

Im Zeitraum vom 6.3.2010 bis zum 19.3.2010 wurden insgesamt 237 Kälber von rotweissen und 201 Kälber von braunen Müttern auf den Herkunftsbetrieben beurteilt. Die Kälber waren zwischen dem 27.10.2009 und dem 23.02.2010 geboren worden und wurden anhand der Ohrmarkennummer, des Geburtsdatums und der Mutter eindeutig identifiziert. Der Phänotyp des Kalbes wurde anhand der Fellfärbung und dem Vorhandensein von Hornanlagen bestimmt. Letzteres weil die Stiere EDLOCK und NEW TRANSIT heterozygot bzw. homozygot hornlos sind.

#### **4.4.2 Genetische Bestimmung der Vaterschaft**

Die Vaterschaft der Kälber wurde durch den Nachweis von Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotid polymorphism, SNP) im Erbgut bestimmt. SNP's sind die am häufigsten auftretenden Variationen im Genom. Sie sind charakterisiert durch den Austausch einer einzelnen Base in der DNA und können durch ihre flankierenden Sequenzen eindeutig definiert werden. Solange diese Punktmutationen zu keinem Nachteil für das Individuum führen (nonsense-Mutationen), werden sie beibehalten und weitervererbt. Durch den Nachweis dieser SNP's können Stiere und damit die von ihnen abstammenden Kälber eindeutig identifiziert werden. Bei einer SNP-Genotypisierung werden definierte Sequenzen überprüft und mit einem digitalen Code versehen. Ein Individuum ist anhand seines Codes eindeutig identifizierbar. Pro SNP existiert die Information 0 / 1 / 2 / 5. Dabei gilt nach amerikanischer Konvention: 0 = homozygot, BB; 1 = heterozygot, AB; 2 = homozygot, AA; 5 = Genotyp unbekannt / nicht zugeordnet (Ghazalpour et al., 2006). Für die Bestimmung der Abstammung ist von Vorteil, wenn Sequenzen überprüft werden, die beim Vater homozygot für das eine Allel (BB = 0) und bei der Mutter

homozygot für das andere Allel (AA = 2) codieren. Sind die Nachkommen heterozygot (AB = 1), muss der Überprüfte der Vater sein.

### **Probenerhebung**

Für die genetische Analyse wurde anlässlich der phänotypischen Beurteilung der Kälber mit einem Tupfer (Evidence Collection forensiX (d), Tube, Prod. No. 9022010, Prionics AG, Schlieren, Schweiz) ein Abstrich von der Nasenschleimhaut entnommen. Die Proben wurden zur eindeutigen Identifizierung mit der Ohrmarkennummer des Kalbes, sowie dem Namen und der Postleitzahl des Herkunftsbetriebes beschriftet und bis zur Analyse bei Raumtemperatur gelagert.

### **DNA-Extraktion**

Die DNA-Extraktionen erfolgten im Labor für Spezialanalytik der Qualitas AG in Zug unter Leitung von Dr. Hannes Jörg. Die Watte mit dem Probenmaterial wurde vom Tupfer abgelöst und in zufälliger Reihenfolge in durchnummerierte Eppendorfröhrchen gegeben. Zum Probenmaterial wurden 970 µl Extraktionspuffer (Tris 10.0 mM und EDTA 10.0 mM bei pH 8.0, Sodiumdodecylsulfat 1 % und NaCl 100 mM), 20 µl DL-Dithiothreitol Solution 1.0 M (entspricht 20 mM) und 10 µl Proteinkinase K (20 mg/ml) pipettiert. Das Gemisch wurde bei 60°C während mindestens 8 Stunden im Wasserbad inkubiert. Zur Ausfällung der DNA wurden 400 µl Inkubationslösung mit 1000 µl Ethanol 100% versetzt und bei 13'000 Umdrehungen/min während 5 Minuten zentrifugiert. Die als Pellet ausgefällte DNA wurde mit 100 µl TE-Puffer (Tris 10.0 mM und EDTA 1.0 mM bei pH 8.0) versetzt und während weiteren 48 Stunden im Wasserbad bei 60°C inkubiert. Die Röhrchen wurden wiederum bei 13'000 Umdrehungen/min während 5 Minuten zentrifugiert und der gesamte Inhalt in eine 96er Mikrotiterplatte umpipettiert. Dabei wurden die Proben nach dem Phänotyp des Kalbes sortiert aufgetragen.

### **Synthese der Primer**

Die DNA der drei SILIAN-2-Stiere EDLOCK, GLOBI und NEW TRANSIT wurde im Labor analog zu den Nasentupferproben der Kälber aus je 460 µl Sperma extrahiert. Die Genotypisierung wurde vom National Centre of Competence in Research (NCCR) an der Universität Genf gemäss Illumina Protokoll vorgenommen. Je 54001 SNP's wurden bei den drei Stieren charakterisiert und erfasst. Daraus wurden

Sequenzen für jeden einzelnen Stier identifiziert, die homozygot verschieden zu den anderen beiden Stieren und zur Population der Muttertiere codierten. Aus Tabelle 4 sind die identifizierten Sequenzen mit der Bezeichnung der SNPs, die betreffenden Chromosomen, der Genotyp der Stiere in der jeweiligen Sequenz und die Anzahl Tiere aus der Braunvieh und Fleckvieh Population mit Genotyp 0, 1, 2 oder 5 ersichtlich.

Tabelle 4: Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP), betreffende Chromosomen und Genotypen (0, 1, 2, 5) bei GLOBI, EDLOCK und NEW TRANSIT sowie Anzahl Tiere mit den verschiedenen Genotypen in der Braunvieh und Fleckvieh Population.

SNP	Chromosom	Stier			Braunvieh, Anzahl Genotyp					Fleckvieh, Anzahl Genotyp				
		GLOBI	EDLOCK	NEW TRANSIT	0	1	2	5	Total	0	1	2	5	Total
BTB-00435823	10	0	2	2	0	4	1729	1	1734	0	3	1556	4	1563
Hapmap26533-BTC-009833	14	0	2	2	0	0	1727	7	1734	0	6	1553	4	1563
BTB-00186757	4	2	0	2	0	2	1730	2	1734	3	78	1475	7	1563
Hapmap58317-rs29013261	3	2	0	2	1	189	1531	13	1734	3	66	1491	3	1563
ARS-BFGL-NGS-113203	5	2	2	0	0	0	1733	1	1734	0	0	1560	3	1563
BTB-01566038	20	2	2	0	0	0	1733	1	1734	0	0	1560	3	1563
ARS-BFGL-BAC-13286	14	2	0	0	1730	0	0	4	1734	1552	8	0	3	1563
BTB-01883760	21	2	0	0	1722	9	0	3	1734	1538	18	0	7	1563
ARS-BFGL-NGS-119775	4	0	2	0	1624	106	1	3	1734	1452	106	2	3	1563
ARS-BFGL-NGS-26045	13	0	2	0	1631	100	2	1	1734	1508	47	2	6	1563
Hapmap59591-rs29018854	5	0	0	2	1733	0	0	1	1734	1561	0	0	2	1563
ARS-BFGL-NGS-113384	7	0	0	2	1729	0	0	5	1734	1561	0	0	2	1563

### **TaqMan<sup>®</sup> Real Time PCR**

Die TaqMan<sup>®</sup> Real Time PCR funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie eine normale PCR (polymerase chain reaction). Ist die gesuchte DNA Sequenz im Untersuchungsmaterial vorhanden, lagern sich Primer an beiden DNA-Strängen an und die Sequenz wird amplifiziert. Im Falle der TaqMan<sup>®</sup> Real Time PCR wird neben den Primern eine TaqMan<sup>®</sup>-Sonde zur fraglichen DNA hinzugegeben. Es handelt sich dabei um ein Oligonucleotid, das aufgrund seiner spezifischen Struktur zwischen den Primern an die gesuchte Sequenz der zu untersuchenden DNA bindet. An der TaqMan<sup>®</sup>-Sonde sind am 5'-Ende ein Reporterfluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende ein entsprechendes Quencher-Molekül angehängt. Der Quencher fängt die Energie des angeregten Fluorochroms ab, so dass diese nicht als Lichtquant emittiert wird (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Ist die gesuchte Sequenz vorhanden, binden Primer und TaqMan<sup>®</sup>-Sonde. In der Folge synthetisieren die DNA-Polymerasen die neuen DNA-Stränge und lösen dabei die TaqMan<sup>®</sup>-Sonde stückweise von der DNA ab. Das Fluorophor und der Quencher werden getrennt, der Quencher kann die Energie nicht mehr abfangen und die Fluoreszenz wird detektierbar. Dabei ist die Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit direkt proportional zur Zunahme der amplifizierten DNA (real time). Werden für zwei Allele der gleichen Sequenz zwei TaqMan<sup>®</sup>-Sonden mit verschiedenen Reporterfluoreszenzfarbstoffen markiert, die in unterschiedlichen Wellenbereichen emittieren, kann im gleichen PCR-Durchgang das Vorkommen beider Allele überprüft werden.

Die Firma Microsynth AG (Balgach, Schweiz) synthetisierte die Primer nach eigenem Protokoll. Die angebotenen Primer und TaqMan<sup>®</sup>-Sonden wurden auf Funktion überprüft und ein Arbeitsprotokoll mitgeliefert. Aus Tabelle 5 sind die verwendeten Primer und Sonden, die Reportermoleküle und Quencher sowie das benötigte Volumen DEPC-behandeltes Wasser für die Herstellung einer Lösung von 100 µM ersichtlich.

Tabelle 5: Verwendete Sonden und Primer für die TaqMan® Real Time PCR.

	Sequenz	Anzahl Basen	Modifikation	DEPC(µl)
<b>GLOBI</b>				
TaqMan®- Sonde Stier	AATTGCAGGCTCAGCCTAAACTGAGA	26	5'6-FAM 3'BHQ1	47
TaqMan®- Sonde Mütter	AATTGCAGGCTCAACCTAAACTGAGA	26	5'Yakima Yellow 3'BHQ1	31
Primer 1	GACCTAAATTCTCACCAAACAGG	23	Keine	84
Primer 2	GTGTTTCCTATTTTCAGGTCACATG	24	Keine	73
<b>EDLOCK</b>				
TaqMan®- Sonde Stier	TGGAGCACAACTCGCTGGTAGTGTT	26	5'6-FAM 3'BHQ1	46
TaqMan®- Sonde Mütter	TGGAGCACAACTCACTGGTAGTGTT	26	5'Yakima Yellow 3'BHQ1	42
Primer 1	GTTGCTGTTTCAGAGATCAGACTG	23	Keine	60
Primer 2	CACTTCACCTAGATCAAAGTTTAAGC	26	Keine	237
<b>NEW TRANSIT</b>				
TaqMan®- Sonde Stier	TGGCCTTACCGAGTTCCTCCTCAGTC	26	5'6-FAM 3'BHQ1	59
TaqMan® Sonde- Mütter	TGGCCTTACCGAGCTCCTCCTCAGTC	26	5'Yakima Yellow 3'BHQ1	41
Primer 1	GAGGATTCAGGGGCGAATGG	20	Keine	110
Primer 2	TCGTGCTGGAAAAGTCAGAGG	21	Keine	110

Beim Reporter-molekül am 5'-Ende der TaqMan®-Sonden der Stiere handelte es sich um 6-Carboxyfluorescein (6-FAM), das ein Absorptionsmaximum bei 494 nm und ein Emissionsmaximum bei 520 nm aufweist. Bei der TaqMan®-Sonde für das andere Allel (für das die Mütter homozygot codieren) wurde Yakima Yellow verwendet, das

ein Absorptionsmaximum bei 530 nm und ein Emissionsmaximum bei 549 nm hat. Als Quencher, der beide Emissionsspektren abdeckt, diente bei allen Sonden 2,5-di-tert-Butylhydroquinon-1 (BHQ1).

Die TaqMan<sup>®</sup> Real Time PCR wurde im Labor des Instituts für Tiergenetik an der ETH Zürich unter Leitung von Dr. Hannes Jörg durchgeführt. Zur Durchführung der TaqMan<sup>®</sup> Real Time PCR wurden die sortierten DNA-Proben mit den Primern und den TaqMan<sup>®</sup>-Sonden des phänotypisch bestimmten Vaters sowie der TaqMan<sup>®</sup>-Sonde der Mütterpopulationen gleichzeitig versetzt. Das gemäss Tabelle 5 benötigte Volumen von sterilem DEPC-behandeltem Wasser (DEPC treated water, Invitrogen, Carlsbad CA, USA) wurde zu den gefriergetrockneten Primern und TaqMan<sup>®</sup>-Sonden dazugegeben, um eine Endkonzentration von 100 µM zu erreichen. Zum Auftauen wurden die Röhrchen einige Minuten in ein 60°C heisses Wasserbad gestellt. Die Platten mit den nach dem Phänotyp sortierten DNA-Proben der Kälber wurden zwei Minuten zentrifugiert (Heraeus Cryofuge 6000i, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA 02454, USA). Anschliessend wurde 1 µl der gelösten DNA in die gleiche Vertiefung einer neuen 96er Mikrotiterplatte umpipettiert und je 10 µl MasterMix (Tab. 6) des entsprechenden Stieres dazugegeben.

Tabelle 6: Master Mix für eine 96er Mikrotiterplatte.

TaqMan <sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase <sup>®</sup> UNG Puffer (Applied Biosystems, Forster City, CA 94404 USA)	500 µl (2X = 50%)
Primer 1 des entsprechenden Stieres	4 µl (400 nM)
Primer 2 des entsprechenden Stieres	4 µl (400 nM)
TaqMan <sup>®</sup> -Sonde des entsprechenden Stieres	1 µl (100 nM)
TaqMan <sup>®</sup> -Sonde der Mütterpopulation	1 µl (100 nM)
DEPC- behandeltes Wasser	490 µl

Die Platten wurden mit einer speziellen hitzebeständigen Folie (Platemax ultraclear sealing film, Axygen Scientific Inc, Union City, California USA) versiegelt und wiederum zwei Minuten zentrifugiert. Anschliessend wurden die Platten im PCR Gerät 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Forster City, CA 94404 USA) gemäss PCR-Protokoll (Tab. 7) analysiert.



Tabelle 7: PCR-Protokoll.

Phase	Zyklen	Temperatur	Zeit (sec)
1	1	95.0 °C	00:20
2	40	95.0 °C	00:03
		60.0 °C	00:30

Mit der dazugehörigen Software (SDS Software v1.4) wurden die Standardeinstellungen für die passenden Filter zu den Reporter-molekülen der TaqMan<sup>®</sup>-Sonde vorgenommen. Es waren dies die Filter Si 1.1 für 6-FAM und Si 2 für Yakima Yellow (Joerg et al., 2003). Als positives Resultat wurde eine identische Zunahme der Fluoreszenz für beide Reporter-moleküle gewertet. Dies bedeutete, dass das Kalb heterozygot und somit vom Stier mit entsprechendem Primer und TaqMan<sup>®</sup>-Sonde, abstammte. War der Abstand zwischen der Fluoreszenzzunahme der beiden Reporter-moleküle grösser als zwei Zyklen oder hatte die Fluoreszenz auf der Vaterseite nicht zugenommen, war das Resultat negativ und das Kalb stammte nicht vom untersuchten Vater ab. In diesem Fall wurde die DNA des Kalbes in beschriebener Weise in drei Vertiefungen einer neuen 96er Mikrotiterplatte pipettiert und die stierspezifischen Primer sowie die entsprechenden TaqMan<sup>®</sup>-Sonden aller drei Stiere dazugegeben und erneut analysiert. Nach diesem zweiten Durchgang konnte jedem Kalb eindeutig ein Vater zugeordnet werden.

#### 4.5 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS 13 (SPSS Inc., IBM Company Headquarters, Chicago, Illinois 60606, USA). Alle Samenqualitätsparameter mit Ausnahme der DNA-Integrität (DFI) wurden dazu nach Stier (EDLOCK, GLOBI, NEW TRANSIT, SILIAN-2), Methode (ohne/mit Induktion der Akrosomreaktion) und Zeitdauer (1-6 Stunden) der Inkubation gruppiert. Mit Hilfe einer Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und eines allgemeinen linearen Modells wurde der Einfluss des Stieres (fixer Effekt), der Methode (fixer Effekt) und des Untersuchungszeitpunktes (zufälliger Effekt) auf die Samenqualitätsparameter untersucht. Vergleiche zwischen den verschiedenen Stieren erfolgten nach einer post-hoc Bonferroni Korrektur. Unterschiede in der DNA-Integrität (DFI) wurden

gesondert mittels Chi-Quadrat-Test untersucht, da es sich um einmalige Messungen handelte.

Die Beurteilung der Fruchtbarkeit der Stiere erfolgte mit Hilfe der Non-Return-Raten. Swisshgenetics wertet jeden Monat die Non-Return-Raten aller ihrer Stiere routinemässig rückwirkend auf die vergangenen 56 Tage mit Hilfe des Programmes vom Canadian Dairy Network (CDN) aus (Schaeffer, 1993; Van Doormaal, 1993). Dabei gilt als Hauptkriterium für die Fruchtbarkeit eines Stieres, wie viele Kühe und Rinder innerhalb dieser Zeitspanne von 56 Tagen nicht wieder besamt wurden (Non>Returns, NR). Der Quotient NR aus Erstbesamungen / Anzahl Erstbesamungen  $\times$  100 ergibt die unkorrigierte Non-Return-Rate ( $NRR_{56}$ ). Als Erstbesamung gilt dabei die erste Besamung nach der Geburt des letzten Kalbes. Da viele Faktoren den Erfolg einer Besamung beeinflussen, wird für die Berechnung der korrigierten NRR ein gemischtes lineares Modell (Van Doormal, 1993) angewendet:

$$Y_{ijklmnopq} = \mu + MO_i + PA_j + PR_k + (RS \times RK)_{lm} + BE_n + h_o + s_{ip} + e_{ijklmnopq}$$

dabei ist

$Y_{ijklmnopq}$	Non Return Code der Erstbesamung Code = 0: Eine Nachbesamung im Zeitraum 3.-56. Tag registriert. Tag der Erstbesamung = Tag 0 Code = 1: Keine Nachbesamung im Zeitraum 3.-56. Tag registriert
$\mu$	Konstante
$MO_i$	fixer Einfluss des Besamungsmonates (12 Klassen)
$PA_j$	fixer Einfluss der Parität (2 Klassen: Rind/Kuh)
$PR_k$	fixer Einfluss des Genetikpreises (10 Klassen)
$(RS \times RK)_{lm}$	fixer Einfluss der Kombination Rasse des Stieres $\times$ Rasse der Kuh (ca. 230 Klassen)
$BE_n$	fixer Einfluss des Besamers
$h_o$	zufälliger Einfluss <sup>2</sup> <sub>h</sub> )
$s_{ip}$	zufälliger Einfluss des Stieres p innerhalb Rasse l (Erwartungswert = 0, Varianz = $\sigma_s^2$ )
$e_{ijklmnopq}$	Resteffekt (zufällig, Erwartungswert = 0, Varianz = $\sigma_e^2$ )

Auf dieser Basis werden bei Swisshgenetics alle Stiere einer Rasse (mit gleichem Rassecode) miteinander verglichen und die Durchschnittliche NRR berechnet. Die

Abweichung der NRR eines Stieres vom Durchschnitt wird als Stierenlösung (L, Lösung) bezeichnet. Bei einer anderen Beschreibung der Stierenlösung wird der Rassedurchschnitt gleich 100 gesetzt und für jeden Stier einen Wert (L100) anhand der korrigierten NRR berechnet. Je nach Anzahl Erstbesamungen können die korrigierten NRR und die Stierenlösungen mit unterschiedlicher Sicherheit (S) angegeben werden. Die Beurteilung der Fruchtbarkeit der Stiere erfolgt bei Swissgenetics monatlich für den letzten Monat sowie für das vergangene Jahr (12 Monate). Zur Beurteilung der Fruchtbarkeit von EDLOCK, GLOBI, NEW TRANSIT und SILIAN-2 wurden die unkorrigierten wie auch die korrigierten  $NRR_{56}$  und die entsprechenden Stierenlösungen für den Zeitraum vom Juni 2008 bis Mai 2009 berechnet. Dabei beziehen sich EDLOCK, GLOBI und NEW TRANSIT jeweils auf ihre Rassebasis, SILIAN-2 auf alle Tiere mit Rassecode xx. Rassebedingte Unterschiede in der Fruchtbarkeit nach Besamungen mit EDLOCK, GLOBI und NEW TRANSIT beim Braun- und Fleckvieh wurden anhand der unkorrigierten  $NRR_{56}$  für den Zeitraum von Beginn des Einsatzes der Stiere bis März 2010 mit Hilfe eines linearen Modells beschrieben und nach Bonferroni post-hoc Korrektur auf Signifikanz geprüft.

Der Vergleich der phänotypischen und genetischen Vaterschaftsbestimmungen der Kälber von SILIAN-2 erfolgte mittels Chi-Quadrat Test. Die Signifikanzschwelle wurde einheitlich bei  $P < 0.05$  gesetzt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Samenqualität

Die Ergebnisse aus dem allgemeinen linearen Modell zur Überprüfung des Einflusses von Stier, Methode (mit/ohne Induktion der Akrosomreaktion) und Zeitdauer der Inkubation sowie die Interaktionen zwischen den verschiedenen Faktoren sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Einfluss von Stier, Methode (mit/ohne Induktion der Akrosomreaktion) und Zeitdauer der Inkubation sowie Interaktionen zwischen den Faktoren.

Parameter	Stier <i>P</i>	Methode <i>P</i>	Zeitdauer Inkubation <i>P</i>	Stier und Methode <i>P</i>	Stier und Zeit <i>P</i>	Methode und Zeit <i>P</i>
Totale Motilität	<.0001*	<.0001*	<.0001*	.1300	.5170	<.0001*
Progressive Motilität	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	.8370	<.0001*
Rapide Motilität	.0002*	<.0001*	<.0001*	.0640	.7820	<.0001*
VAP	.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	.4640	<.0001*
VCL	.0070*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	.3770	<.0001*
VSL	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	.2850	<.0001*
ALH	.0010*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	.0890	<.0001*
Vital und akrosomintakt	<.0001*	<.0001*	<.0001*	.0040*	<.0001*	<.0001*
Vital und akrosomreagiert	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*
Kalziumgehalt	<.0001*	.6124	<.0001*	.0018*	.5180	<.0001*

\*signifikant ( $P < 0.05$ )

Daraus ist ersichtlich, dass der Stier, die Zeitdauer der Inkubation sowie die Interaktion zwischen Methode und Zeitdauer der Inkubation auf alle

Samenqualitätsparameter einen signifikanten Einfluss hatten. Die Methode der Inkubation hatte einen signifikanten Einfluss auf sämtliche Parameter, ausser dem Kalziumgehalt der vitalen und akrosomintakten Spermien. Die Interaktion zwischen Stier und Methode beeinflusste alle Parameter signifikant mit Ausnahme der totalen und rapiden Motilität. Zudem zeigte sich bei den vitalen und akrosomintakten sowie bei den vitalen und akrosomreagierten Spermien eine signifikante Interaktion zwischen Stier und Zeitdauer.

Unterschiede zwischen den Stieren in den verschiedenen Samenqualitätsparametern sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Daraus geht hervor, dass sich GLOBI in allen Parametern signifikant von SILIAN-2 unterscheidet während dies bei NEW TRANSIT in nur 3 Parametern (totale Motilität, vitale und akrosomintakte Spermien, Kalziumgehalt) der Fall war.

Tabelle 9: Unterschiede zwischen den Stieren in den Samenqualitätsparametern.

Parameter	EDLOCK vs. GLOBI <i>P</i>	EDLOCK vs. NEW TRANSIT <i>P</i>	GLOBI vs. NEW TRANSIT <i>P</i>	SILIAN-2 vs. EDLOCK <i>P</i>	SILIAN-2 vs. GLOBI <i>P</i>	SILIAN-2 vs. NEW TRANSIT <i>P</i>
Totale Motilität	<.0001*	>.9999	<.0001*	.0160*	<.0001*	.0250*
Progressive Motilität	<.0001*	>.9999	.0003*	.5770	<.0001*	.5680
Rapide Motilität	<.0001*	>.9999	.0030*	>.9999	<.0001*	>.9999
VAP	.0260*	>.9999	.0160*	.2850	<.0001*	.3890
VCL	.2400	>.9999	.3000	.8030	.0020*	.6570
VSL	.0880	.3510	<.0001*	.0016*	<.0001*	.3680
ALH	>.9999	>.9999	.6970	.0140*	.0001*	.0670
Vital und akrosomintakt	<.0001*	<.0001*	<.0001*	>.9999	<.0001*	.0021*
Vital und akrosomreagiert	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	>.9999
Kalziumgehalt	.0090*	.0002*	>.9999	<.0001*	<.0001*	<.0001*

\* signifikant ( $P < 0.05$ )

## 5.2 Samenqualität der Stiere

### 5.2.1 Totale Motilität

Die Durchschnittswerte der totalen Motilität im aufgetauten Samen der Stiere während 6 Stunden Inkubation ohne und mit Induktion der Akrosomreaktion sind in Abbildung 2 grafisch dargestellt. Unmittelbar nach dem Auftauen wiesen SILIAN-2, EDLOCK und NEW TRANSIT durchschnittliche totale Motilitäten von  $45.2 \pm 1.8$  %,  $45.0 \pm 2.0$  % und  $43.4 \pm 1.6$  % auf, die im Vergleich zu GLOBI mit  $37.4 \pm 1.8$  % signifikant höher waren. Ohne Induktion der Akrosomreaktion nahm die totale Motilität bei allen Stieren während der Inkubation kontinuierlich ab und betrug nach 6 Stunden bei SILIAN-2  $32.9 \pm 1.7$  %, bei NEW TRANSIT  $28.4 \pm 1.5$  %, bei GLOBI  $26.2 \pm 1.9$  % und bei EDLOCK  $23.9 \pm 2.4$  %. Signifikante Unterschiede waren nach 4 Stunden Inkubation zwischen GLOBI ( $25.7 \pm 1.7$  %) und NEW TRANIST ( $34.9 \pm 2.0$  %)

bzw. SILIAN-2 ( $34.2 \pm 1.6$  %) sowie nach 6 Stunden zwischen EDLOCK ( $23.9 \pm 2.4$  %) und SILIAN-2 ( $32.9 \pm 1.7$  %) vorhanden.

Nach Induktion der Akrosomreaktion fiel die durchschnittliche totale Motilität nach dem Auftauen schon innerhalb von 2 Stunden bei SILIAN-2 auf  $17.3 \pm 1.7$  %, bei EDLOCK auf  $16.1 \pm 2.9$  %, bei NEW TRANSIT auf  $15.5 \pm 1.6$  % und bei GLOBI auf  $14.1 \pm 1.9$  % ab und blieb auf diesem tiefen Niveau.

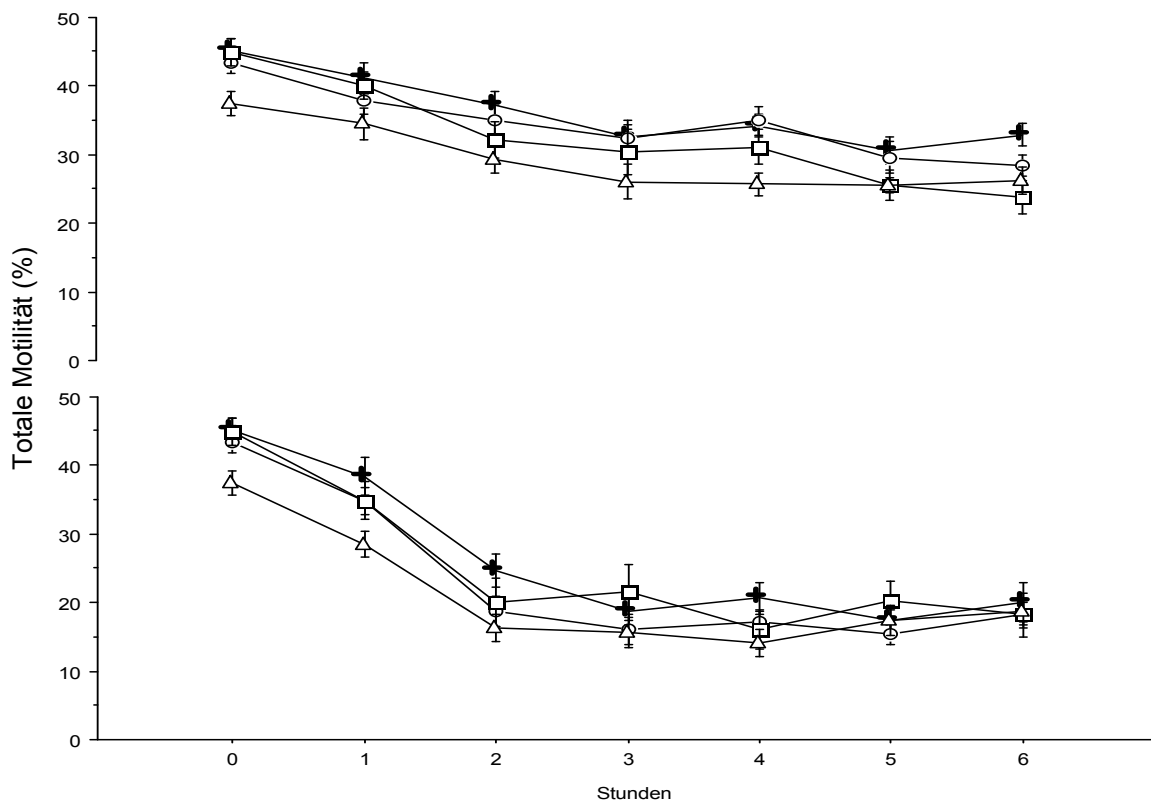


Abbildung 2: Durchschnittliche (m±SEM) totale Motilität im aufgetauten Samen von EDLOCK (□), GLOBI (△), NEW TRANSIT (○) und SILIAN-2 (+) während 6 Stunden Inkubation ohne (oben) und mit (unten) Induktion der Akrosomreaktion.

### 5.2.2 Progressive Motilität

Die Durchschnittswerte der progressiven Motilität im aufgetauten Samen der Stiere während 6 Stunden Inkubation ohne und mit Induktion der Akrosomreaktion sind in Abbildung 3 grafisch dargestellt. Unmittelbar nach dem Auftauen betrug die durchschnittliche progressive Motilität bei EDLOCK  $30.3 \pm 2.2$  %, bei SILIAN-2  $29.6 \pm 2.1$  %, bei NEW TRANSIT  $28.8 \pm 2.1$  % und bei GLOBI  $23.3 \pm 1.9$  %. Ohne Induktion der Akrosomreaktion nahm die durchschnittliche progressive Motilität bei

allen Stieren während der Inkubation stetig ab und betrug nach 6 Stunden bei SILIAN-2  $17.3 \pm 1.9$  %, bei NEW TRANSIT  $15.1 \pm 2.0$  %, bei GLOBI  $11.1 \pm 1.3$  % und bei EDLOCK  $9.1 \pm 1.7$  %. Ein signifikanter Unterschied war nach 6 Stunden zwischen SILIAN-2 und EDLOCK vorhanden.

Nach Induktion der Akrosomreaktion fiel die durchschnittliche progressive Motilität innerhalb von 2 Stunden bei EDLOCK auf  $9.6 \pm 2.6$  %, bei SILIAN-2 auf  $4.1 \pm 0.8$  %, bei NEW TRANSIT auf  $3.2 \pm 0.5$  % und bei GLOBI auf  $2.8 \pm 0.5$  % und blieb auf diesem tiefen Niveau. Signifikante Unterschiede waren nach 3 und 5 Stunden Inkubation zwischen EDLOCK ( $9.6 \pm 2.6$  %,  $7.3 \pm 1.7$  %) und allen anderen Stieren ( $2.8 \pm 0.5$  % bis  $4.1 \pm 0.8$  %,  $2.4 \pm 0.6$  % bis  $2.8 \pm 0.5$  %) vorhanden.

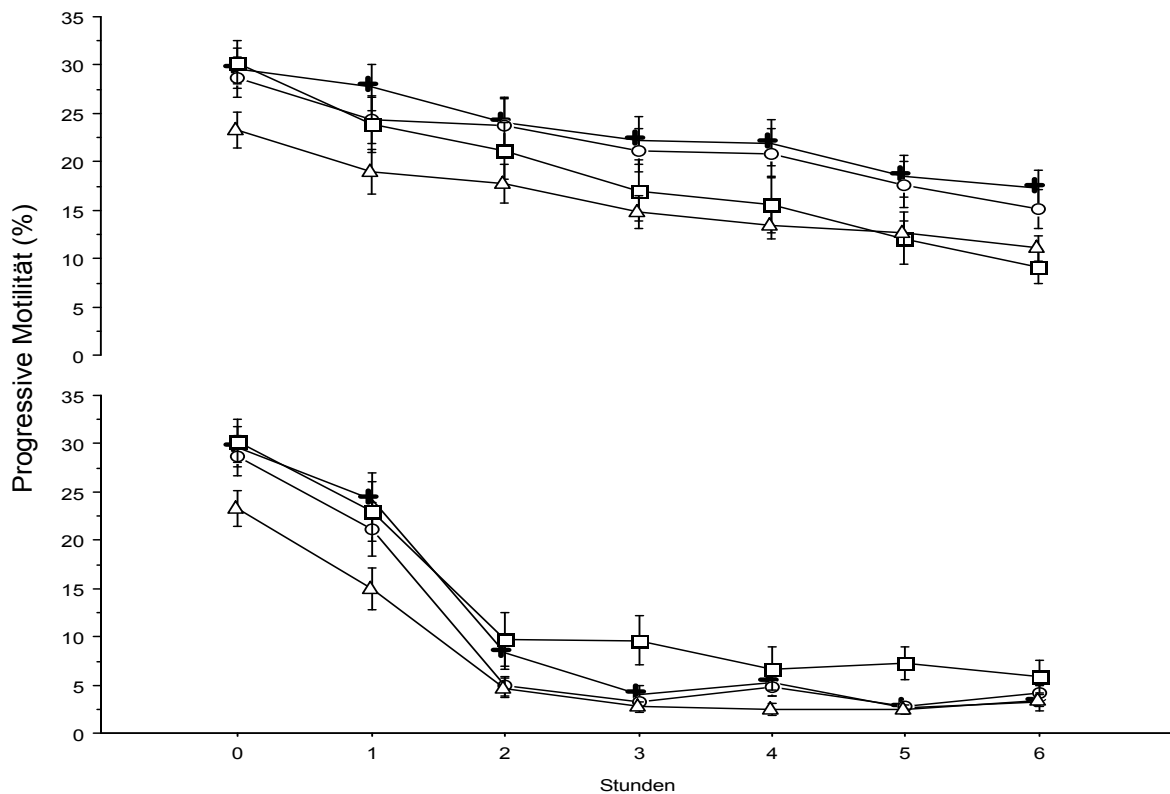


Abbildung 3: Durchschnittliche ( $m \pm SEM$ ) progressive Motilität im aufgetauten Samen von EDLOCK (□), GLOBI (△), NEW TRANSIT (○) und SILIAN-2 (+) während 6 Stunden Inkubation ohne (oben) und mit (unten) Induktion der Akrosomreaktion.

### 5.2.3 Rapide Motilität

Die Durchschnittswerte der rapiden Motilität im aufgetauten Samen der Stiere während 6 Stunden Inkubation ohne und mit Induktion der Akrosomreaktion sind in Abbildung 4 grafisch dargestellt. Unmittelbar nach dem Auftauen betrug die



durchschnittliche rapide Motilität bei SILIAN-2  $15.8 \pm 2.2\%$ , bei EDLOCK  $15.4 \pm 2.4\%$ , bei NEW TRANSIT  $14.9 \pm 2.0\%$  und bei GLOBI  $10.6 \pm 1.6\%$ .

Ohne Induktion der Akrosomreaktion nahm die rapide Motilität bei allen Stieren während der Inkubation kontinuierlich ab und betrug nach 6 Stunden bei SILIAN-2  $5.3 \pm 1.2\%$ , bei NEW TRANSIT  $4.3 \pm 1.0\%$  und bei EDLOCK  $3.6 \pm 1.7\%$  und bei GLOBI  $3.6 \pm 1.5\%$ .

Nach Induktion der Akrosomreaktion fiel die durchschnittliche rapide Motilität innerhalb von 2 Stunden bei SILIAN-2 auf  $2.4 \pm 0.9\%$ , bei EDLOCK auf  $2.2 \pm 0.9\%$ , bei NEW TRANSIT auf  $0.8 \pm 0.3\%$  und bei GLOBI auf  $0.6 \pm 0.2\%$  und blieb auf diesem tiefen Niveau.

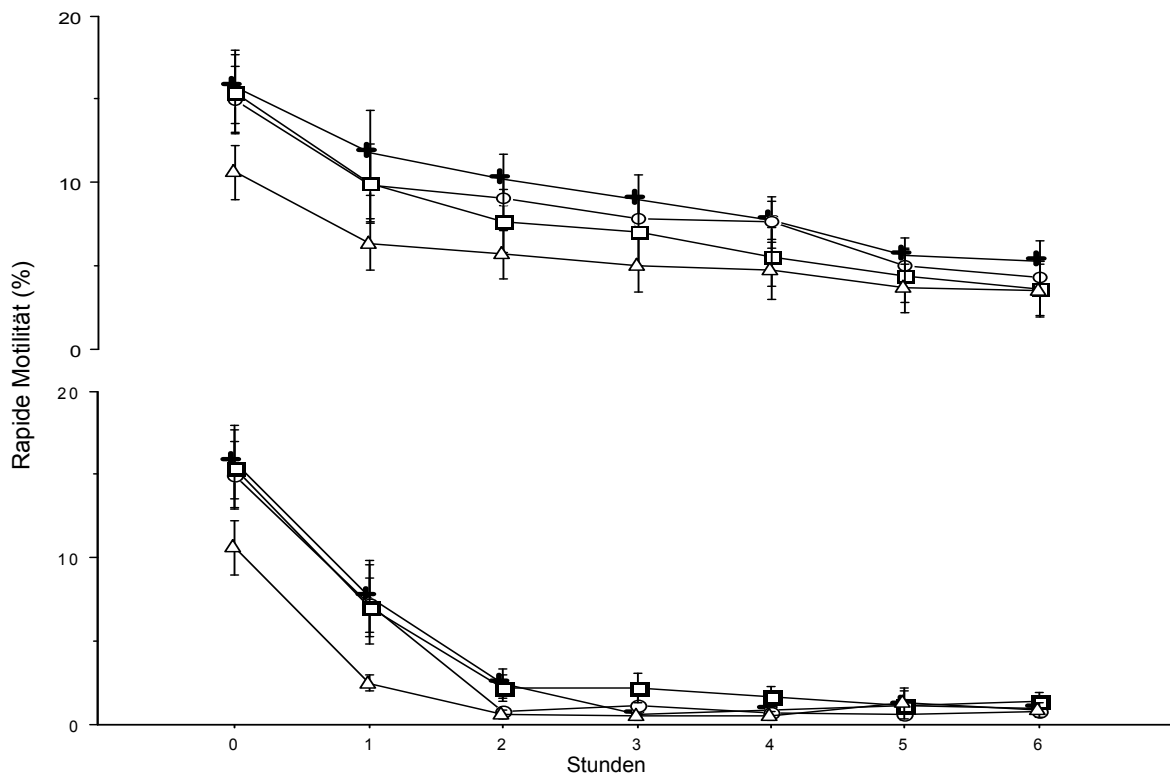


Abbildung 4: Durchschnittliche ( $m \pm SEM$ ) rapide Motilität im aufgetauten Samen von EDLOCK (□), GLOBI (△), NEW TRANSIT (○) und SILIAN-2 (+) während 6 Stunden Inkubation ohne (oben) und mit (unten) Induktion der Akrosomreaktion.

#### 5.2.4 Pfadgeschwindigkeit (VAP)

Die durchschnittlichen Pfadgeschwindigkeiten (VAP) der Spermien im aufgetauten Samen der Stiere während 6 Stunden Inkubation ohne und mit Induktion der Akrosomreaktion sind in Abbildung 5 grafisch dargestellt. Unmittelbar nach dem

Auftauen betrug die durchschnittliche VAP bei EDLOCK  $86.3 \pm 4.0$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei NEW TRANSIT  $85.1 \pm 2.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei SILIAN-2  $84.6 \pm 2.9$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  und bei GLOBI  $81.9 \pm 2.5$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ .

Ohne Induktion der Akrosomreaktion nahm die Pfadgeschwindigkeit nach 1 Stunde Inkubation zu und betrug bei SILIAN-2  $107.3 \pm 2.0$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei NEW TRANSIT  $102.5 \pm 3.1$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei EDLOCK  $98.4 \pm 5.5$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  und bei GLOBI  $97.8 \pm 2.1$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ . Anschliessend nahmen die Werte langsam ab und betrugen nach 6 Stunden bei NEW TRANSIT  $74.8 \pm 2.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei SILIAN-2  $74.6 \pm 3.1$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei GLOBI  $68.9 \pm 3.0$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  und bei EDLOCK  $59.7 \pm 4.0$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ . Signifikante Unterschiede waren nach 3 und 6 Stunden zwischen EDLOCK ( $79.5 \pm 6.0$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $59.7 \pm 4.0$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) und SILIAN-2 ( $98.8 \pm 3.1$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $74.6 \pm 3.1$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) bzw. NEW TRANSIT ( $97.2 \pm 2.3$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $74.8 \pm 2.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) vorhanden.

Nach Induktion der Akrosomreaktion und 1 Stunde Inkubation stieg die durchschnittliche Pfadgeschwindigkeit bei SILIAN-2 auf  $109.1 \pm 3.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei EDLOCK auf  $105.1 \pm 4.5$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei NEW TRANSIT auf  $104.6 \pm 5.2$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  und bei GLOBI auf  $89.1 \pm 5.3$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ . Anschliessend fielen die Werte ab, erreichten nach 3 Stunden bei EDLOCK  $63.6 \pm 6.4$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei SILIAN-2  $49.0 \pm 1.3$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei GLOBI  $47.4 \pm 1.1$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  und bei NEW TRANSIT  $46.6 \pm 1.1$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  und blieben auf diesem tiefen Niveau. Signifikante Unterschiede waren nach 1 Stunde Inkubation zwischen SILIAN-2 ( $109.1 \pm 3.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) und GLOBI ( $89.1 \pm 5.3$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ), nach 3 und 5 Stunden zwischen EDLOCK ( $63.6 \pm 6.4$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $58.4 \pm 4.2$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) und allen anderen Stieren ( $46.6 \pm 1.1$  bis  $49.0 \pm 1.3$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $44.4 \pm 0.9$  bis  $46.1 \pm 0.7$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) sowie nach 6 Stunden zwischen EDLOCK ( $54.4 \pm 3.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) und GLOBI ( $46.1 \pm 0.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) vorhanden.

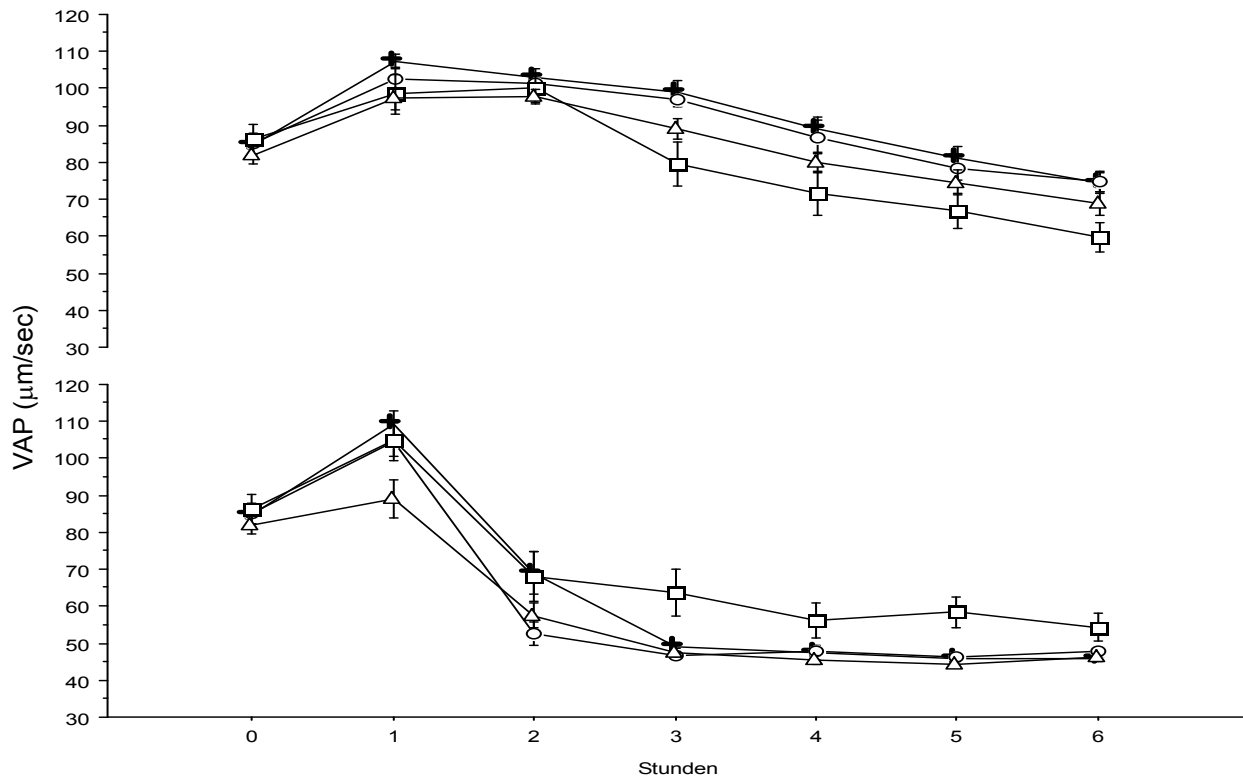


Abbildung 5: Durchschnittliche ( $m \pm \text{SEM}$ ) VAP im aufgetauten Samen von EDLOCK (□), GLOBI (△), NEW TRANSIT (○) und SILIAN-2 (+) während 6 Stunden Inkubation ohne (oben) und mit (unten) Induktion der Akrosomreaktion.

### 5.2.5 Spurgeschwindigkeit (VCL)

Die durchschnittlichen Spurgeschwindigkeiten (VCL) der Spermien im aufgetauten Samen der Stiere während 6 Stunden Inkubation ohne und mit Induktion der Akrosomreaktion sind in Abbildung 6 grafisch dargestellt. Unmittelbar nach dem Auftauen betrug die durchschnittliche VCL bei EDLOCK  $146.2 \pm 10.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ , bei GLOBI  $138.8 \pm 6.6 \mu\text{m}/\text{sec}$ , bei NEW TRANSIT  $138.0 \pm 7.1 \mu\text{m}/\text{sec}$  und bei SILIAN-2  $136.8 \pm 8.6 \mu\text{m}/\text{sec}$ . Ohne Induktion der Akrosomreaktion erreichte die Spurgeschwindigkeit nach 1 Stunde bzw. nach 2 Stunden Inkubation Maximalwerte bei SILIAN-2 von  $228.6 \pm 5.3 \mu\text{m}/\text{sec}$  und bei NEW TRANSIT von  $220.4 \pm 6.8 \mu\text{m}/\text{sec}$  bzw. bei EDLOCK von  $210.4 \pm 9.4 \mu\text{m}/\text{sec}$  und bei GLOBI von  $207.4 \pm 5.8 \mu\text{m}/\text{sec}$ . Anschliessend fiel die VCL kontinuierlich ab und betrug nach 6 Stunden bei NEW TRANSIT  $158.0 \pm 5.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ , bei SILIAN-2  $155.1 \pm 6.9 \mu\text{m}/\text{sec}$ , bei GLOBI  $145.2 \pm 7.4 \mu\text{m}/\text{sec}$  und bei EDLOCK  $119.5 \pm 10.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ . Signifikante Unterschiede waren nach 3 und 6 Stunden zwischen EDLOCK ( $158.2 \pm 14.2 \mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $119.5 \pm 10.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) und

SILIAN-2 ( $202.4 \pm 6.3 \mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $155.1 \pm 6.9 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) bzw. NEW TRANSIT ( $200.5 \pm 5.2 \mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $158.0 \pm 5.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) vorhanden.

Mit Induktion der Akrosomreaktion steigerte sich die VCL aller Stiere nach 1 Stunde auf Höchstwerte und betrug bei SILIAN-2  $230.3 \pm 8.1 \mu\text{m}/\text{sec}$ , bei NEW TRANSIT  $224.0 \pm 11.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ , bei EDLOCK  $220.8 \pm 9.0 \mu\text{m}/\text{sec}$  und bei GLOBI  $186.1 \pm 11.0 \mu\text{m}/\text{sec}$ . Danach fielen die Werte ab und erreichten nach 3 Stunden bei EDLOCK  $128.8 \pm 15.3 \mu\text{m}/\text{sec}$ , bei SILIAN-2  $85.5 \pm 2.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ , bei GLOBI  $83.5 \pm 3.1 \mu\text{m}/\text{sec}$  sowie bei NEW TRANSIT  $78.7 \pm 3.3 \mu\text{m}/\text{sec}$  und blieben auf diesem tiefen Niveau. Signifikante Unterschiede waren nach 1 Stunde zwischen SILIAN-2 ( $230.3 \pm 8.1 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) und GLOBI ( $186.1 \pm 11.0 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) sowie nach 3 Stunden zwischen EDLOCK ( $123.8 \pm 15.3 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) und den anderen Stieren ( $78.7 \pm 3.3 \mu\text{m}/\text{sec}$  bis  $85.5 \pm 2.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) vorhanden.

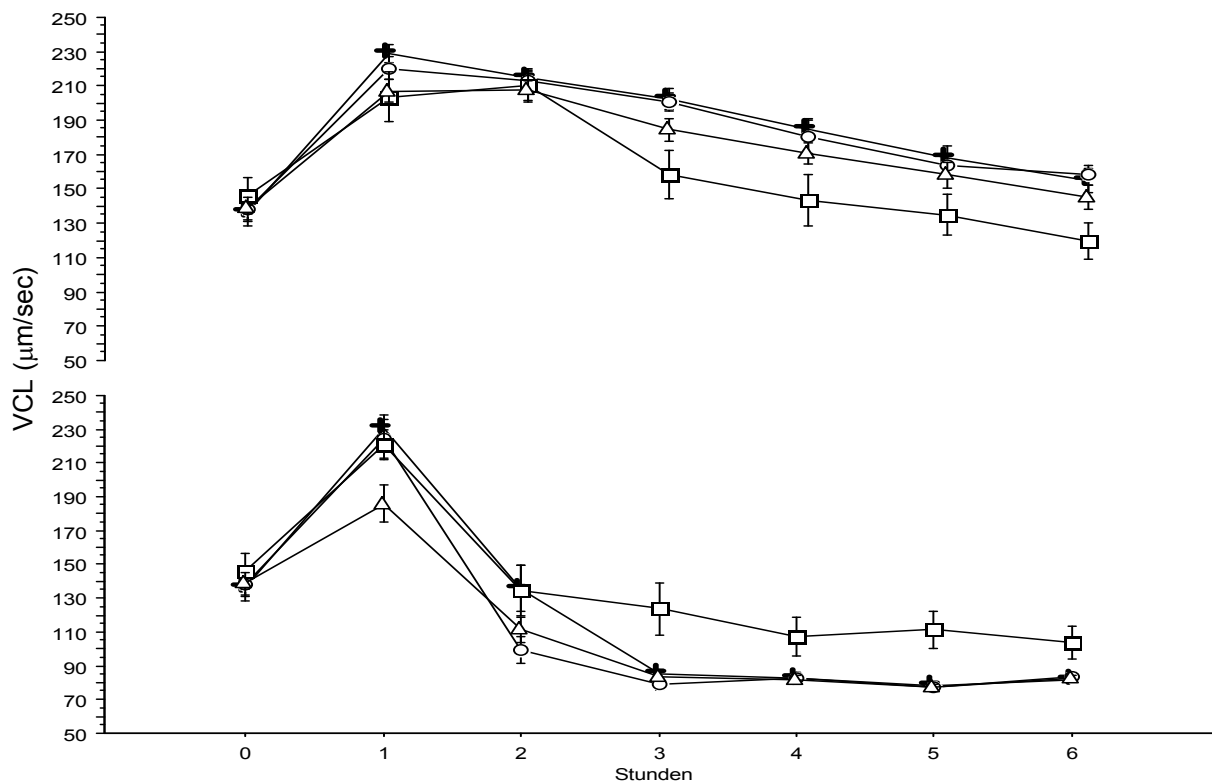


Abbildung 6: Durchschnittliche ( $m \pm \text{SEM}$ ) VCL im aufgetauten Samen von EDLOCK (□), GLOBI (△), NEW TRANSIT (○) und SILIAN-2 (+) während 6 Stunden Inkubation ohne (oben) und mit (unten) Induktion der Akrosomreaktion.

### 5.2.6 Progressivgeschwindigkeit (VSL)

Die durchschnittlichen Progressivgeschwindigkeiten (VSL) der Spermien im aufgetauten Samen der Stiere während 6 Stunden Inkubation ohne und mit Induktion der Akrosomreaktion sind in Abbildung 7 grafisch dargestellt. Unmittelbar nach dem Auftauen betrug die durchschnittliche VSL bei NEW TRANSIT  $71.6 \pm 1.9$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei SILIAN-2  $70.2 \pm 1.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei EDLOCK  $68.7 \pm 1.7$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  und bei GLOBI  $67.2 \pm 1.5$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ . Ohne Induktion der Akrosomreaktion nahm die VSL innerhalb der ersten 2 Stunden der Inkubation leicht zu und erreichte bei SILIAN-2  $79.0 \pm 2.4$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei NEW TRANSIT  $77.8 \pm 2.5$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei EDLOCK  $72.7 \pm 3.3$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  sowie bei GLOBI  $71.4 \pm 1.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ . Danach nahm die VSL kontinuierlich ab und betrug nach 6 Stunden bei SILIAN-2  $55.2 \pm 2.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei NEW TRANSIT  $54.0 \pm 2.0$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei GLOBI  $50.0 \pm 2.3$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  und bei EDLOCK  $44.1 \pm 2.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ . Signifikante Unterschiede waren nach 2 Stunden zwischen SILIAN-2 ( $79.0 \pm 2.4$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) und GLOBI ( $71.4 \pm 1.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ), nach 3 und 6 Stunden zwischen EDLOCK ( $60.8 \pm 4.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $44.1 \pm 2.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) und SILIAN-2 ( $76.6 \pm 2.9$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $55.2 \pm 2.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) bzw. NEW TRANSIT ( $75.5 \pm 2.4$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $54.0 \pm 2.0$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) sowie nach 4 Stunden zwischen EDLOCK ( $53.3 \pm 4.5$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) und SILIAN-2 ( $68.1 \pm 2.4$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) vorhanden.

Nach Induktion der Akrosomreaktion nahm die durchschnittliche VSL bei allen Stieren innerhalb von 2-3 Stunden rasch ab und betrug nach 3 Stunden bei EDLOCK  $47.5 \pm 4.8$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei GLOBI  $37.4 \pm 0.8$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bei SILIAN-2  $37.0 \pm 1.4$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  und bei NEW TRANSIT  $35.3 \pm 0.8$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ . Signifikante Unterschiede waren nach 1 Stunden zwischen GLOBI ( $53.1 \pm 2.5$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) und allen anderen Stieren ( $65.3 \pm 3.6$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  bis  $69.0 \pm 2.9$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) sowie nach 3 und 5 Stunden zwischen EDLOCK ( $47.5 \pm 4.8$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $42.3 \pm 3.0$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) und den anderen Stieren ( $35.3 \pm 0.8$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  bis  $39.3 \pm 1.9$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $35.1 \pm 0.7$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  bis  $35.2 \pm 0.8$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) vorhanden.

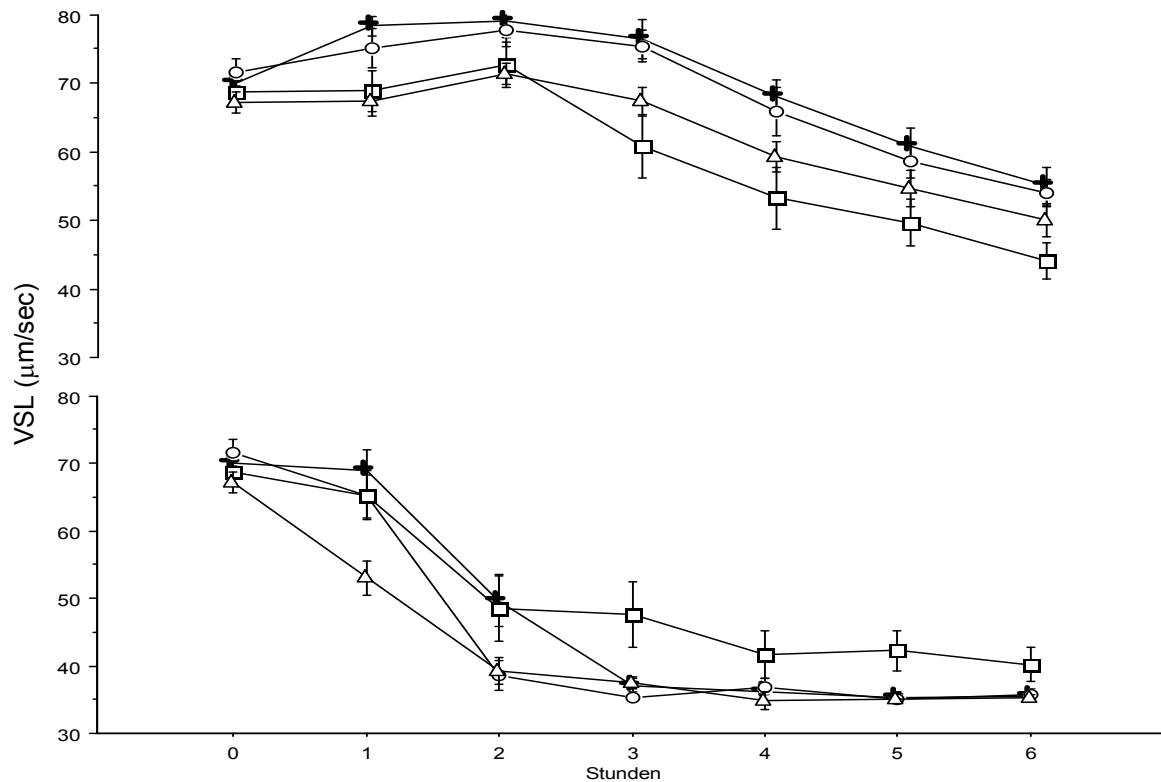


Abbildung 7: Durchschnittliche ( $m \pm \text{SEM}$ ) VSL im aufgetauten Samen von EDLOCK (□), GLOBI (△), NEW TRANSIT (○) und SILIAN-2 (+) während 6 Stunden Inkubation ohne (oben) und mit (unten) Induktion der Akrosomreaktion.

### 5.2.7 Seitliche Kopfauslenkung (ALH)

Die durchschnittlichen seitlichen Kopfauslenkungen der Spermien im aufgetauten Samen der Stiere während 6 Stunden Inkubation ohne und mit Induktion der Akrosomreaktion sind in Abbildung 8 grafisch dargestellt. Unmittelbar nach dem Auftauen zeigten die Stiere nur geringe Unterschiede in der ALH und die Werte betragen bei EDLOCK  $6.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ , bei GLOBI  $6.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$ , bei SILIAN-2  $5.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$  und bei NEW TRANSIT  $5.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ . Ohne Induktion der Akrosomreaktion nahm die ALH nach 1 Stunde Inkubation zu und erreichte bei SILIAN-2 und NEW TRANSIT  $11.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$ , bei GLOBI  $10.7 \pm 0.2 \mu\text{m}$  sowie bei EDLOCK  $9.8 \pm 0.7 \mu\text{m}$ . Anschliessend fielen die Werte bei SILIAN-2, GLOBI und NEW TRANSIT leicht, bei EDLOCK deutlich stärker ab. Nach 6 Stunden betrug die ALH bei SILIAN-2  $9.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ , bei NEW TRANSIT  $9.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ , bei GLOBI  $8.7 \pm 0.4 \mu\text{m}$  und bei EDLOCK  $7.4 \pm 0.7 \mu\text{m}$ . Signifikante Unterschiede waren nach 3 Stunden zwischen EDLOCK ( $8.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$ ) und SILIAN-2 ( $11.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ) bzw. NEW TRANSIT ( $10.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ) sowie nach 4 bzw.

5 Stunden zwischen EDLOCK ( $7.7\pm 0.8 \mu\text{m}$ ,  $7.4\pm 0.8 \mu\text{m}$ ) und allen anderen Stieren ( $10.0\pm 0.3\mu\text{m}$  bis  $10.7\pm 0.2\mu\text{m}$ ,  $9.4\pm 0.3\mu\text{m}$  bis  $10.0\pm 0.4\mu\text{m}$ ) vorhanden.

Nach Induktion der Akrosomreaktion stieg die ALH nach 1 Stunde stark an und erreichte bei SILIAN-2  $11.8\pm 0.4 \mu\text{m}$ , bei NEW TRANSIT  $10.5\pm 0.5 \mu\text{m}$ , bei EDLOCK  $9.8\pm 0.7 \mu\text{m}$  sowie bei GLOBI  $6.0\pm 0.3 \mu\text{m}$ . Danach fielen die Werte stark ab, betrugen nach 3 Stunden bei SILIAN-2  $3.9\pm 0.9 \mu\text{m}$ , bei EDLOCK  $6.3\pm 0.8 \mu\text{m}$ , bei NEW TRANSIT  $5.0\pm 0.5 \mu\text{m}$  sowie bei GLOBI  $4.3\pm 0.3 \mu\text{m}$  und bewegten sich anschliessend auf tiefem Niveau. Signifikante Unterschiede waren nach 1 Stunde zwischen GLOBI ( $6.0\pm 0.3 \mu\text{m}$ ) und SILIAN-2 ( $3.9\pm 0.9 \mu\text{m}$ ) bzw. NEW TRANSIT ( $10.5\pm 0.5 \mu\text{m}$ ) sowie nach 3, 4 und 5 Stunden zwischen EDLOCK ( $6.3\pm 0.8 \mu\text{m}$ ,  $5.7\pm 0.7 \mu\text{m}$ ,  $5.5\pm 0.7 \mu\text{m}$ ,) und allen anderen Stieren ( $3.8\pm 0.3 \mu\text{m}$  bis  $4.2\pm 0.3 \mu\text{m}$ ,  $3.5\pm 0.2 \mu\text{m}$  bis  $3.8\pm 0.3 \mu\text{m}$ ,  $3.1\pm 0.3 \mu\text{m}$  bis  $3.5\pm 0.1 \mu\text{m}$ ) vorhanden.

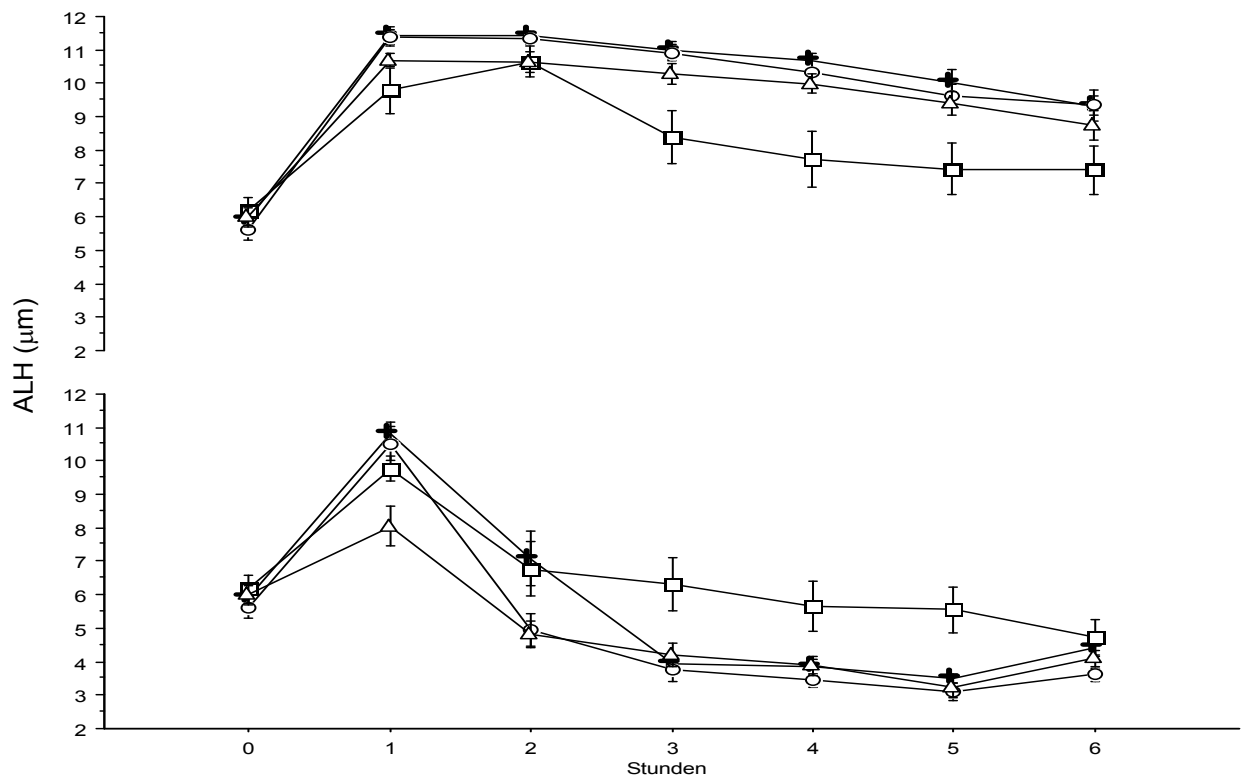


Abbildung 8: Durchschnittliche ( $m\pm\text{SEM}$ ) ALH im aufgetauten Samen von EDLOCK (□), GLOBI (△), NEW TRANSIT (○) und SILIAN-2 (+) während 6 Stunden Inkubation ohne (oben) und mit (unten) Induktion der Akrosomreaktion.

### 5.2.8 Vitale und akrosomintakte Spermien

Die Durchschnittswerte der vitalen und akrosomintakten Spermien im aufgetauten Samen der Stiere während 6 Stunden Inkubation ohne und mit Induktion der Akrosomreaktion sind in Abbildung 9 grafisch dargestellt. Unmittelbar nach dem Auftauen betrug der durchschnittliche Anteil an vitalen und akrosomintakten Spermien bei EDLOCK  $67.0 \pm 1.5$  %, bei NEW TRANSIT  $64.6 \pm 1.3$  %, bei SILIAN-2  $64.2 \pm 1.3$  % und bei GLOBI  $50.2 \pm 1.4$  %. Anschliessend fielen die Werte kontinuierlich ab und betrugen nach 6 Stunden bei NEW TRANSIT  $38.7 \pm 2.1$  %, bei SILIAN-2  $35.4 \pm 1.7$  %, bei EDLOCK  $34.2 \pm 2.2$  % und bei GLOBI  $23.7 \pm 1.3$  %. Der Stier GLOBI wies im Vergleich zu allen anderen Stieren stets signifikant tiefere Werte auf.

Nach Induktion der Akrosomreaktion nahm der durchschnittliche Anteil der vitalen und akrosomintakten Spermien rasch ab, betrug nach 3 Stunden bei NEW TRANSIT  $11.9 \pm 0.6$  %, bei EDLOCK  $10.8 \pm 0.7$  %, bei SILIAN-2  $10.3 \pm 0.6$  % und bei GLOBI  $9.1 \pm 0.5$  % und blieb danach auf diesem tiefen Niveau. Signifikante Unterschiede waren nach 1 Stunde zwischen GLOBI ( $37.1 \pm 1.6$  %) und allen anderen Stieren ( $48.5 \pm 2.0$  % bis  $52.2 \pm 2.2$  %) sowie nach 2-5 und 6 Stunden zwischen GLOBI ( $15.9 \pm 1.5$  % bis  $7.8 \pm 0.4$  % und  $7.1 \pm 0.4$  %) und NEW TRANSIT ( $26.8 \pm 2.8$  % bis  $11.2 \pm 0.7$  % und  $10.6 \pm 0.6$  %) vorhanden.



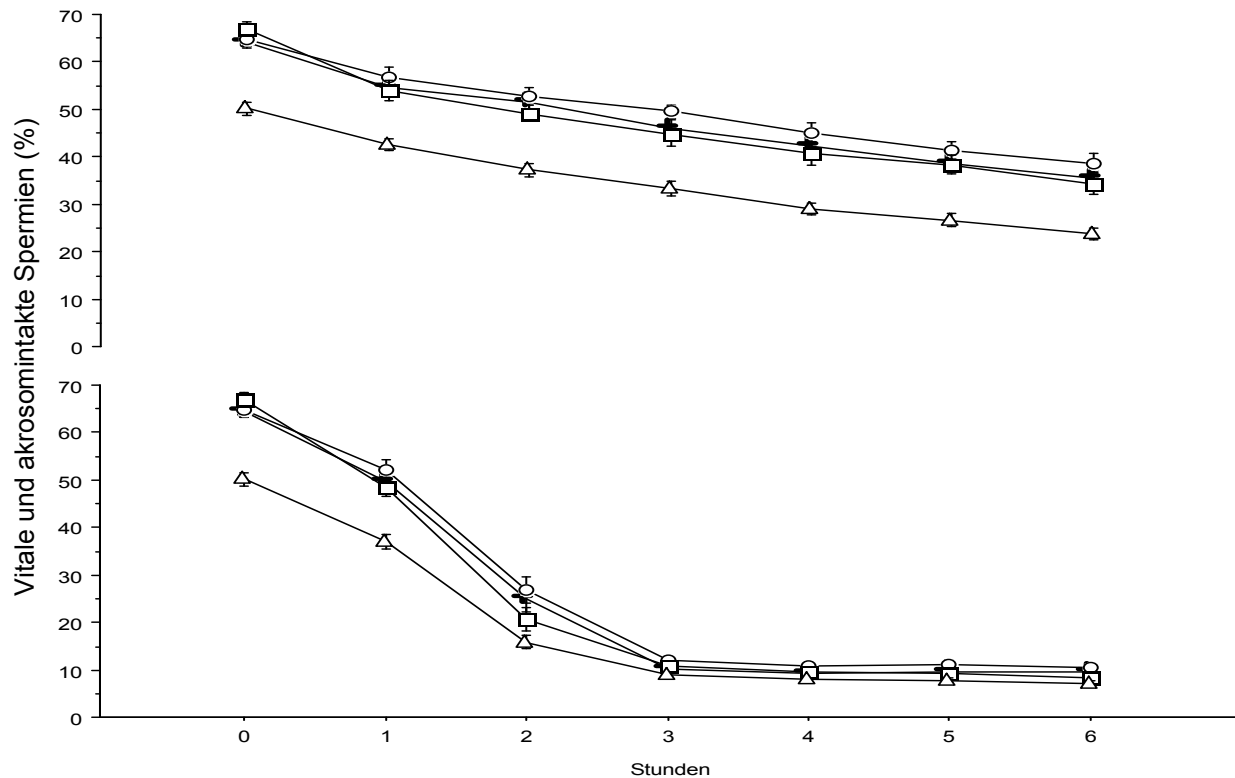


Abbildung 9: Durchschnittlicher ( $m \pm \text{SEM}$ ) Anteil vitaler und akrosomintakter Spermien (%) im aufgetauten Samen von EDLOCK (□), GLOBI (△), NEW TRANSIT (○) und SILIAN-2 (⊕) während 6 Stunden Inkubation ohne (oben) und mit (unten) Induktion der Akrosomreaktion.

### 5.2.9 Vitale und akrosomreagierte Spermien

Die Durchschnittswerte der vitalen und akrosomreagierten Spermien im aufgetauten Samen der Stiere während 6 Stunden Inkubation ohne und mit Induktion der Akrosomreaktion sind in Abbildung 10 grafisch dargestellt. Unmittelbar nach dem Auftauen war der Anteil an vitalen und akrosomreagierten Spermien bei allen Stieren gering ( $0.1 \pm 0.0$  % bis  $0.2 \pm 0.0$  %). Ohne Induktion der Akrosomreaktion nahmen die Werte leicht zu, betrug nach 1 Stunde bei EDLOCK  $12.8 \pm 1.2$  %, bei NEW TRANSIT  $9.7 \pm 0.9$  %, bei SILIAN-2  $9.6 \pm 0.7$  % und bei GLOBI  $9.3 \pm 0.7$  %. Signifikante Unterschiede waren nach 1 Stunde zwischen EDLOCK ( $12.8 \pm 1.2$  %) und SILIAN-2 ( $9.6 \pm 0.7$  %) bzw. GLOBI ( $9.3 \pm 0.7$  %) vorhanden.

Nach Induktion der Akrosomreaktion nahm der Anteil an vitalen und akrosomreagierten Spermien stetig zu, erreichte nach 3 Stunden bei EDLOCK  $39.5 \pm 1.9$  %, bei NEW TRANSIT  $35.3 \pm 1.3$  %, bei SILIAN-2  $34.7 \pm 1.4$  % sowie bei GLOBI  $26.3 \pm 1.0$  % und bewegte sich danach auf diesem Niveau. Signifikante

Unterschiede waren nach 2 Stunden zwischen EDLOCK ( $30.5 \pm 2.3$  %) und allen anderen Stieren ( $19.8 \pm 0.9$  % bis  $23.3 \pm 1.7$  %) sowie nach 3-6 Stunden zwischen GLOBI ( $26.3 \pm 1.0$  % bis  $26.2 \pm 1.0$  %) und den anderen Stieren ( $34.7 \pm 1.4$  % bis  $39.5 \pm 1.9$  % nach 3 Std.,  $33.7 \pm 1.3$  % bis  $37.7 \pm 1.4$  % nach 6 Std.) vorhanden.

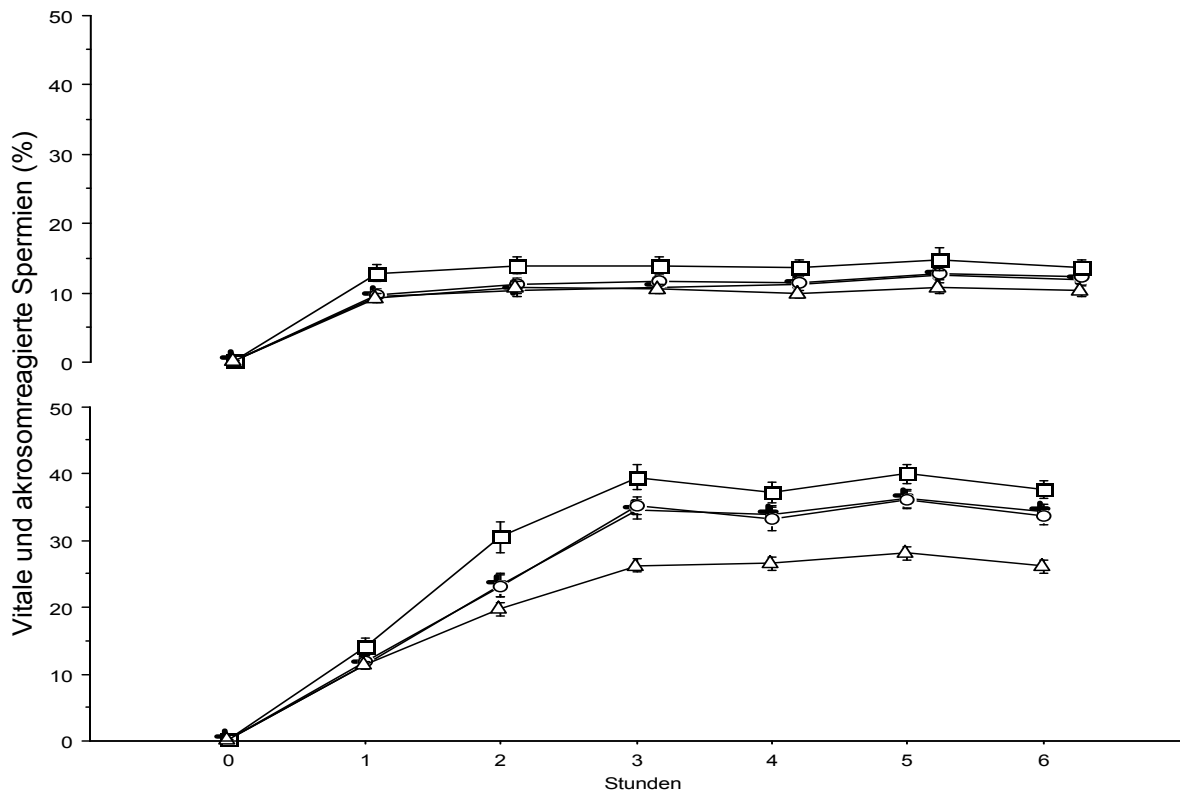


Abbildung 10: Durchschnittlicher ( $m \pm \text{SEM}$ ) Anteil vitaler und akrosomreagerter Spermien (%) im aufgetauten Samen von EDLOCK (□), GLOBI (△), NEW TRANSIT (○) und SILIAN-2 (+) während 6 Stunden Inkubation ohne (oben) und mit (unten) Induktion der Akrosomreaktion.

### 5.2.10 Intrazellulärer Kalziumgehalt

Die durchschnittliche Fluoreszenz von FLUO-4 der vitalen und akrosomintakten Spermien im aufgetauten Samen der Stiere während 6 Stunden Inkubation ohne und mit Induktion der Akrosomreaktion ist in Abbildung 11 grafisch dargestellt. Unmittelbar nach dem Auftauen betrug die mittlere Fluoreszenz bei SILIAN-2  $5.6 \pm 0.4$  Einheiten, bei NEW TRANSIT und GLOBI je  $5.3 \pm 0.4$  Einheiten sowie bei EDLOCK  $5.0 \pm 0.5$  Einheiten. Ohne Induktion der Akrosomreaktion nahm der intrazelluläre Kalziumgehalt während der ersten 3 Stunden nur leicht zu, erreichte nach 4 Stunden bei SILIAN-2  $8.7 \pm 0.7$  Einheiten, bei NEW TRANSIT  $7.6 \pm 0.6$  Einheiten, bei EDLOCK

6.7±0.6 Einheiten und bei GLOBI 6.5±0.5 Einheiten. Anschliessend fielen die Werte wieder ab und betragen nach 6 Stunden bei SILIAN-2 7.2±0.4 Einheiten, bei NEW TRANSIT 6.4±0.4 Einheiten, bei EDLOCK 6.1±0.5 Einheiten und bei GLOBI 5.5±0.4 Einheiten. SILIAN-2 wies stets die höchsten Werte auf und signifikante Unterschiede waren nach 2 Stunden zwischen SILIAN-2 (6.3±0.3 Einheiten) und EDLOCK (5.2±0.3 Einheiten) sowie nach 3 Stunden zwischen SILIAN-2 (6.8±0.3 Einheiten) und EDLOCK (5.2±0.3 Einheiten) bzw. GLOBI (5.3±0.3 Einheiten) vorhanden.

Nach Induktion der Akrosomreaktion erreichte die mittlere Fluoreszenz nach 1 Stunde bei SILIAN-2 12.3±0.8 Einheiten, bei GLOBI 11.1±0.7 Einheiten, bei EDLOCK 10.0±0.7 Einheiten und bei NEW TRANSIT 10.0±0.6 Einheiten. Danach fielen die Werte anfangs rasch und später langsam weiter ab und betragen nach 3 sowie 6 Stunden bei SILIAN-2 6.1±0.2 bzw. 3.5±0.3 Einheiten, bei GLOBI 5.3±0.5 bzw. 3.4±0.3 Einheiten, bei EDLOCK 3.4±0.2 bzw. 2.4±0.2 Einheiten und bei und NEW TRANSIT 4.9±0.6 bzw. 3.2±0.2 Einheiten. Auch mit Induktion der Akrosomreaktion wies SILIAN-2 stets den höchsten Kalziumgehalt der vitalen und akrosomintakten Spermien auf. Signifikante Unterschiede waren nach 2-6 Stunden zwischen SILIAN-2 (11.7±0.9 bis 3.5±0.3 Einheiten) und EDLOCK (7.9±0.1 bis 2.4±0.2 Einheiten) sowie nach 3-5 Stunden zwischen EDLOCK (3.4±0.2 bis 2.2±0.2 Einheiten) und GLOBI (5.3±0.5 bis 3.4±0.3 Einheiten) vorhanden.

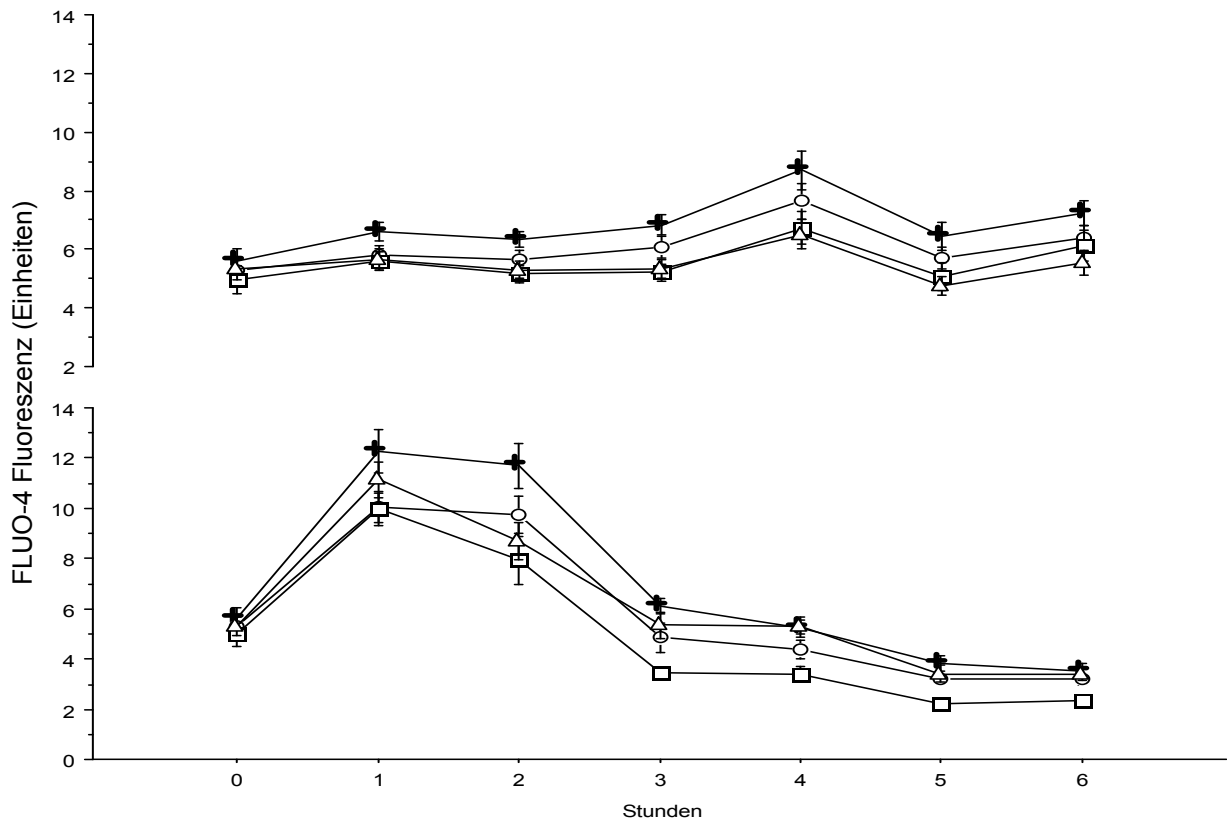


Abbildung 11: Mittlere Fluoreszenz ( $m \pm \text{SEM}$ ) von FLUO-4 der vitalen und akrosomintakten Spermien im aufgetauten Samen von EDLOCK (□), GLOBI (△), NEW TRANSIT (○) und SILIAN-2 (+) während 6 Stunden Inkubation ohne (oben) und mit (unten) Induktion der Akrosomreaktion.

### 5.2.11 DNA-Integrität

Die DNA-Integrität (DFI %) der Spermien unmittelbar nach dem Auftauen des Samens ist in Abbildung 12 in Form von Boxplots grafisch dargestellt. Der Medianwert des DFI betrug bei EDLOCK 4.3%, bei NEW TRANSIT 9.1%, bei SILIAN-2 10.2% und bei GLOBI 15.9%. Signifikante Unterschiede waren zwischen GLOBI und allen anderen Stieren sowie zwischen EDLOCK und SILIAN-2 als auch NEW TRANSIT vorhanden.

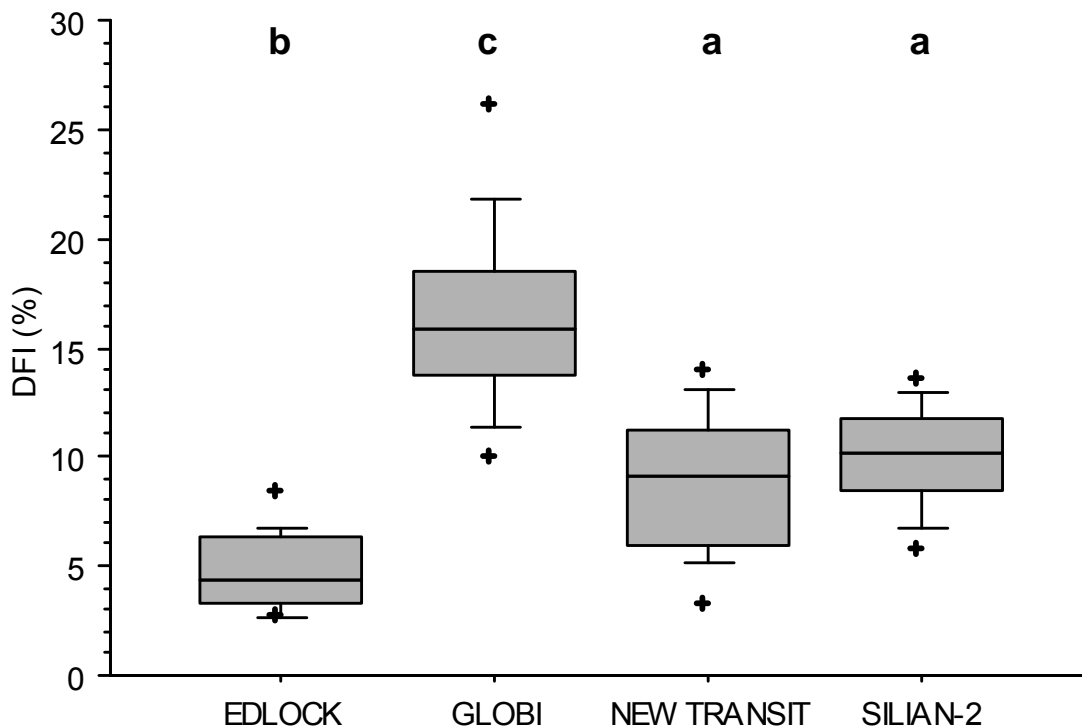


Abbildung 12: Boxplot der DNA-Integrität (DFI%) im aufgetauten Samen von EDLOCK, GLOBI, NEW TRANSIT und SILIAN-2. Stiere mit unterschiedlichen Indices<sup>abc</sup> sind signifikant ( $P < 0.05$ ) verschieden.

### 5.3 Einsatz und Fruchtbarkeit der Stiere im Feld

Vom Samengemisch SILIAN-2 wurden von Juni 2006 bis März 2010 insgesamt 22'279 Erstbesamungen und 16'177 Non>Returns registriert. Das ergibt für SILIAN-2 eine unkorrigierte  $NRR_{56}$  von 72.6%. EDLOCK wurde im Zeitraum vom April 2005 bis März 2010 bei 1'888 Erstbesamungen eingesetzt und erreichte mit 1'427 Non>Returns eine unkorrigierte  $NRR_{56}$  von 75.6%. GLOBI stand seit 2003 im Einsatz. Die routinemässige Erfassung der  $NRR_{56}$  erfolgte jedoch erst ab Juni 2007. Von Juni 2007 bis März 2010 wurden 4'713 Erstbesamungen mit 3'374 Non>Returns registriert, dies entspricht einer unkorrigierten  $NRR_{56}$  von 71.6%. NEW TRANSIT wurde im Zeitraum von Oktober 2006 bis März 2010 bei 1'451 Erstbesamungen eingesetzt. Mit 1'133 Non>Returns erzielte NEW TRANSIT eine unkorrigierte  $NRR_{56}$  von 78.0%.

Die Berechnung der korrigierten NRR und der Fruchtbarkeitskennzahlen für die einzelnen Stiere erfolgte anhand der Erstbesamungen, die im Zeitraum von Juni 2008 bis Mai 2009 vorgenommen wurden. In Tabelle 10 sind für jeden Stier die Anzahl Erstbesamungen, die Non>Returns (NR), die unkorrigierte sowie die

korrigierte NRR und die Stierenlösungen L und L100 mit der entsprechenden Sicherheit (S) angegeben.

Tabelle 10: Erstbesamungen (EB), Non>Returns (NR), Non-Return-Raten (NRR), Stierenlösungen (L, L100) und Sicherheit der Stierenlösung (S) bei EDLOCK, GLOBI, NEW TRANSIT und SILIAN-2.

	EB	NR	NRR unkorr.	NRR korr.	L	L100	S
EDLOCK	371	278	74.9	75	1.4	107	61
GLOBI	2'030	1437	70.8	74	-1.5	93	90
NEW TRANSIT	133	112	84.2	80	2.9	114	36
SILIAN-2	8'140	5'871	72.1	76	1.6	108	97

#### 5.4 Vaterschaft der Kälber nach Besamung mit SILIAN-2

Zur Bestimmung der Fruchtbarkeit von EDLOCK, GLOBI und NEW TRANSIT nach heterospermer Besamung beim Braun- und Fleckvieh wurden 428 Kälber, die aus SILIAN-2 Besamungen hervorgegangen sind, auf ihre Vaterschaft überprüft. In Tabelle 11 ist die Rasseverteilung der Mütter der Kälber zusammengefasst. Die Mütter wurden aufgrund der Fellfärbung in braune (BS und OB, 195 Tiere) und rotweisse (RH, SF und SI, 243 Tiere) Rassen zusammengefasst. Die Gesamtzahl Tiere der braunen und der rotweissen Rassen unterschieden sich nicht signifikant ( $P>0.05$ ) voneinander.

Was den Besamungsrang anbelangt, gingen 98 (22.9%) Kälber aus der 1., 97 (22.7%) Kälber aus der 2., 98 (22.9%) Kälber aus der 3., 79 (18.5%) Kälber aus der 4., 43 (10%) Kälber aus der 5. oder 6., 6 (1%) Kälber aus der 7. oder 8. und 1 Kalb aus der 15. Besamung p.p. hervor. Bei 6 Muttertieren war der Besamungsrang nicht bekannt. Es konnte kein signifikanter Unterschied ( $P>0.05$ ) in der Verteilung der Kälber in den Besamungsrängen 1-4 festgestellt werden.

Tabelle 11: Rasseverteilung der Mütter von SILIAN-2 Kälbern.

Rasse der Mutter	Anzahl Tiere	Prozent (%)
Brown Swiss (BS)	186	43.5
Original Braunvieh (OB)	9	2.1
Braune Rassen	195	45.6
Red Holstein (RH)	141	32.9
Swiss Fleckvieh (SF)	71	16.6
Simmentaler (SI)	21	4.9
Rotweisse Rassen	243	54.4
Total	428	100.0

#### 5.4.1 Vaterschaft nach phänotypischer Beurteilung

Bei der phänotypischen Beurteilung der Vaterschaft bei 428 Kälbern von SILIAN-2 wurden 176 (41.1%) Kälber dem Simmentaler Stier EDLOCK, 156 (36.4 %) Kälber dem Limousin Stier GLOBI und 72 (16.8%) Kälber dem Angus Stier NEW TRANSIT zugeordnet. In 24 (5.6%) Fällen konnte die Vaterschaft aufgrund von Fellfärbung und dem Vorhandensein der Hornanlage nicht eindeutig bestimmt werden.

Die Zuordnung des Muttertieres zu braunen oder rotweissen Rassen hatte einen signifikanten ( $P < 0.05$ ) Einfluss auf die Vaterschaft der Kälber aus Besamungen mit SILIAN-2 (Abb. 13). Bei braunen Müttern wurden 95 (48.7%) Kälber dem Limousin Stier GLOBI, 45 (23.1%) Kälber dem Simmentaler Stier EDLOCK und 40 Kälber (20.5%) dem Angus Stier NEW TRANSIT zugewiesen. 15 (7.7%) Kälber konnten keinem Vater zugeordnet werden. Signifikante ( $P < 0.05$ ) Unterschiede in der Vaterschaft waren zwischen GLOBI und EDLOCK bzw. NEW TRANSIT vorhanden. Bei den rotweissen Müttern hingegen setzte sich der Simmentaler Stier EDLOCK mit 131 Kälbern (56.2%) durch. Dem Limousin Stier GLOBI und dem Angus Stier NEW TRANSIT konnten 61 (26.2%) bzw. 32 (13.7%) Kälber zugewiesen werden. Bei 9 (3.9%) Kälbern von rotweissen Müttern konnte anhand des Aussehens keine Vaterschaft bestimmt werden. Alle Stiere unterschieden sich signifikant hinsichtlich der Anzahl der ihnen zugeordneten Kälber ( $P < 0.05$ ).

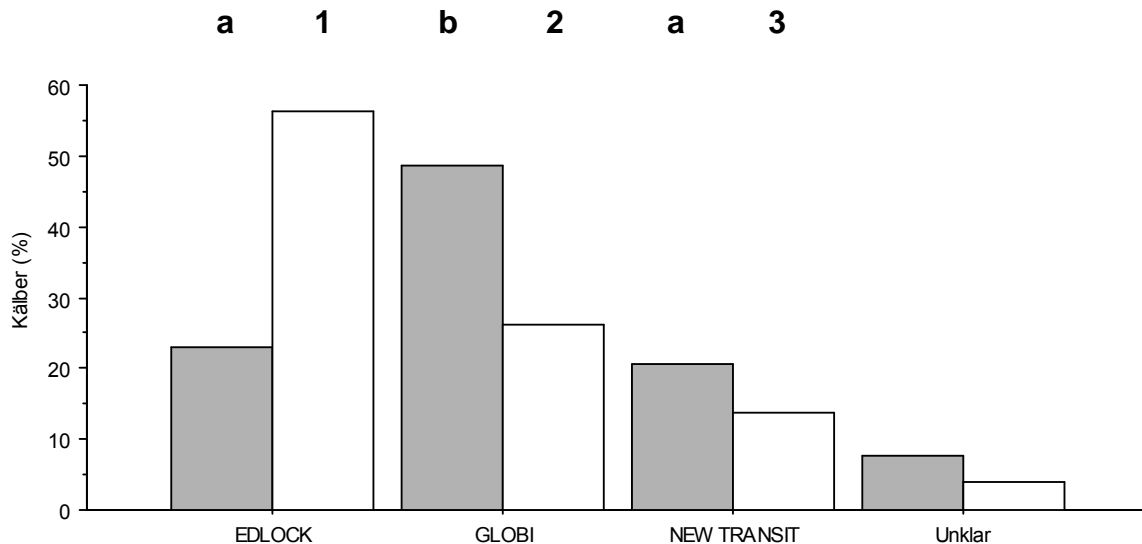


Abbildung 13: Phänotypische Beurteilung der Vaterschaft bei Kälbern (n=428) von SILIAN-2 die von braunen (■) und rotweissen Müttern (□) abstammten. Säulen mit unterschiedlichen Indices<sup>a,b,1,2,3</sup> innerhalb der gleichen Muttergruppe sind signifikant ( $P>0.05$ ) verschieden.

Die Geschlechtsverteilung bei den Kälbern von SILIAN-2 war mit 50.9% männlichen und 49.1% weiblichen Tieren annähernd ausgeglichen und nicht signifikant verschieden ( $P>0.05$ ).

#### 5.4.2 Vaterschaft nach genotypischer Bestimmung

Anhand der genotypischen Bestimmung bei den Kälbern von SILIAN-2 konnten 190 Kälber (44.4%) dem Simmentaler Stier EDLOCK, 161 Kälber (37.6%) dem Limousin Stier GLOBI und 75 Kälber (17.5%) dem Angus Stier NEW TRANSIT zugeordnet werden. Bei 2 (0.5 %) Kälbern war keiner der drei Stiere der Vater. Der Einfluss der Rasse der Mutter hatte einen signifikanten Einfluss ( $P<0.05$ ) auf die Vaterschaft der Kälber von SILIAN-2 (Abb. 14). Bei den Kälbern von braunen Müttern stammten 99 (50.8%) von GLOBI, 53 (27.2%) von EDLOCK und 42 (21.5%) von NEW TRANSIT ab. Ein (0.5%) Kalb aus dieser Gruppe hatte keinen der drei SILIAN-2 Stiere als Vater. Signifikante ( $P<0.05$ ) Unterschiede in der Vaterschaft waren zwischen GLOBI und EDLOCK bzw. NEW TRANSIT vorhanden. In der Gruppe der rotweissen Mütter waren 137 (58.7%) Kälber Nachkommen von EDLOCK, 62 (26.6%) Kälber von GLOBI und 33 (14.2%) Kälber von NEW TRANSIT. Auch in dieser Gruppe war 1 (0.4 %) Kalb dabei, das nicht aus einer SILIAN-2-Besamung stammen konnte. Alle Stiere



unterschieden sich signifikant hinsichtlich der Anzahl der von ihnen abstammenden Kälber ( $P < 0.05$ ). Der Besamungsrang des Muttertieres hatte keinen Einfluss auf die Vaterschaft der Kälber von SILIAN-2 ( $P > 0.05$ ).

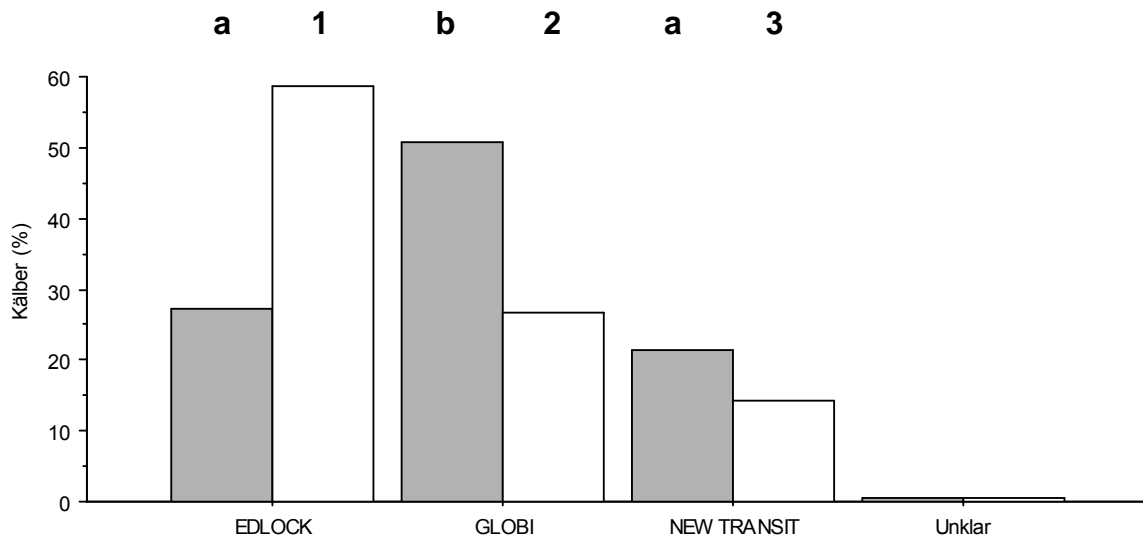


Abbildung 14: Genotypische Bestimmung der Vaterschaft bei Kälbern (n=428) von SILIAN-2, die von braunen (■) und rotweissen Müttern (□) abstammten. Säulen mit unterschiedlichen Indices<sup>a,b/1,2,3</sup> innerhalb der gleichen Muttergruppe sind signifikant ( $P > 0.05$ ) verschieden.

### 5.4.3 Unterschiede in der phäno- und genotypischen Vaterschaft

Zwei Kälber, die phänotypisch dem Limousin Stier GLOBI zugeordnet wurden, sowie ein Kalb, das anhand der Fellfärbung als Nachkomme des Angus Stieres NEW TRANSIT galt, stammten in Wirklichkeit vom Simmentaler Stier EDLOCK ab. Sämtliche Kälber, die phänotypisch dem Simmentaler Stier zugeordnet wurden, sind genotypisch als Nachkommen von EDLOCK oder eines anderen (1 Kalb) Simmentaler Stieres identifiziert worden. Kälber die sich anhand des Phänotyps nicht eindeutig einem der drei Stiere zuweisen liessen, konnten genotypisch in 50% (12 Kälber) der Fälle dem Simmentaler Stier EDLOCK zugeordnet werden. Bei den restlichen Kälbern handelte es sich um Limousin- (7 Kälber) und Anguskreuzungen (4 Kälber) sowie um 1 Kalb eines unbekanntes Stieres. Anhand der Gruppierung der SILIAN-2 Kälber nach Vaterschaft und nach Rasse der Mutter (braun oder rotweiss) konnte kein signifikanter ( $P > 0.05$ ) Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Bestimmungsmethoden (phäno-, genotypisch) festgestellt werden.

#### **5.4.4 Vaterschaft bei Zwillingskälbern von SILIAN-2**

Im Rahmen der Bestimmung der Vaterschaft bei Kälbern von SILIAN-2 wurden 15 Zwillingspaare identifiziert, wovon 10 Paare braune und 5 Paare rotweisse Mütter hatten. Von braunen Müttern stammten 5 gleichgeschlechtliche Zwillingspaare ab, 4 davon von GLOBI (LI) und 1 von EDLOCK (SI). Die restlichen 5 Zwillingspaare beim Braunvieh hatten die Väter GLOBI und NEWTRANIST (3 Paare), GLOBI und EDLOCK (1 Paar) sowie EDLOCK und NEW TRANSIT (1 Paar). Insgesamt hatten GLOBI, EDLOCK und NEW TRANSIT zusammen mit braunen Müttern 12, 4 und 4 Zwillingskälber gezeugt.

Bei den Kälbern von rotweissen Müttern war EDLOCK der Vater von 1 gleichgeschlechtlichen und 3 verschiedengeschlechtlichen Zwillingspaaren. Bei einem gleichgeschlechtlichen Zwillingspaar stammten die Kälber von EDLOCK und GLOBI ab. Insgesamt zeugte EDLOCK mit rotweissen Müttern 9 Zwillinge und GLOBI 1 Zwilling.

### **5.5 Fruchtbarkeit nach homospermer Besamung bei braunen und rotweissen Rassen**

Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Vaterschaften bei SILIAN-2 Kälbern von braunen und rotweissen Müttern wurde die Fruchtbarkeit nach homospermer Besamung von EDLOCK, GLOBI sowie NEW TRANSIT beim Braun- und Fleckvieh während der ganzen Einsatzdauer getrennt ausgewertet. Dabei gilt zu berücksichtigen, dass der Einsatz der drei Stiere sowie von SILIAN-2 während dieser Zeitdauer bei den beiden Rassen signifikant ( $P < 0.05$ ) unterschiedlich häufig erfolgte. In Tabelle 12 sind die Anzahl Erstbesamungen, die Non>Returns (NR) sowie die daraus berechnete unkorrigierten  $NRR_{56}$  zusammengefasst.

Tabelle 12: Fruchtbarkeit der Stiere EDLOCK, GLOBI und NEW TRANSIT nach homospermer und heterospermer Besamung (SILIAN-2) bei braunen und rotweissen Rassen.

Stier		Braune Rassen			Rotweisse Rassen			Beide Rassen		
		EB	NR	NRR <sub>56</sub>	EB	NR	NRR <sub>56</sub>	EB	NR	NRR <sub>56</sub>
<b>EDLOCK</b>	Kuh	656	483	73.6	979	747	76.3	1635	1230	75.2
	Rind	5	5	100.0	85	72	84.7	90	77	85.6
	<b>Total</b>	<b>661</b>	<b>488</b>	<b>73.8</b>	<b>1064</b>	<b>819</b>	<b>77.0</b>	<b>1725</b>	<b>1307</b>	<b>75.8</b>
<b>GLOBI</b>	Kuh	1609	1116	69.4	1881	1336	71.0	3490	2452	70.3
	Rind	82	61	74.4	188	148	78.7	270	209	77.4
	<b>Total</b>	<b>1691</b>	<b>1177</b>	<b>69.6</b>	<b>2069</b>	<b>1484</b>	<b>71.7</b>	<b>3760</b>	<b>2661</b>	<b>70.8</b>
<b>NEW TRANSIT</b>	Kuh	268	204	76.1	243	165	67.9	511	369	72.2
	Rind	83	68	81.9	130	110	84.6	213	178	83.6
	<b>Total</b>	<b>351</b>	<b>272</b>	<b>77.5</b>	<b>373</b>	<b>275</b>	<b>73.7</b>	<b>724</b>	<b>547</b>	<b>75.6</b>
<b>SILIAN-2</b>	Kuh	8484	6224	73.4	9233	6604	71.5	17717	12828	72.4
	Rind	310	240	77.4	320	250	78.1	630	490	77.8
	<b>Total</b>	<b>8794</b>	<b>6464</b>	<b>73.5</b>	<b>9553</b>	<b>6854</b>	<b>71.8</b>	<b>18347</b>	<b>13318</b>	<b>72.6</b>

EDLOCK wurde insgesamt mit 1'725 Besamungen (661 beim Braun- und 1064 beim Fleckvieh) eingesetzt. Die unkorrigierten NRR<sub>56</sub> betragen 75.8% (beide Rassen), 73.8% (Braune Rassen) sowie 77.0% (Rotweisse Rassen). Der Einsatz von GLOBI erfolgte mit total 3760 Erstbesamungen (1691 beim Braun- und 2069 beim Fleckvieh) am häufigsten von allen drei Stieren. Die unkorrigierten NRR<sub>56</sub> betragen 70.8% (beide Rassen), 69.6% (Braune Rassen) sowie 71.7% (Rotweisse Rassen). NEW TRANSIT wurde mit insgesamt 724 Erstbesamungen (351 beim Braun- und 373 beim Fleckvieh) von allen drei Stieren am wenigsten häufig eingesetzt. Die unkorrigierten NRR<sub>56</sub> betragen 75.6% (beide Rassen), 77.5% (Braune Rassen) sowie 73.7% (Rotweisse Rassen). Von SILIAN-2 wurden in der vorgegebenen Zeitdauer insgesamt 18347 Erstbesamungen (8794 beim Braun- und 9553 beim Fleckvieh) registriert. Die unkorrigierten NRR<sub>56</sub> betragen 72.6% (beide Rassen), 73.5% (Braune Rassen) sowie 71.8% (Rotweisse Rassen).

Die höchsten  $NRR_{56}$  wiesen NEW TRANIST mit 77.5% beim Braunvieh und EDLOCK mit 77.0% beim Fleckvieh auf. Beim Braunvieh waren ausserdem Besamungen mit EDLOCK erfolgreicher als mit GLOBI (73.9% vs. 69.6%).

Der Stier und die Parität des Muttertieres (Kuh/Rind) sowie die Interaktion zwischen Stier und Parität (Kuh oder Rind) hatten einen signifikanten Einfluss auf die unkorrigierte  $NRR_{56}$ . Bei der Rasse des Muttertieres (braune oder rotweisse Rassen) jedoch war nur eine Tendenz ( $P = 0.07$ ) zur Beeinflussung der unkorrigierten  $NRR_{56}$  erkennbar.

## 6 Diskussion

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass der Stier einen signifikanten Einfluss auf alle Qualitätsparameter im aufgetauten Samen hatte. Am deutlichsten waren die Unterschiede zwischen dem Stier GLOBI und dem Mischsamen SILIAN-2 (alle Parameter) und zwischen GLOBI und den beiden anderen Stieren EDLOCK und NEW TRANSIT (8 von 11 Parametern). Für die Untersuchungen der Samenqualität wurde der Samen nach dem Auftauen während 6 Stunden einmal mit und einmal ohne Induktion der Akrosomreaktion inkubiert. Der Grund für die Induktion der Akrosomreaktion stützt sich auf Angaben aus der Literatur, wonach der Anteil an induzierbaren Spermien mit der Fruchtbarkeit beim Stier korreliert (Ax et al., 1985; Graham und Foote, 1987; Lenz et al., 1988; Whitfield und Parkinson, 1992, 1995). Die Ergebnisse der Untersuchungen der Samenqualität haben gezeigt, dass bei den einzelnen Stieren mit oder ohne Induktion der Akrosomreaktion die Verläufe während der Inkubation ähnlich waren. Nach Induktion der Akrosomreaktion war ein rasches Absinken der vitalen und akrosomintakten sowie motilen Spermien zu beobachten. Gleichzeitig kam es nach einer Stunde Inkubation zu einem temporären Anstieg der Spermengeschwindigkeitsparameter VAP und VCL sowie zu einer Zunahme der seitlichen Kopfauslenkung der Spermien (ALH) und des intrazellulären Kalziumgehaltes der vitalen und akrosomintakten Spermien. Die beobachtete Zunahme bei den Motilitätsparametern VAP und ALH sind typisch für die während der Kapazitation beschriebene Hypermotilität der Spermien (Yanagimachi, 1994; Kastelic und Thundathil, 2008). Ohne Induktion der Akrosomreaktion nahm der Anteil an vitalen, akrosomintakten und motilen Spermien während der Inkubation kontinuierlich langsam ab. Bei den Parametern VAP, VCL, VSL und ALH kam es nach einer Stunde Inkubation zu einem temporären Anstieg, anschliessend fielen die Werte ebenfalls stetig und langsam ab. Der Kalziumgehalt der vitalen und akrosomintakten Spermien zeigte nur geringe Schwankungen mit einem temporären Anstieg nach 4 Stunden Inkubation. Diese Befunde zeigen, dass kapazitationsähnliche Vorgänge, wenn auch in geringem Masse, im aufgetauten Samen auch ohne Kontakt mit den Sekreten des weiblichen Genitaltrakts auftreten können. Die Gründe dafür liegen vermutlich darin, dass während der Samenverarbeitung die im Seminalplasma enthaltenen Dekapazitationsfaktoren, die eine vorzeitige Kapazitation verhindern, stark verdünnt werden. Daneben könnten

auch Bestandteile des Verdünners wie das Eigelb und durch den Einfrier- und Auftauprozess hervorgerufene Veränderungen an der Plasmamembran Kapazitationsvorgänge induzieren (Schembri et al., 2002).

Aus der Beurteilung der Samenqualität der einzelnen Stiere geht hervor, dass der Mischsamen von SILIAN-2 ohne Induktion der Akrosomreaktion für alle bestimmten Motilitätsparameter stets die höchsten Werte aufwies. Auch der Kalziumgehalt war bei Spermien von SILIAN-2 jeweils mit oder ohne Induktion der Akrosomreaktion den anderen Stieren überlegen. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Qualität des Mischsamens besser sein kann als diejenige des besten im Samengemisch enthaltenen Stieres. Grund dafür ist vermutlich eine optimierte Zusammensetzung des Seminalplasmas, welche durch das Mischen von Ejakulatanteilen verschiedener Stiere zustande kommt. Ein Vergleich der Samenqualität zwischen den Stieren zeigt dass GLOBI bezüglich Motilität sowie Akrosom- und DNA-Integrität (DFI%) die schlechtesten und EDLOCK die besten Werte aufwies, dies sowohl mit als auch ohne Induktion der Akrosomreaktion. Da bekannt ist, dass die Fruchtbarkeit von Stieren wesentlich von der Motilität (Christensen et al., 2005; Kasimanickam et al., 2006), der Vitalität (Christensen et al., 2005) sowie der DNA-Integrität (Ballachey et al., 1988; Januskauskas et al., 2001; Kasimanickam et al., 2006) der Spermien abhängt ist, lag die Vermutung nahe, dass anhand obiger Ergebnisse GLOBI die geringste und EDLOCK sowie SILIAN-2 die beste Fruchtbarkeit haben sollten. Die von Swisshgenetics erhobenen und korrigierten  $NRR_{56}$  betragen schliesslich 74% für GLOBI, 75% für EDLOCK, 76% für SILIAN-2 und 80% für NEW TRANSIT. Es gilt jedoch zu beachten, dass die korrigierte  $NRR_{56}$  in Abhängigkeit des Durchschnittswertes der entsprechenden Rasse berechnet wurde und daher die Werte für die einzelnen Stiere nur bedingt miteinander verglichen werden können. Der hohe Wert für NEW TRANSIT ist zudem mit Vorsicht zu geniessen, da für diesen Stier nur 133 Erstbesamungen ausgewertet werden konnten und damit die Sicherheit für die korrigierte  $NRR_{56}$  lediglich 36% betrug. Bei der korrigierten  $NRR_{56}$  von SILIAN-2 muss berücksichtigt werden, dass das Mischsperma vor allem bei Kühen mit Fruchtbarkeitsproblemen eingesetzt und dies bei der Berechnung der NRR nur ungenügend berücksichtigt wurde. Deshalb kann angenommen werden, dass die tatsächliche Fruchtbarkeit von SILIAN-2 wohl besser war als die berechnete  $NRR_{56}$  von 76%. Ein guter Indikator für die Fruchtbarkeit der Stiere im Feld sind die unkorrigierten NRR nach Erstbesamung bei Rindern. Diese betragen für EDLOCK

85.6%, für NEW TRANIST 83.6%, für SILIAN-2 77.8% und für GLOBI 77.4%. Wie anhand der Samenqualität erwartet, erzielte EDLOCK die beste und GLOBI die schlechteste Fruchtbarkeit bei den Rindern. Aufgrund der Samenqualität jedoch ist die relativ schlechte Fruchtbarkeit nach Besamung mit SILIAN-2 schwierig zu erklären. Dies wird noch erschwert wenn die Ergebnisse von SILIAN-1 aus den Jahren 2004-2006 betrachtet werden, wonach die NRR deutlich über dem Durchschnitt der Vergleichsstiere lag (Scherrer und Wagner, 2005).

Zur Bestimmung der Abstammung der Nachkommen nach heterospermer Besamung wurden die Kälber von SILIAN-2 sowohl phänotypisch wie auch genotypisch untersucht. Dabei stimmte die phänotypische Beurteilung sehr gut mit der genotypischen Bestimmung überein und nur 3 von 428 Kälbern waren aufgrund ihres Aussehens einem falschen Vater zugeordnet worden. Dieses gute Ergebnis ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass die phänotypische Beurteilung nur durch gut instruierte Personen und innerhalb von kurzer Zeit durchgeführt wurde. Die meisten Kälber von SILIAN-2 stammten vom Simmentaler EDLOCK (44.4%) und vom Limousin GLOBI (37.6%) und deutlich weniger vom Angus NEW TRANSIT (17.5%) ab. Erstaunlich war jedoch, dass die Rasse des Muttertieres einen signifikanten Einfluss auf die Vaterschaft der Kälber von SILIAN-2 hatte. Bei den Nachkommen von braunen Müttern war GLOBI (50.8%) und bei den Kälbern von rotweissen Müttern EDLOCK (58.7%) den anderen Stieren deutlich überlegen. In der vorliegenden Arbeit konnte damit erstmals gezeigt werden, dass das Muttertier einen entscheidenden Einfluss auf die Vaterschaft der Nachkommen nach heterospermer Insemination beim Rind hat. Diese Erkenntnisse stehen im Widerspruch zu Untersuchungen beim Schaf, die einen solchen Einfluss ausschliessen (Berger und Dally, 2001). Andere Studien über den Einfluss des Muttertieres auf die Fruchtbarkeit eines Vattertieres wurden vorwiegend bei polyandrischen Spezies durchgeführt, bei denen die Weibchen sich natürlicherweise während derselben Brunst mit mehreren Männchen paaren. Vergleicht man die Fruchtbarkeit von polyandrischen und monoandrischen Tieren, zeigt sich, dass bei polyandrischen Spezies weniger Störungen der Frühgravidität auftreten (Stockley, 2003). Dabei ist die Überlebensrate der Embryonen in der Regel besser, je mehr sich die Väter genetisch von der Mutter unterscheiden. Bei Makakenaffen wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Klasse I Major Histocompatibility Complex (MHC)-Antigenen bei den Eltern und Störungen der Frühgravidität nachgewiesen (Knapp et al., 1996).

Auch beim Menschen ist bekannt, dass bei Vorhandensein des gleichen Humanen Leukozyten Antigens bei Mutter und Embryo das Risiko für eine Fehlgeburt erhöht ist (Ober et al., 1998). Bei Mäusen wurde festgestellt, dass Väter, die sich in den MHC-Antigenen deutlich vom Weibchen unterschieden, aktiv als Paarungspartner bevorzugt werden (Wedekind et al., 1996; Yamazaki und Beauchamp, 2007). Diese Zusammenhänge konnten in der vorliegenden Studie nach heterospermer Besamung mit SILIAN-2 bei den rotweissen Müttern nicht bestätigt werden, da der nahe verwandte Simmentaler Stier EDLOCK deutlich fruchtbarer war als der genetisch entfernter verwandte Angus Stier NEW TRANIST. Auch bei den braunen Müttern schnitt der genetisch entferntere verwandte Angus Stier NEW TRANSIT im Vergleich zu den anderen beiden Stieren schlechter ab. In Bezug auf die Fruchtbarkeit nach homospermer Besamung erzielte aber NEW TRANSIT bei braunen Rassen die besten Ergebnisse. Diese Erkenntnisse stehen im Widerspruch zu den Angaben aus der Literatur (Beatty et al., 1969; Martin und Dziuk, 1977; Stahlberg et al., 2000), die eine positive Korrelation zwischen der Vaterschaftsverteilung nach heterospermer und der Fruchtbarkeit nach homospermer Insemination nachweisen konnten. Als Gründe für unsere abweichenden Beobachtungen kommen die unterschiedlichen Spermienmengen in den hetero- und homospermen Dosen sowie mögliche Einflüsse des Seminalplasmas in Frage. In unserer Studie enthielten die Samendosen von SILIAN-2 je 8 Millionen Spermien von EDLOCK, GLOBI und NEW TRANIST, die homospermen Dosen hingegen insgesamt 15 Millionen Spermien des jeweiligen Stieres. Es ist bekannt, dass die minimale Spermienzahl zur Erzielung einer optimalen Fruchtbarkeit mit Gefriersamen beim Stier individuell verschieden ist und dass bei hochfertilen Stieren erst dann deutliche Unterschiede in der Fruchtbarkeit auftreten, wenn mit weniger als 10 Millionen Spermien besamt wird (Den Daas et al., 1998). In unserem Fall erfüllten alle drei SILIAN-2 Stiere die Anforderungen von Swisshgenetics bezüglich Samenqualität, jedoch war bei den einzelnen Stieren die nötige Spermienzahl für eine optimale Fruchtbarkeit nicht bekannt. Bei NEW TRANSIT liegt daher anhand der Ergebnisse der Vaterschaftsverteilung nach heterospermer Insemination und der NRR nach homospermer Besamung die Vermutung nahe, dass zur Erzielung einer optimalen Fruchtbarkeit mehr als 8 Millionen Spermien nötig gewesen wären.



Im Vergleich zu NEW TRANSIT wies GLOBI eine schlechtere Samenqualität auf und zeigte nach homospermer Besamung eine deutlich geringere Fruchtbarkeit, zeugte aber bei heterospermer Insemination mehr Nachkommen als ersterer. Es ist bekannt, dass im Seminalplasma von subfertilen Stieren Proteine vorkommen, die im Mischsamen die Fruchtbarkeit hochfertiler Stiere beeinträchtigen können (Moura et al., 2006, 2007). Es erscheint daher möglich, dass nach heterospermer Insemination mit SILIAN-2 Bestandteile des Seminalplasmas von GLOBI oder EDLOCK die Befruchtungsfähigkeit der Spermien von NEW TRANSIT zu hemmen vermochten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in unseren Untersuchungen die Qualität des Mischsamens SILIAN-2 besser war als diejenige des besten im Samengemisch enthaltenen Stieres. Bei der Vaterschaft der Kälber nach heterospermer Besamung mit SILIAN-2 konnte ein signifikanter Einfluss der Rasse des Muttertieres festgestellt werden. Dabei war bei Kälbern von rotweissen Müttern der Simmentaler Stier EDLOCK und bei Nachkommen von braunen Müttern der Limousin Stier GLOBI am häufigsten der Vater. Diese von uns erarbeiteten Grunderkenntnisse müssen als Ausgang für neue Versuche dienen, um das Zusammenspiel möglicher Einflussfaktoren auf die Fruchtbarkeit von Mischsamen besser studieren und verstehen zu können.

## 7 Literatur

Ax RL, Dickson K, Lenz RW. Induction of acrosome reactions by chondroitin sulfates in vitro corresponds to nonreturn rates of dairy bull. *J Dairy Sci* 1985; 68: 387-390.

Baarz D. Untersuchungen über die Eignung durchflusszytometrischer Testverfahren zur Beurteilung der Fertilität von kryokonservierten Bullenspermas. *Vet. Med. Diss.* 2006 Tierärztliche Hochschule Hannover.

Ballachey BE, Evenson DP, Saacke RG. The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J Androl* 1988; 9: 109-115.

Beatty RA. Fertility of mixed semen from different rabbits. *J Reprod Fertil* 1960; 1: 52-60.

Beatty RA, Bennett GH, Hall JG, Hancock JL, Stewart DL. An experiment with heterospermic insemination in cattle. *J Reprod Fertil* 1969; 19: 491-502.

Beatty RA, Stewart DL, Spooner RL, Hancock JL. Evaluation by the heterospermic insemination technique of the differential effect of freezing at -196 degrees C on fertility of individual bull semen. *J Reprod Fertil* 1976; 47: 377-379.

Berger T. Proportion of males with lower fertility spermatozoa estimated from heterospermic insemination. *Theriogenology* 1995; 43: 769-775.

Berger T, Dally M. Do sire-dam interactions contribute significantly to fertility comparisons in heterospermic insemination trials. *Theriogenology* 2001; 56: 535-543.

Cheng FP, Fazeli A, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, Colenbrander B. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J Androl* 1996; 17: 674-682.

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. *J Androl* 2005; 26: 98-106.

Cole LJ. The effect of alcohol on the male germ cell, studied by means of double matings. *Science* 1914; 39: 476-477.

Davis AP, Graham JK, Foote RH. Homospermic versus heterospermic insemination of zona-free hamster eggs to assess fertility of fluorochrome-labeled acrosome-reacted bull spermatozoa. *Gamete Res* 1987; 17: 343-354.

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. *J Anim Sci* 1992; 70: 484-491.

Den Daas JH, De Jong G, Lansbergen LM, Van Wagtendonk-De Leeuw AM. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *J Dairy Sci* 1998; 81: 1714-1723.

Dziuk PJ. Double mating of rabbits to determine capacitation time. *J Reprod Fertil* 1965; 10: 389-395.

Evenson DP, Thompson L, Jost LK. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 1994; 41: 637-651.

Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25-43.

Flint AF, Chapman PL, Seidel GE Jr. Fertility assessment through heterospermic insemination of flow-sorted sperm in cattle. *J Anim Sci* 2003; 81: 1814-1822.

Fukami K, Yoshida M, Inoue T, Kurokawa M, Fissore RA, Yoshida N, Mikoshiba K, Takenawa T. Phospholipase Cdelta4 is required for Ca<sup>2+</sup> mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J Cell Biol* 2003; 161: 79-88.

Garner DL, Thomas CA, Gravance CG. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 1999; 34: 399-404.

Ghazalpour A, Doss S, Zhang B, Wang S, Plaisier C, Castellanos R, Brozell A, Schadt EE, Drake TA, Lusis AJ, Horvath S. Integrating genetic and network analysis to characterize genes related to mouse weight. *PLoS Genet* 2006; 2: 1182-1192.

Graham JK, Foote RH. Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: I. A fertility assay for fresh semen. *Gamete Res* 1987; 16: 133-145.

Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology* 2001; 55: 947-961.

Joerg H, Janett F, Schlatt S, Mueller S, Graphodatskaya D, Suwattana D, Asai M, Stranzinger G. Germ cell transplantation in an azoospermic Klinefelter bull. *Biol Reprod* 2003; 69: 1940-1944.

Kasimanickam R, Nebel RL, Peeler ID, Silvia WL, Wolf KT, McAllister AJ, Cassell BG. Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. *Theriogenology* 2006; 66: 1307-1315.

Kastelic JP, Thundathil JC. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod Dom Anim* 2008; 43: Suppl 2, 368-373.

Knapp LA, Ha JC, Sackett GP. Parental MHC antigen sharing and pregnancy wastage in captive pigtailed macaques. *J Reprod Immunol* 1996; 32: 73-88.

Lenz RW, Martin JL, Bellin ME, Ax RL. Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reactions in sperm with chondroitin sulfates. *J Dairy Sci* 1988; 71: 1073-1077.

Martin PA, Reimers TJ, Lodge JR, Dziuk PJ. The effect of ratios and numbers of spermatozoa mixed from two males on proportions of offspring. *J Reprod Fertil* 1974; 39: 251-258.

Martin PA, Dziuk PJ. Assessment of relative fertility of males (cockerels and boars) by competitive mating. *J Reprod Fertil* 1977; 49: 323-329.

Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl* 2006; 27: 201-211.

Moura AA, Chapman DA, Killian GJ. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from holstein bulls of documented fertility. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 214-222.

Nadir S, Saacke RG, Bame J, Mullins J, Degelos S. Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility, and embryo quality in artificially inseminated cattle. *J Anim Sci* 1993; 71: 199-204.

O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. Ca<sup>2+</sup> entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 1571-1584.

Ober C, Hyslop T, Elias S, Weitkamp LR, Hauck WW. Human leukocyte antigen matching and fetal loss: results of a 10 year prospective study. *Hum Reprod* 1998; 13: 33-38.

Overstreet JW, Adams CE. Mechanisms of selective fertilization in the rabbit: sperm transport and viability. *J Reprod Fertil* 1971; 26: 219-231.

Parrish JJ, Foote RH. Fertility differences among male rabbits determined by heterospermic insemination of fluorochrome-labeled spermatozoa. *Biol Reprod* 1985; 33: 940-949.

Parrish JJ, Foote RH. Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. *Biol Reprod* 1986; 35: 253-257.

Robl JM, Dziuk PJ. Penetration of mouse eggs at various intervals after insemination as influenced by concentration of sperm and strain of male. *J Exp Zool* 1987; 242: 181-187.

Schaeffer LR. Evaluation of bulls for nonreturn rates within artificial insemination organizations. *J Dairy Sci* 1993; 76: 837-842.

Schembri MA, Major DA, Suttie JJ, Maxwell C, Evans G. Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Reprod Fertil Dev* 2002; 14: 225-233.

Scherrer N, Wagner S. Stier "SILIAN". Semesterarbeit 2005; Schweizerische Hochschule für Landwirtschaft (SHL), Zollikofen.

Stahlberg R, Harlizius B, Weitze KF, Waberski D. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. *Theriogenology* 2000; 53: 1365-1373.

Stockley P. Female multiple mating behaviour, early reproductive failure and litter size variation in mammals. *Proc Biol Sci* 2003; 270: 271-278.

Stockley P. Sperm competition in mammals. *Hum Fertil* 2004; 7: 91-97.

Tardif AL, Farrell PB, Trouern-Trend V, Simkin ME, Foote RH. Use of Hoechst 33342 stain to evaluate live fresh and frozen bull sperm by computer-assisted analysis. *J Androl* 1998; 19: 201-206.

Van Doormaal BJ. Linear model evaluations of non-return rates for dairy and beef bulls in Canadian AI. *Can J Anim Sci* 1993; 73: 795-804.

Vicente JS, Viudes de Castro MP, Lavara R, Moce E. Study of fertilising capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in rabbit using DNA markers. *Theriogenology* 2004; 61: 1357-1365.

Wedekind C, Chapuisat M, Macas E, Rulicke T. Non-random fertilization in mice correlates with the MHC and something else. *Heredity* 1996; 77: 400-409.

Whitfield CH, Parkinson TJ. Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin. *Theriogenology* 1992; 38: 11-20.

Whitfield CH, Parkinson TJ. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). *Theriogenology* 1995; 44: 413-422.

Yamazaki K, Beauchamp GK. Genetic basis for MHC-dependent mate choice. *Adv Genet* 2007; 59: 129-145.

Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. In: Knobil, E, Neill, J. editors. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994, p. 189-317.



## 8 Dank

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir beim Erstellen dieser Arbeit auf die eine oder andere Art geholfen haben:

Herrn PD Dr. Fredi Janett, Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, für die Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung und die Übernahme des Referates.

Frau PD Dr. Annette Liesegang, Institut für Tierernährung, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. emerit. Dr. R. Thun, Universität Zürich, für die fachliche Unterstützung und die Korrekturen.

Den Herren Dres Ueli Witschi und Josef Kneubühler, Swisshgenetics, die diese Arbeit ermöglicht haben, für die freundliche Betreuung und die finanzielle Unterstützung durch Swisshgenetics.

Herrn Adrian Urwyler, Cytolab, für die Anleitung bei den flowzytometrischen Analysen.

Herrn Dr. Fritz Schmitz-Hsu, Swisshgenetics, für die Unterstützung bei der Identifizierung der Kälber von SILIAN-2 und bei der Berechnung der Non-Return-Raten der Stiere.

Herrn Dr. Hannes Jörg, ETH Zürich, für die Hilfe bei den genetischen Analysen und seinen unermüdlichen Einsatz.

Frau Dr. Sonja Hartnack, Institut für Epidemiologie, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, für die geduldige Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Allen Labor- und Stallmitarbeitern von Swisshgenetics Mülligen für die freundliche Aufnahme und Unterstützung während der gesamten Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Marianne Gloor für die Hilfe bei der Beprobung der Kälber und die grosszügige Hilfe bei Problemen jeglicher Art.

Therese Schafroth, Swisshgenetics, für die Einarbeitung im Labor.

Barbara Gromadzinska, Swisshgenetics, für die freundschaftliche Hilfe bei den Laborarbeiten.



Dr. Cornelia Iten und Dr. Rainer Saner, Swissgenetics, für die Abwechslung vom Laboralltag.

Den Besamungstechnikern Hans Burkhalter, Reto Müller, Philipp Bucher, Rolf Althaus und Hanspeter Mathis, Swissgenetics, für die Hilfe bei der Beprobung der Kälber.

Den Mitarbeitern der Qualitas AG Zug, für die freundliche Aufnahme und Hilfe bei den genetischen Analysen.

Den Mitarbeitern des Genetiklabors, ETH Zürich, für die Überlassung der Messgeräte.

Meiner Familie und der Familie Jansen möchte ich für die stetige Unterstützung sehr herzlich danken. Meinem Bruder Daniel gilt ein spezieller Dank für die Hilfe bei der Planung der Kälberbeprobung. Der tiefste Dank geht an meinen Partner Lukas für seine Liebe, Geduld und die Schulter zum Anlehnen.





## Lebenslauf

Name, Vornamen: Inversini, Mirjam Claudia

Geburtsdatum: 22. August 1984

Geburtsort: Baden AG

Nationalität: CH

Heimatort: Utzenstorf BE

1991 – 1997 Primarschule Langenthal

1997 – 1999 Untergymnasium Langenthal

1999 – 2003 Gymnasium Langenthal  
Matura 2003, Schwerpunktfach Biologie und Chemie

2004 – 2009 Studium der Veterinärmedizin, Schwerpunkt Nutztiere, an der  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

15.10.2009 Staatsexamen an der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

2009 - 2010 Doktorandin an der Klinik für Fortpflanzungsmedizin der  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

2010 – dato Assistenztierärztin in der Tierarztpraxis Rüdiger GmbH in  
Endingen AG

Freienwil, 2.2.2011