

**HELENA SCHNEIDER**

---

UNTERSUCHUNGEN ZUR KRYOKONSERVIERUNG  
VON PSITTAZIDENSPERMA AM BEISPIEL DES  
NYMPHENSITTICHS (*NYMPHICUS HOLLANDICUS*)



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Michael Lierz

**UNTERSUCHUNGEN ZUR KRYOKONSERVIERUNG  
VON PSITTAZIDENSPERMA AM BEISPIEL DES  
NYMPHENSITTICHS (*NYMPHICUS HOLLANDICUS*)**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Helena Schneider**

Tierärztin aus Trier

Gießen 2018

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

---

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Lierz

2. Gutachterin: Prof. Dr. Christine Wrenzycki

Prüfer: Prof. Dr. Martin Bergmann

Tag der Disputation: 26. Juli 2018

## **Widmung**

*meinen Eltern & meiner Schwester*



## Vorwort

**DAS** *Leben*

*wär* **nur**

**halb** *so nett,*

wenn **KEINER**

einen **Vogel**

**HÄTT'**

[unbekannt]

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits auf Kongressen vorgestellt, beziehungsweise in Fachzeitschriften veröffentlicht.

#### Publikationen

**SCHNEIDER, H., FISCHER, D., BERGMANN, M., EHLING, C., MEINECKE-TILLMANN, S., WEHREND, A., LIERZ, M. (2014).** Investigations into cryopreservation of psittacine semen. Abstracts. *Reproduction in Domestic Animals* (49):s1, 39-40.

**SCHNEIDER, H., FISCHER, D., BERGMANN, M., EHLING, C., MEINECKE-TILLMANN, S., WEHREND, A., LIERZ, M. (2014).** Untersuchungen zur Kryokonservierung von Psittazidensperma. *Tierärztliche Praxis Kleintiere* 3/2014, A27-A28.

**SCHNEIDER, H., FISCHER, D., FAILING, K., EHLING, C., MEINECKE-TILLMANN, S., WEHREND, A., LIERZ, M. (2017).** Investigations on different semen extenders for cockatiel semen. *Journal of Zoo Biology* 1(1), 1-12.

**SCHNEIDER, H., FISCHER, D., FAILING, K., EHLING, C., MEINECKE-TILLMANN, S., WEHREND, A., LIERZ, M. (2018).** Investigations on a cryopreservation protocol for long-term semen storage of psittacine semen using cockatiel spermatozoa as a model. *Theriogenology* 110, 8-17.

Vorträge

**SCHNEIDER, H., FISCHER, D., BERGMANN, M., EHLING, C., MEINECKE-TILLMANN, S., WEHREND, A., LIERZ, M. (2013).** Investigations into cryopreservation of psittacine semen. 1st International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine (ICARE), Wiesbaden, Deutschland, 20. – 26.04.2013\*

**\* Ausgezeichnet mit dem 2. Platz des Helga-Gerlach-Student Awards**

**SCHNEIDER, H., FISCHER, D., BERGMANN, M., EHLING, C., MEINECKE-TILLMANN, S., WEHREND, A., LIERZ, M. (2014).** Investigations into cryopreservation of psittacine semen. 47. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 35. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung 2014, Gießen, Deutschland, 27.-28.02.2014.

**SCHNEIDER, H., FISCHER, D., BERGMANN, M., EHLING, C., MEINECKE-TILLMANN, S., WEHREND, A., LIERZ, M. (2014).** Untersuchungen zur Kryokonservierung von Psittazidensperma. 1. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe "Zier-, Zoo- und Wildvögel, Reptilien und Amphibien" München, Deutschland, 06.-08.03.2014.

**SCHNEIDER, H. und LIERZ, M. (2014).** Die assistierte Reproduktion im Papageienartenschutz. 18. Tagung des Fonds für bedrohte Papageien, Berlin, Deutschland, 04.-07.09.2014.

**SCHNEIDER, H., FISCHER, D., EHLING, C., MEINECKE-TILLMANN, S., WEHREND, A., LIERZ, M. (2013).** Investigations on cryopreservation of psittacine semen. 3rd International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine (ICARE), Venedig, Italien, 25. – 29.03.2017.

Teile der Arbeit wurden finanziell unterstützt von der Loro Parque Fundación (Projektnummer: PP-75-2011-1), sowie von der Justus-Liebig-Universität in Form eines Graduiertenstipendiums.



# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>III. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>X</b>
<b>IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>5</b>
2.1 Papageien (Psittaciformes).....	5
2.1.1 Kennzeichen und Verbreitung .....	5
2.1.2 Systematik und Verwandtschaft.....	6
2.1.3 Fortpflanzungsverhalten innerhalb der Ordnung <i>Psittaciformes</i> .....	10
2.1.4 Der Nymphensittich ( <i>Nymphicus hollandicus</i> ).....	11
2.2 Anatomie des Geschlechtsapparates von Papageien.....	14
2.2.1 Weibliche Geschlechtsorgane.....	14
2.2.2 Männliche Geschlechtsorgane.....	17
2.3 Spermagewinnung beim Vogel.....	25
2.3.1 Kooperative Ejakulation.....	25
2.3.2 Massagetechnik .....	26
2.3.3 Elektroejakulation .....	28
2.4 Artificielle Insemination.....	29
2.5 Spermaqualitätsuntersuchung .....	31
2.5.1 Makroskopische Untersuchung .....	31
2.5.2 Chemisch-physikalische Untersuchung .....	33
2.5.3 Mikroskopische Untersuchung .....	34
2.6 Spermakonservierung.....	41
2.6.1 Kurzzeitkonservierung .....	41
2.6.2 Langzeitkonservierung.....	44
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>57</b>
3.1 Nymphensittiche und Unterbringung.....	57
3.1.1 Männliche fertile Nymphensittiche zur Spermagewinnung.....	58
3.1.2 Weibliche Nymphensittiche.....	58
3.1.3 Männliche sterilisierte Nymphensittiche.....	58
3.2 Spermagewinnung von männlichen, fertilen Nymphensittichen.....	59
3.3 Vorversuch.....	61
3.3.1 Makroskopische Spermauntersuchung.....	61

3.3.2	Chemisch-physikalische Spermauntersuchung .....	63
3.3.3	Mikroskopische Spermauntersuchung .....	64
3.3.4	Transmissionselektronenmikroskopie .....	66
3.4	Hauptversuch .....	68
3.4.1	Herstellung der Verdünner .....	68
3.4.2	Spermaqualitätsuntersuchungen .....	70
3.4.3	Evaluierung der Verdünner .....	73
3.4.4	Evaluierung der Kryoprotektiva .....	75
3.4.5	Evaluierung der Kühlrate .....	77
3.4.6	Evaluierung verschiedener Auftau- bzw. Erwärmmethoden .....	84
3.4.7	Transmissionselektronenmikroskopie .....	89
3.4.8	Fertilisationsversuch .....	89
3.5	Statistische Auswertung .....	98
3.5.1	Vorversuch .....	98
3.5.2	Hauptversuch .....	98
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>101</b>
4.1	Vorversuch .....	101
4.1.1	Makroskopische Spermauntersuchung .....	101
4.1.2	Chemisch-physikalische Spermauntersuchung .....	102
4.1.3	Mikroskopische Spermauntersuchung .....	103
4.1.4	Transmissionselektronenmikroskopie .....	103
4.2	Hauptversuch .....	106
4.2.1	Herstellung der Verdünner .....	106
4.2.2	Evaluierung der Verdünner .....	106
4.2.3	Evaluierung der Kryoprotektiva .....	113
4.2.4	Evaluierung der Kühlrate .....	121
4.2.5	Evaluierung verschiedener Auftau- bzw. Erwärmmethoden .....	128
4.2.6	Transmissionselektronenmikroskopie .....	130
4.2.7	Fertilisationsversuch .....	131
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>136</b>
5.1	Spermagewinnung .....	136
5.2	Vorstudie .....	138
5.3	Hauptstudie .....	142
5.3.1	Evaluierung der Verdünner .....	142
5.3.2	Evaluierung der Kryoprotektiva .....	150
5.3.3	Evaluierung der Kühlrate .....	154
5.3.4	Evaluierung verschiedener Auftau- bzw. Erwärmmethoden .....	158

---

5.3.5	Transmissionselektronenmikroskopie .....	159
5.3.6	Fertilisationsversuch .....	162
5.4	Schlussbetrachtungen und offene Fragestellungen .....	167
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>170</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>173</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>176</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>200</b>
9.1	Protokolle.....	200
9.1.1	Protokoll zur Spermaentnahme.....	200
9.1.2	Protokoll zur Evaluierung der Verdünner .....	201
9.1.3	Protokoll zur Evaluierung der Kryoprotektiva .....	202
9.1.4	Protokoll zur Evaluierung des Einfrier – und Auftauprozesses..	203
9.1.5	Protokoll zur artifiziiellen Insemination.....	204
9.1.6	Protokoll Nistkastenkontrolle .....	205
9.1.7	Protokoll zur morphologischen Auswertung.....	206
9.1.8	Spermienmorphologie aus MARVAN U. A. (1981) .....	207
9.2	Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse .....	208
9.2.1	Evaluierung der Verdünner .....	208
9.2.2	Evaluierung der Kryoprotektiva .....	209
9.3	Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse .....	210
9.3.1	Evaluierung der Verdünner.....	210
9.3.2	Evaluierung der Kryoprotektiva .....	211
9.3.3	Evaluierung der Kühlrate .....	211
9.4	Statistische Werte zu den Grafiken .....	212
9.4.1	Evaluierung der Verdünner.....	212
9.4.2	Evaluierung der Kryoprotektiva .....	215
9.4.3	Evaluierung der Kühlrate .....	220
9.4.4	Evaluierung der Auftaumethoden .....	221
9.4.5	Fertilisationsversuch .....	222
9.5	Multiple logistische Regressionsanalyse des Fertilisationsversuches...	222
9.6	Detaillierte Ergebnistabellen .....	223
9.6.1	Evaluierung der Verdünner.....	223
9.6.2	Evaluierung der Kryoprotektiva .....	229
9.6.3	Evaluierung der Kühlrate .....	239
9.6.4	Evaluierung der Auftaumethoden nach Vitrifikation .....	241
9.6.5	Transmissionselektronenmikroskopie .....	243
9.6.6	Fertilisationsversuch .....	244

9.7 Geräte .....	245
9.8 Verbrauchsmaterialien .....	247
9.9 Chemikalien .....	249
9.10       Rezepte der verwendeten Medien.....	252
9.10.1   Rezepte der Verdünner .....	252
9.10.2   Rezepte diverser Gebrauchsmedien .....	253
9.10.3   Zusammensetzung des Vit Kit®-Thaw .....	254
9.11       Herstellerangaben .....	255
<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>260</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>262</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetische Einteilung der Papageien nach COLLAR (1997) und ROWLEY (1997).....	8
Abbildung 2: Phylogenetische Zusammengehörigkeit der Papageienarten nach WRIGHT U. A. (2008).....	9
Abbildung 3: Geschlechtsdimorphismus bei wildfarbenen Nymphensittichen ( <i>Nymphicus hollandicus</i> ).....	11
Abbildung 4: Verbreitung des Nymphensittichs nach FORSHAW UND COOPER (1977) .....	12
Abbildung 5: Illustration von Längs- und Querschnitten eines Nymphensittichspermiums nach JAMIESON U. A. (1995).....	20
Abbildung 6: Digitale Illustration: Urogenitaltrakt eines weiblichen, hormonell aktiven Papageis Nebennieren (1); kranialer (2), mittlerer (2') und kaudaler (2'') Teil der Niere; Ovar (3); Eileiter (4); dorsales Eileiterband (5); ventrales Eileiterband (6); Harnleiter (7); Rektum (8); Kloake (9); Ventus (10); Quelle: HERMANN (2014). .....	23
Abbildung 7: Digitale Illustration: Urogenitaltrakt eines männlichen, hormonell aktiven Papageis Nebennieren (1); kranialer (2), mittlerer (2') und kaudaler (2'') Teil der Niere; Hoden (3); Samenleiter (4); Harnleiter (5); Rektum (6); Kloake (7); Ventus (8); Quelle: HERMANN (2014) .....	23
Abbildung 8: Physikalische Vorgänge beim Gefrierprozess nach MAZUR (1984) rechts oben: reversible Dehydratation der Zelle durch langsame Kühlung; rechts mittig: intrazelluläre Eiskristallbildung bei schneller Kühlung; rechts unten: Ausbleiben der intrazellulären Eiskristallbildung durch Vitrifikation.....	48
Abbildung 9: Fixation und Anwendung der Massagemethode bei einem männlichen Nymphensittich ( <i>Nymphicus hollandicus</i> ) .....	60
Abbildung 10: Digitale Illustration: Aufsaugen des Spermatropfens in die skalierte Mikrokapillare (a); Quelle: HERMANN (2014).....	60
Abbildung 11: Einteilung der Ejakulatfarbe und –konsistenz von Nymphensittichsperma .....	62
Abbildung 12: Berechnung der Gefrierpunktniedrigung einer wässrigen Lösung mit einer Osmolalität von 1 osmol/l im Vergleich zu reinem Wasser .....	64
Abbildung 13: Berechnung der Spermienkonzentration von Nymphensittichsperma mit Hilfe der Assistent® Neubauer-improved Zählkammer .....	66
Abbildung 14: Im Hauptversuch verwendete Spermaverdüner mitsamt Literaturangabe der Originalveröffentlichung .....	69

Abbildung 15: Berechnung der Spermiengesamt- und vorwärtsbeweglichkeit aus mikroskopisch untersuchten Proben von Nymphensittichsperma .....	71
Abbildung 16: Supravitalfärbungen zur Evaluierung der Spermienviabilität in 400facher Vergrößerung (A) Eosin B; (B) Fluoreszenz; Pfeil: lebendes Spermium; Pfeilspitze: totes Spermium .....	72
Abbildung 17: Aufteilung der nativen Spermapoolprobe im Zuge der Verdünnerevaluierung 1%G, 1%ige Glukoselösung; SV, Spermaverdünner: Lake-Verdünner (1), Blanco-Verdünner (2), BPSE (3); in Klammern angegeben ist die Verdünnungsstufe .....	75
Abbildung 18: Aufteilung der nativen Spermapoolprobe im Zuge der Kryoprotektivaevaluierung SV, Spermaverdünner (aus Kapitel 4.2.2); DMSO, Dimethylsulfoxid; DMA, Dimethylacetamid; in Klammern angegeben ist die Endkonzentration .....	77
Abbildung 19: Berechnung der Endkonzentration der Kryoprotektiva .....	77
Abbildung 20: Vitrifikationsset der Firma Minitüb GmbH Kammer zur Vorkühlung der OPS Behälter (1); Vitrifikationskammer (2); Aufbewahrungskammer für Flachkassetten (3); Edelstahlpinzetten (4); Edelstahlblock zur Fixierung der OPS Behälter (5); OPS Röhrchen & Behälter (6); Flachkassette zur Aufbewahrung der Behälter (7) (Quelle: <a href="http://www.minitube.de">www.minitube.de</a> ).....	79
Abbildung 21: Vitrifikationszubehör der Firma Minitüb GmbH OPS Röhrchen (1); Behälter zur Aufbewahrung von OPS Röhrchen mit trichterförmiger Öffnung (2); Flachkassette (3) .....	79
Abbildung 22: Kalibrierung des Einfrierautomaten: Anstieg der Proben temperatur (blau) im Vergleich zur Kammertemperatur (rot) am Kristallisationspunkt. Angestrebter Temperaturverlauf (grün) .....	82
Abbildung 23: Kalibrierung des Einfrierautomaten: Ausgleich des Anstiegs der Proben temperatur (blau) durch rasches Absenken der Kammertemperatur (rot) am Kristallisationspunkt. Angestrebter Temperaturverlauf (grün) „automatic seeding“ .....	82
Abbildung 24: Kompletter Verlauf eines Einfriervorgangs einer Probe mit Hilfe des Einfrierautomaten. Angestrebter Temperaturverlauf (grün); Kammertemperatur (rot); Proben temperatur (blau) .....	84
Abbildung 25: Vorgehen beim Erwärmen mit Hilfe des Vit Kit®-Thaw nach Herstellerangaben Erwärmlüssigkeit [Thawing Solution (TS)]; Verdünnerflüssigkeit [Dilution Solution (DS)]; Waschflüssigkeit [Washing Solution (WS)].....	88

Abbildung 26: Technische Ausrüstung zur endoskopischen Sterilisation Kamerakopf (1); Lichtkabel (2); Vogel-Untersuchungsschaft (3); Vorausblick-Optik (4); flexible Biopsiezange (5).....	90
Abbildung 27: Endoskopische Sterilisation der männlichen Nymphensittiche ( <i>Nymphicus hollandicus</i> ) (A) linke Lunge (1), Luftsackgrenze zwischen kranialem und kaudalem thorakalen Luftsack (2); (B) linker Hoden (1), kranialer Nierenpol (2), linke Nebenniere (3); (C) Samenleiter ( <i>Ductus deferens</i> ) (1), Harnleiter ( <i>Ureter</i> ) (2), Kloake (3); (D) Niere (1), Samenleiter (2), Harnleiter (3), Darm (4); (E) mit der flexiblen Biopsiezange (1) wird der Samenleiter (2) gefasst; (F) durch leichten Zug mit Hilfe der flexiblen Biopsiezange (1) wird der Samenleiter (2) vom Harnleiter (3) gelöst .....	93
Abbildung 28: Vorbereitete Pipette zur artifiziiellen Insemination von weiblichen Nymphensittichen Venenverweilkanüle (1), Pipettenspitze, das Sperma enthaltend (2), Pipette (3).....	95
Abbildung 29: Fixation eines weiblichen Nymphensittichs zur artifiziiellen Insemination.....	96
Abbildung 30: Digitale Illustration einer artifiziiellen Insemination beim Papagei Venenverweilkanüle (a) und Spekulum (b); (c) markiert die Adaptionstelle zum Aufsatz einer Pipette .....	96
Abbildung 31: Einzelmesswerte und berechneter Mittelwert ( $\emptyset$ ) der Osmolalität von Spermepoolproben (n=9) .....	104
Abbildung 32: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (Längsschnitt): Intaktes Mittelstück eines Nymphensittichspermiums; Nucleus (1), Mitochondrium (2), proximales Zentriol (4), distales Zentriol (4), intakte Membran (5) .....	105
Abbildung 33: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (Querschnitt): <i>Pars principalis</i> eines Nymphensittichspermiums mit typischer 9x2+2 Mikrotubulstruktur	105
Abbildung 34: Mittelwerte aus 8 Messungen in Prozent der Spermienesamtmotilität beim Vergleich der verschiedenen Spermaverdüner in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 64) 1%ige Glukoselösung (1%G); Spermaverdüner (SV).....	108
Abbildung 35: Mittelwerte aus 8 Messungen in Prozent der Spermienvorwärtsmotilität beim Vergleich der verschiedenen Spermaverdüner in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 64) 1%ige Glukoselösung (1%G); Spermaverdüner (SV); p ≤ 0,05 (*).....	108
Abbildung 36: Mittelwerte und Standardabweichungen in Prozent der Spermienviabilität in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der nativen Spermepoolproben mit verschiedenen Spermaverdünnern in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 150) 1%ige Glukoselösung (1%G); Spermaverdüner (SV); p < 0,01 (**) .....	110

- Abbildung 37: Morphologie von Nymphensittichspermien in Eosin B-Ausstrichen (A) normales Spermium; (B) Spermium mit Kopfveränderung, gebogener Kopf (1); (C) Spermium mit Schwanzveränderung, Retroversion der Geißel (2)..... 112
- Abbildung 38: Mittelwerte in Prozent der morphologischen Spermienveränderungen in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der unterschiedlichen Spermaverdünner (n = 150) 1%ige Glukoselösung (1%G); Spermaverdünner (SV),  $p < 0,0001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*);  $p \leq 0,05$  (\*) ..... 112
- Abbildung 39: Mittelwerte in Prozent der Spermiengesamtmotilität beim Vergleich der verschiedenen Kryoprotektiva in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 96) Dimethylacetamid (DMA); Dimethylsulfoxid (DMSO);  $p < 0,0001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*). 115
- Abbildung 40: Mittelwerte in Prozent der Spermienvorwärtsmotilität beim Vergleich der verschiedenen Kryoprotektiva in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 96) Dimethylacetamid (DMA); Dimethylsulfoxid (DMSO);  $p < 0,0001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*). 115
- Abbildung 41: Färbeartefakte in Eosin B-Ausstrichen Eosin B-Ausstriche nach Zusatz von DMSO (A) und DMA (B) mit einzelnen Spermien (1), die von konzentrierten Arealen der Färbelösung umgeben sind ..... 117
- Abbildung 42: Mittelwerte und Standardabweichungen in Prozent der Spermienviabilität in Eosin B- und SYBR-14/PI-Ausstrichen beim Vergleich der nativen Spermaproben mit verschiedenen Kryoprotektiva in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 240) Dimethylacetamid (DMA); Dimethylsulfoxid (DMSO);  $p < 0,0001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*). 117
- Abbildung 43: Mittelwerte in Prozent der morphologischen Spermienveränderungen in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der verdünnten Spermaproben mit verschiedenen Kryoprotektiva in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 240) Dimethylacetamid (DMA); Dimethylsulfoxid (DMSO);  $p < 0,0001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*). 121
- Abbildung 44: Mittelwerte und Standardabweichungen in Prozent der Spermienmotilität (MOT und PMOT) und -viabilität beim Vergleich der Vitrifikationsmethoden (n = 8) Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT) ..... 123
- Abbildung 45: Mittelwerte in Prozent der Spermiengesamt- und vorwärtsmotilität, sowie der -viabilität beim Vergleich der verschiedenen Kryoprotektiva und Konzentrationen beim direkten Eintauchen in flüssigen Stickstoff (n = 24) Gesamtmotilität (MOT), Vorwärtsmotilität (PMOT) ..... 124
- Abbildung 46: Mittelwerte in Prozent der Spermiengesamt- und vorwärtsmotilität, sowie der -viabilität beim Vergleich der verschiedenen Einfriermethoden (n = 62) Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT);  $p < 0,0001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*)... 127
- Abbildung 47: Mittelwerte in Prozent der morphologischen Spermienveränderungen in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der verschiedenen Einfriermethoden (n = 62) Dimethylacetamid (DMA); Dimethylsulfoxid (DMSO);  $p < 0,0001$  (\*\*\*) ;  $p \leq 0,05$  (\*) ... 127

---

Abbildung 48: Mittelwerte in Prozent der Spermiengesamt- und vorwärtsmotilität, sowie der -viabilität beim Vergleich der verschiedenen Auftaumethoden (n = 56).....	129
Abbildung 49: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (Querschnitt): Integritätsverlust der Spermienmembran im Kopfbereich eines Nymphensittichspermiums (1) .....	130
Abbildung 50: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (Längsschnitt): Ablösung der Spermienmembran im Kopfbereich eines Nymphensittichspermiums (1).....	131
Abbildung 51: Spermavolumen und Spermiodosen zur artifiziiellen Insemination bei Nymphensittichen Mittelwerte der für Inseminationen genutzten Spermienkonzentration (Csp), des inseminierten Volumens (Vi), sowie der Inseminationsdosis pro artifiziieller Insemination und Tier im Vergleich der Experimente und der Spermaproben (n= 12) .....	134

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleichende Mittelwerte (und Standardabweichungen) von Spermaparametern verschiedenen Vogelspezies aus unterschiedlichen Ordnungen.....	40
Tabelle 2: Vorabbeurteilung der Spermienanzahl von Nymphensittichsperma unmittelbar nach der Entnahme im Inneren der Kapillare .....	62
Tabelle 3: Vorabbeurteilung der Spermienbeweglichkeit von Nymphensittichsperma unmittelbar nach der Entnahme im Inneren der Kapillare .....	62
Tabelle 4: Detaillierte Darstellung der in den Inseminationsversuchen verwandten Spermienkonzentrationen, Inseminationsvolumina und entsprechenden Inseminationsdosen (n = 12) .....	97
Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der Spermaparameter (Volumen, Dichte, Beweglichkeit, ph-Wert, Osmolalität, Vitalität, Konzentration und Gesamtzahl) der Qualitätsuntersuchung im Vorversuch .....	104
Tabelle 6: Verlauf der Kammertemperatur (Temp.) zu verschiedenen Zeitpunkten beim computerkontrollierten Einfrieren 8%iger DMA Proben mit Hilfe des IceCube 14S .....	126
Tabelle 7: Resultierende p-Werte der dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Verdünner, Verdünnungsstufe und Zeit, evaluiert anhand von Nymphensittichsperma. Dargestellt: Globaler Vergleich .....	208
Tabelle 8: Resultierende p-Werte der dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Kryoprotektivum, Konzentration und Zeit, evaluiert anhand von Nymphensittichsperma. Dargestellt: Globaler Vergleich .....	209
Tabelle 9: Resultierende p-Werte einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Verdünner und Zeit, evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	210
Tabelle 10: Resultierende p-Werte einer zweifaktoriellen Varianzanalyse des paarweisen Vergleichs der Spermaverdünner mit 1%iger Glukoselösung, evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	210
Tabelle 11: Resultierende p-Werte einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Konzentration und Zeit, evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	211
Tabelle 12: Resultierende p-Werte einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Zeit, evaluiert anhand von Nymphensittichsperma...	211
Tabelle 13: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichungen (SD), Mediane ( $x$ ), Quartile (Q1 Und Q3), sowie Minima ( $x_{\min}$ ) und Maxima ( $x_{\max}$ ) der Gesamtmotilität (MOT) in Prozent im	

---

Vergleich der verschiedenen Spermaverdünnern und Verdünnungsstufen (n = 64) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	212
Tabelle 14: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichungen (SD), Mediane ( $x$ ), Quartile (Q1 Und Q3), sowie Minima ( $x_{\min}$ ) und Maxima ( $x_{\max}$ ) der Vorwärtsmotilität (PMOT) in Prozent im Vergleich der verschiedenen Spermaverdünnern und Verdünnungsstufen (n = 64) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	213
Tabelle 15: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermienvitalität in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der nativen Spermabproben mit verschiedenen Spermaverdünnern in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 150) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	214
Tabelle 16: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermienmorphologie in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der nativen Spermabproben mit verschiedenen Spermaverdünnern in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 140) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	215
Tabelle 17: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichungen (SD), Mediane ( $x$ ), Quartile (Q1 Und Q3), sowie Minima ( $x_{\min}$ ) und Maxima ( $x_{\max}$ ) der Gesamtmotilität (MOT) in Prozent im Vergleich der verschiedenen Kryoprotektiva und Konzentrationen (n = 96) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	216
Tabelle 18: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichungen (SD), Mediane ( $x$ ), Quartile (Q1 Und Q3), sowie Minima ( $x_{\min}$ ) und Maxima ( $x_{\max}$ ) der Vorwärtsmotilität (PMOT) in Prozent im Vergleich der verschiedenen Kryoprotektiva und Konzentrationen (n = 96) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	217
Tabelle 19: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermienvitalität in SYBR-14/PI Ausstrichen beim Vergleich der nativen Spermabproben mit Spermaverdünnern und verschiedenen Kryoprotektiva in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 240) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	218
Tabelle 20: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermienmorphologie in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der verdünnten Spermabproben mit verschiedenen Kryoprotektiva in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 240) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	219
Tabelle 21: Mittelwerte und Standardabweichungen der Gesamtmotilität (MOT), Vorwärtsmotilität (PMOT) und der Spermienvitalität in SYBR-14/PI Ausstrichen in Prozent im Vergleich der verschiedenen Kühlraten (n = 62) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	220
Tabelle 22: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermiengesamt- und vorwärtsmotilität, sowie der Spermienvitalität in Eosin B-	

Ausstrichen beim Vergleich der Vitrifikation ohne Kryoprotektivum und mit CryoSOfree™ (n = 16) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	220
Tabelle 23: Mittelwerte (x) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermiengesamt- und vorwärtsmotilität, sowie der Spermienvitalität in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich verschiedener Kryoprotektiva und der Methode des direkten Eintauchens (n = 24) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma.....	221
Tabelle 24: Mittelwerte (x) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermienmorphologie in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der verschiedenen Einfriermethoden (n = 62) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	221
Tabelle 25: Mittelwerte (x) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermiengesamt- und vorwärtsmotilität, sowie der Spermienvitalität in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der verschiedenen Auftaumethoden nach Vitrifikation (n = 56) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	221
Tabelle 26: Mittelwerte (x), Standardabweichungen (SD), Mediane (x), Quartile (Q1 Und Q3), sowie Minima ( $x_{\min}$ ) und Maxima ( $x_{\max}$ ) der Spermienkonzentration, Inseminationsvolumina und Inseminationsdosen (n = 12) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma .....	222
Tabelle 27: Multiple logistische Regression der Befruchtungs- und Absterberaten von Nymphensitticheiern nach der artifiziellen Insemination mit Frisch- und Tiefgefriersperma .....	222
Tabelle 28: Detaillierte Ergebnisdarstellung ausgewählter Spermaparameter von Nymphensittichen nach Zusatz verschiedener Spermaverdünner im Zuge der Verdünnerevaluierung (n = 64) .....	223
Tabelle 29: Detaillierte Ergebnisdarstellung ausgewählter Spermaparameter von Nymphensittichen nach Zusatz verschiedener Kryoprotektiva im Zuge der der Kryoprotektivaevaluierung (n = 96).....	229
Tabelle 30: Detaillierte Ergebnisdarstellung ausgewählter Spermaparameter von Nymphensittichen vor und nach dem Einfrieren mit verschiedenen Kühlraten im Zuge der der Kühlratenevaluierung (n =31).....	239
Tabelle 31: Detaillierte Ergebnisdarstellung ausgewählter Spermaparameter von Nymphensittichen vor und nach dem Auftauen mit verschiedenen Auftaumethoden im Zuge der der Auftaumethodenevaluierung (n = 28) .....	241
Tabelle 32: Vorkommen von Plasmamembranveränderungen von Nymphensittichspermien vor der Kryokonservierung (n = 25) und nach dem Auftauen (n = 25) in vier transmissionselektronenmikroskopisch untersuchten Spermienabschnitten (Akrosom, Kopf, Verbindungsstück, Schwanz) .....	243

---

Tabelle 33: Ergebnisse der beiden Inseminationsexperimente von Nymphensittichen mit Frischsperma und Tiefgefriersperma.....	244
--	-----

#### IV. Abkürzungsverzeichnis

$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
$\tilde{x}$	Median
$\Delta$	Delta, gr. für Differenz
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
$\mu\text{l}$	Mikroliter
1%G	1%ige Glukoselösung
Abb.	Abbildung
Abn.	Abnormität
ad	lat. für bis zu, bis auf
AI	Artifizielle Insemination
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> , lat. für destilliertes Wasser
AR	Assistierte Reproduktion
ATP	Adenosintriphosphat
avg.	average, engl. für durchschnittlich
BCS	Body Condition Score, engl. für Körperkondition
bzw.	beziehungsweise
CASA	Computer-assisted semen analysis, engl. für computergestützte Spermienanalyse
$c_K$	Konzentration Kryoprotektivum
cm	Zentimeter
Coef.	Regressionskoeffizient
$c_{\text{Sp}}$	Spermienkonzentration

---

C <sub>SV</sub>	Verdünnungsstufe Spermaverdünner
d. h.	das heißt
DMA	Dimethylacetamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
et al.	et alii, lat. für und andere
g	Gramm
HCl	chemische Summenformel für Salzsäure
in.	inch, engl. Maßeinheit, entspricht 25,4 mm
IUCN	International Union for Conservation of Nature and Natural Resources engl. für Internationale Union zur Bewahrung der Natur und natürlicher Ressourcen
K	Kryoprotektivum
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
LN <sub>2</sub>	liquid nitrogen, engl. für flüssiger Stickstoff
M	mol/Liter
mEq/l	Milliäquivalent pro Liter
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimol/Liter
mOsm	Milliosmol
mOsm/l	Milliosmol/Liter
mA	Milliampere
MOT	Gesamtmotilität

MW	Molecular Weight, engl. für Molekulargewicht [g/mol]
n	Anzahl
n. s.	nicht signifikant
NaOH	chemische Summenformel für Natronlauge
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug, engl. für nicht-steroidales Antiphlogistikum
OPS	open-pulled straw, engl. Bezeichnung für spezielle Röhrchen zum Tiefgefrieren von Sperma
OR	Odds Ratio, engl. für Quotenverhältnis
p	p-value von probability, engl. für Wahrscheinlichkeit p-Wert (Signifikanzwert)
PBS Salzlösung	phosphate buffered saline, engl. für phosphatgepufferte
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidiumjodid
PMOT	Vorwärtsmotilität
Q1	1. Quartil
Q3	3. Quartil
rpm	rounds per minute, engl. für Umdrehungen pro Minute
SD	standard deviation, engl. für Standardabweichung
SGZ	Spermiengesamtzahl
SST	semen storage tubules, engl. Bezeichnung für Uterovaginaldrüsen
SV	Spermaverdünner
t	Zeit

---

Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TES	N-tris [Hydroxy-methyl] methyl-2-aminoethansulfonsäure
TG-Sperma	Tiefgefriersperma
V	Volt
VB	Verbindungsstück
vgl.	vergleiche
$V_i$	Inseminationsvolumen
$V_{Sp}$	Spermavolumen
X	Wechselwirkung
$X_{max}$	Maximalwert
$X_{min}$	Minimalwert



## 1. Einleitung und Fragestellung

Von den annähernd 11000 Spezies aus der Klasse der Vögel (*Aves*) zählen derzeit 414 Arten zur Ordnung der Papageien (*Psittaciformes*) (IUCN, 2016). Ungefähr ein Drittel dieser Spezies werden von der „International Union for Conservation of Nature and Natural Resources“ (IUCN) als bedrohte Arten gelistet und nach der „IUCN Red List of Threatened Species<sup>TM</sup>“ in verschiedene Kategorien eingeteilt (IUCN, 2016). Das bekannteste Beispiel für eine vom Aussterben bedrohte („critically endangered“) Art ist der Spix-Ara (*Cyanopsitta spixii*), der in der freien Natur seit 2000 offiziell als ausgestorben gilt und mit einer Population von unter 100 Tieren in Menschenobhut eine der wohl seltensten Vogelarten der Welt ist.

Als Hauptbedrohung und Ursache für den Rückgang der Artenvielfalt wird neben illegalem Handel und artspezifisch geringer Reproduktionsrate (kleine Gelegegröße bei Großpapageien) die fortschreitende Habitatzerstörung angesehen (TILMAN U. A., 1994). Als Gegenmaßnahme wird der Schutz frei lebender Bestände in ihren natürlichen Lebensräumen angestrebt. Da diese Maßnahmen aber in einigen Fällen nicht ausreichen, um den Populationserhalt im Freiland zu gewährleisten (CURIO, 1996), wird eine gezielte Nachzucht bedrohter Spezies in Menschenobhut zunehmend wichtiger. Internationale Artenschutzprojekte und Zuchtprogramme sind hierbei in besonderem Maße von Bedeutung (GIPPOLITI UND CARPANETO, 1997). Leider bleibt der Zuchterfolg jedoch trotz intensiver Bemühungen oftmals aus (DERRICKSON UND SNYDER, 1992). Ursachen für ein Scheitern der natürlichen Reproduktion sind dabei Unverträglichkeiten zwischen den Partnertieren, Verhaltensstörungen, Asynchronität im Reproduktionszyklus oder medizinische Gründe. Letztgenannte schließen körperliche Beeinträchtigungen, Verletzungen, insuffiziente Spermienqualität oder Missbildungen der Gonaden und/oder der keimleitenden Wege mit ein. Aber auch von Paaren aus körperlich gesunden Individuen werden häufig keine beziehungsweise nur infertile Eier produziert (DERRICKSON UND SNYDER, 1992). Es wird vermutet, dass in Erhaltungszuchtprogrammen, in Ermangelung ausreichend vieler und geeigneter Partnertiere, oft eine „Zwangsverpaarung“ praktiziert werden muss, die häufig mit Stress für beide Tiere verbunden ist (DERRICKSON UND SNYDER, 1992). Selbst unter optimalen Umwelt- und Haltungsbedingungen sind die

Nachzuchtergebnisse hierbei gering, da viele Vögel nicht mit jedem Partnertier brüten. So konnte beispielhaft für den Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*) (YAMAMOTO U. A., 1989), den Buntfalken (*Falco sparverius*) (BIRD, 1982) und den Kalifornischen Kondor (*Gymnogyps californicus*) (COX U. A., 1993) gezeigt werden, dass die Nistraten und Nachzuchtergebnisse von zwangsverpaarten Paaren geringer sind als die von Paaren, die freiwillig zusammengefunden haben.

Die assistierte Reproduktion kann helfen, viele dieser Probleme zu umgehen (LIERZ U. A., 2011). Sie bietet den Vorteil das genetische Potenzial unverträglicher, beziehungsweise aggressiver, auf den Menschen geprägter, körperlich beeinträchtigter oder örtlich weit entfernter Individuen in Zuchtprogrammen zu nutzen, die sonst für den Artenschutz verloren wären. So konnte in einem Projekt zum Schutz der Königsamazone (*Amazona guildingii*) durch artifizielle Insemination Nachwuchs von einem Hahn produziert werden, der wegen einer Flügelamputation zu einer natürlichen Fortpflanzung nicht fähig war (FISCHER U. A., 2013a). Zudem kann durch eine vorausgehende Untersuchung des Spermas eine Aussage über die Spermienqualität und somit über den Zuchtnutzen eines potenziellen Zuchttieres getroffen werden. Die artifizielle Insemination zur Reproduktion von Vogelspezies beschränkte sich lange Zeit auf den Bereich des Wirtschaftsgeflügels. In den letzten Jahrzehnten gewannen die Techniken der assistierten Reproduktion jedoch auch im Bereich der nichtdomestizierten Vogelspezies zunehmend an Bedeutung, sodass mittlerweile über 40 Wildvogelspezies erfolgreich durch artifizielle Insemination reproduziert werden konnten (GEE, 1995). Bei Papageien wurde die assistierte Reproduktion bisher jedoch selten angewandt, da die routinemäßige Anwendbarkeit dieser Methode nicht gelang. Voraussetzung für die artifizielle Insemination ist allerdings die Verfügbarkeit von Sperma geeigneter Tiere zum Zeitpunkt der Ovulation, also des optimalen Inseminationszeitpunktes, welcher vor allem bei den saisonalen Papageien eng begrenzt ist. Da es zum einen logistisch, zum anderen aufgrund des Seltenheitsgrades mancher Arten, allerdings sehr schwer möglich ist zum richtigen Besamungszeitpunkt geeignetes Frischsperma zur Verfügung zu haben, würde kryokonserviertes Sperma viele dieser Probleme lösen und einen bedeutenden Beitrag zum Artenschutz leisten. Bislang ist jedoch kein geeignetes Protokoll zur routinemäßigen Kryokonservierung von Papageiensperma verfügbar, nicht zuletzt daher, weil die regelmäßige Spermaentnahme

bei Großpapageien bis vor kurzem nicht gelang. Durch die Möglichkeit der routinemäßigen, elektrostimulierten Spermaentnahme bei über 100 Papageienspezies (LIERZ U. A., 2013) steht Papageiensperma nun zur Verfügung und macht Untersuchungen zur Kryokonservierung von Papageiensperma unter den Gesichtspunkten des Artenschutzes somit möglich und unbedingt erforderlich. Der Transport kryokonservierter Spermien würde es ermöglichen, dass geographisch weit voneinander entfernte Tiere für Zuchtprogramme verpaart werden könnten, um den Genpool bedrohter Arten optimal auszunutzen (LIERZ U. A., 2016). Dies würde den Transport der Tiere, die damit verbundenen Gefahren und Stresssituationen (Gesundheits-Checks, Quarantäne, Paarzusammenführung, Eingewöhnung in den neuen Lebensraum) umgehen. Außerdem könnte bei seltenen Spezies durch vorherige Tests ausgeschlossen werden, dass Erreger durch die artifizielle Insemination übertragen würden, die beim direkten Kontakt ein Risiko darstellen (LIERZ U. A., 2016). So werden virale und bakterielle Infektionen, als zusätzliche Bedrohung für die Bestände, eingedämmt. Zudem erlaubt die Kryokonservierung die Schaffung von Genbanken, die im aviären Bereich bisher gänzlich fehlen. Diese existieren jedoch für seltene Säugetierspezies (FICKEL U. A., 2007) und bieten dort die erfolgreiche Möglichkeit der dauerhaften Sicherung von Genmaterial bedrohter Spezies. Zudem sind sie bedeutend für die Erhaltung der genetischen Diversität und eines stabilen Genpools (HOLT UND PICKARD, 1999; WILDT U. A., 1997).

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit bestand daher in der Entwicklung eines Protokolls zur Kryokonservierung von Psittazidensperma am Beispiel des Nymphensittichs (*Nymphicus hollandicus*) als Modelltier. In einem ersten Schritt sollte ein Spermaverdüner evaluiert werden, um eine Kurzzeitkonservierung mit möglichst geringen Qualitätsverlusten zu ermöglichen. In einem zweiten Schritt sollte ein geeignetes Kryoprotektivum zur Langzeitkonservierung von Nymphensittichsperma evaluiert werden. Bei der Erforschung dieses Punktes galt besonderes Interesse der Zytotoxizität der Kryoprotektiva, die speziesspezifisch unterschiedliche Auswirkungen haben können (HOLT, 2000). Insbesondere war hier neben dem Qualitätsverlust hinsichtlich Spermienviabilität und -motilität die Pathomorphologie von Interesse. Anschließend war es das Ziel, in einem dritten Schritt den Einfluss der Kühlrate auf die Spermienqualität im Kryokonservierungsprozess zu untersuchen. Abschließend war es notwendig, die

Befruchtungsfähigkeit der Spermien, welche durch das in vitro entwickelte Protokoll konserviert wurden, anhand eines In-vivo-Fertilisationsversuches zu überprüfen, um so die praktische Anwendbarkeit zu bestätigen.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Papageien (Psittaciformes)

Das folgende Kapitel soll einen Einblick in die Systematik der Papageienvögel (*Psittaciformes*), sowie deren Lebens- und Verhaltensweise ermöglichen. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden Nymphensittiche als Modelltiere verwendet, weshalb diese Art im Kapitel 2.1.4 eingehender beschrieben wird.

#### 2.1.1 Kennzeichen und Verbreitung

Unter den derzeit bekannten ca. 11000 Vogelarten weltweit gehören laut der „IUCN Red List of Threatened Species<sup>TM</sup>“ 414 Arten der Ordnung der Papageien (*Psittaciformes*) an (IUCN, 2016). Papageien sind gekennzeichnet durch ihr farbiges Gefieder, die aufrechte Körperhaltung, einen kurzen Hals, dem ein relativ großer Kopf aufsitzt, sowie einen kurzen kräftigen gebogenen Oberschnabel. Der Oberkiefer ist nicht mit dem Schädel verwachsen und kann daher auf und ab, sowie seitlich, bewegt werden. Die Füße besitzen vier Krallenzehen, von denen die beiden mittleren nach vorne die beiden äußeren nach hinten gerichtet sind (zygodaktyl). Viele Papageienarten führen mit den Füßen Nahrung zum Schnabel, was in anderen Vogelgruppen nur in Ausnahmefällen vorkommt. Der Papageienschnabel erfüllt Aufgaben wie Knacken, Halten, Aufschneiden usw. und weicht von der Morphologie wesentlich von den anderen Vogelspezies ab. Als Nahrung dienen meist Nüsse, Früchte, Knospen und anderes Pflanzenmaterial. Nur einige Arten nutzen tierische Nahrung. Viele ausgewachsene Papageien besitzen wie z. B. einige Tauben, Reiher und Tukane keine funktionierende Bürzeldrüse, die bei den übrigen Vögeln zur Einfettung des Gefieders dient. Stattdessen haben sie nachwachsende sogenannte Puderdünen, die durch Zerfall ihrer Spitze winzige, talkumartige Keratingranula mit wasserabweisenden Eigenschaften entstehen lassen (COLLAR, 1997; DELHEY U. A., 2007). Die Tiere zeigen meist eine ausgeprägte und lang anhaltende Paarbindung. Körpergröße und -gewicht lassen sich beim Papagei nur schwer pauschalisieren. So weist der Hyazinthara (*Anodorhynchus hyacinthinus*) ein Gewicht von bis zu 2 kg bei 100 cm Körpergröße auf, während der Braunstirn-Spechtpapagei (*Micropsitta pusio*) lediglich 12 g bei 10 cm

Körpergröße wiegt. Ein Geschlechtsdimorphismus ist bei Papageien nur selten ausgeprägt und beschränkt sich, falls vorhanden, eher auf das Gefieder statt auf Körpergröße und -gewicht (PARR UND JUNIPER, 2010). So ist zum Beispiel beim Edelpapagei (*Electus roratus*) das Weibchen rot/blau gefärbt, während die Männchen ein leuchtend grünes Gefieder haben. Papageien sind in der tropischen und subtropischen Zone der Südhalbkugel weltweit verbreitet, wobei ein Schwerpunkt die Regenwälder des Tieflandes sind. Einige Arten kommen jedoch auch in der gemäßigten Zone vor. Die größte Artenvielfalt findet sich in Südamerika (Neotropis) und Australasien.

### 2.1.2 Systematik und Verwandtschaft

Die Ordnung der Papageien ist aufgrund phylogenetischer Untersuchungen im stetigen Wandel. Traditionell unterscheidet man jedoch zwei Familien innerhalb der Ordnung; die Kakadus (*Cacatuidae*) (ROWLEY, 1997) und die Eigentlichen Papageien (*Psittacidae*) (COLLAR, 1997) (Abbildung 1). Dieser Einteilung liegt eine Untersuchung von HOMBERGER (1980) zugrunde, in der die Ernährungs- und Trinkmethoden der Papageien analysiert wurden. Auch CHRISTIDIS U. A. (1991) kam durch Protein-Elektrophoreseuntersuchungen aus Muskulatur- und Leberproben zu dem Schluss die Familie der *Cacatuidae* von den restlichen Papageien abzugrenzen. Zahlreiche andere Untersuchungen teilen diese Abgrenzung (TOKITA U. A., 2007; SCHWEIZER U. A., 2010). Einzig DE KLOET UND DE KLOET (2005) schließen sich dieser Meinung nicht an und gruppieren die Kakadus aufgrund chromosomaler Untersuchung zu anderen Papageien wie den *Psittacini*. Kakadus unterscheiden sich jedoch äußerlich und anatomisch von anderen Papageien hinsichtlich des Fehlens von blauer und grüner Federfärbung, die Position ihrer Karoidarterien (*Arteriae carotes communes*), sowie durch die aufrichtbare Federhaube und die Schädelform (ROWLEY, 1997). GILL U. A. (2010) befürworten darüber hinaus die Abgrenzung einer weiteren Familie, die der *Strigopidae*, einer Gruppe von neuseeländischen Papageien, die aus den beiden Gattungen *Nestor* und *Strigops* gebildet wird, wobei andere Autoren eine Einteilung in eine jeweils eigene Familie (*Strigopidae* und *Nestoridae*) in einer gemeinsamen Superfamilie (*Strigopoidae*) vorschlagen (JOSEPH U. A., 2012). Der genaue Verlauf der Evolution der Papageien und die phylogenetische Zusammengehörigkeit konnten jedoch auch durch anatomische Untersuchungen nicht lückenlos geklärt werden (MAYR, 2010). Es bestehen jedoch Untersuchungen auf

---

genetischer und morphologischer (TOKITA U. A., 2007), sowie auf molekularer Ebene (WRIGHT U. A., 2008), die zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der phylogenetischen Einteilung kommen (Abbildung 2). Die Fossilüberlieferung der Papageien kann aufgrund der großen Lückenhaftigkeit ebenfalls nicht zur Klärung der Herkunft dieser Vogelordnung beitragen. Erste sichere Funde stammen aus dem Eozän und sind heute ca. 54 Millionen Jahre alt (WATERHOUSE U. A., 2008). Aus dem Miozän (vor ca. 15 – 13,5 Millionen Jahren) stammen Funde aus Deutschland (Nördlinger Ries), aber auch zahlreichen weiteren europäischen Ländern (MAYR UND GÖHLICH, 2004), eine Tatsache, die bemerkenswert ist, da Vögel der Ordnung *Psittaciformes* heutzutage nicht mehr natürlicherweise in Europa vertreten sind. Die Suche nach verwandten Vogelordnungen erwies sich bis dato als wenig zielführend, was unter anderem dadurch begründet ist, dass die morphologischen Merkmale der Vögel dieser Ordnung derart einzigartig sind. Die ausführlichen Untersuchungen von WRIGHT U. A. (2008) belegen zweifelsfrei, dass keine engen verwandtschaftlichen Beziehungen zu anderen rezenten Vogelgruppen bestehen. WRIGHT U. A. (2008) sehen in ihren Ergebnissen eine Unterstützung für die These der australasiatischen Entstehung der heutigen Papageien im Kontinent Gondwana während der Kreidezeit. In einer anderen Publikation geht man davon aus, dass während der Kreidezeit zunächst Zerstreungen der Papageien in Australasien und Antarctica stattfanden, die nachfolgend zu Besiedlungen anderer Kontinente mit jeweils nachfolgenden weiteren Radiationen führten (SCHWEIZER U. A., 2010).

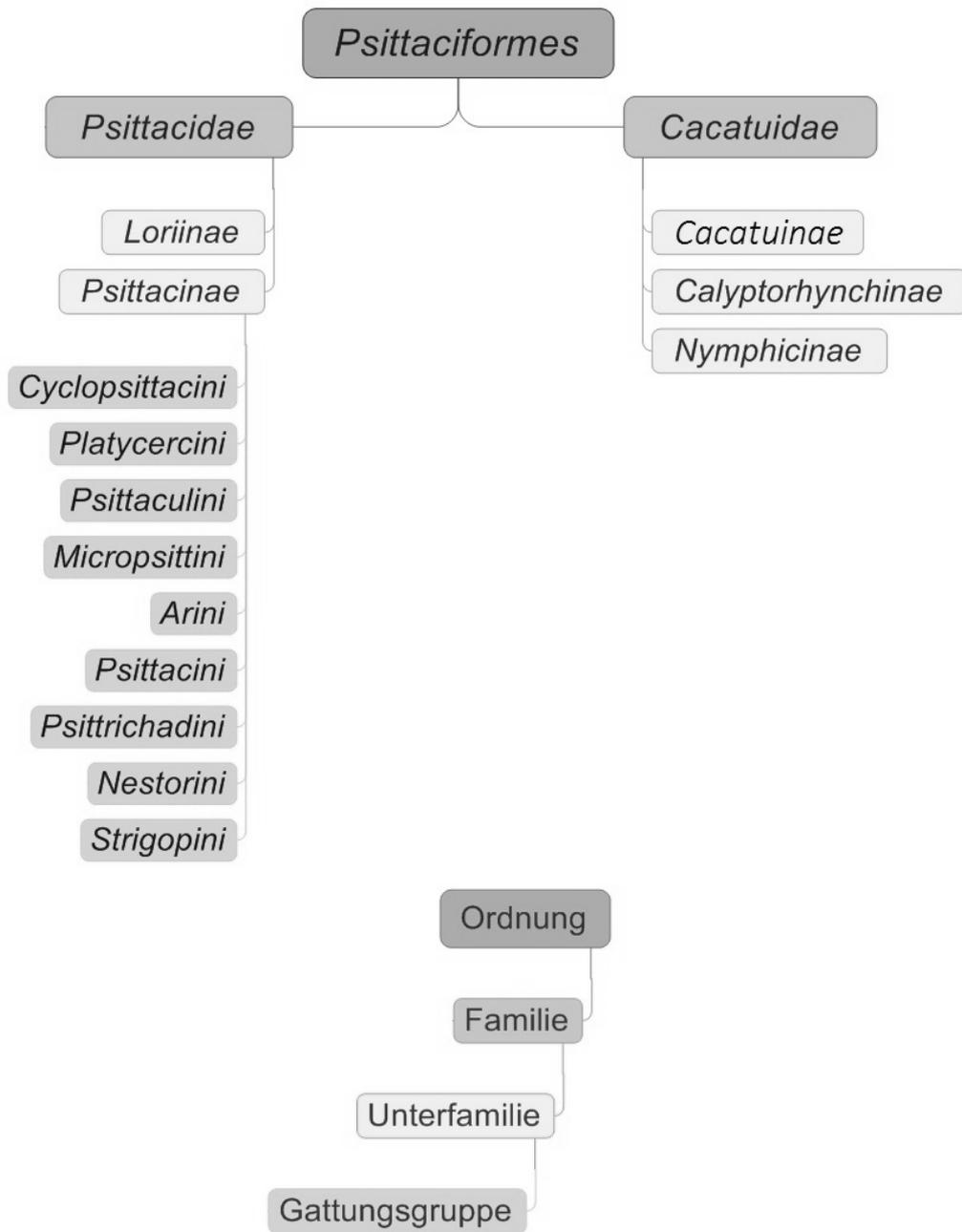


Abbildung 1: Phylogenetische Einteilung der Papageien nach COLLAR (1997) und ROWLEY (1997)

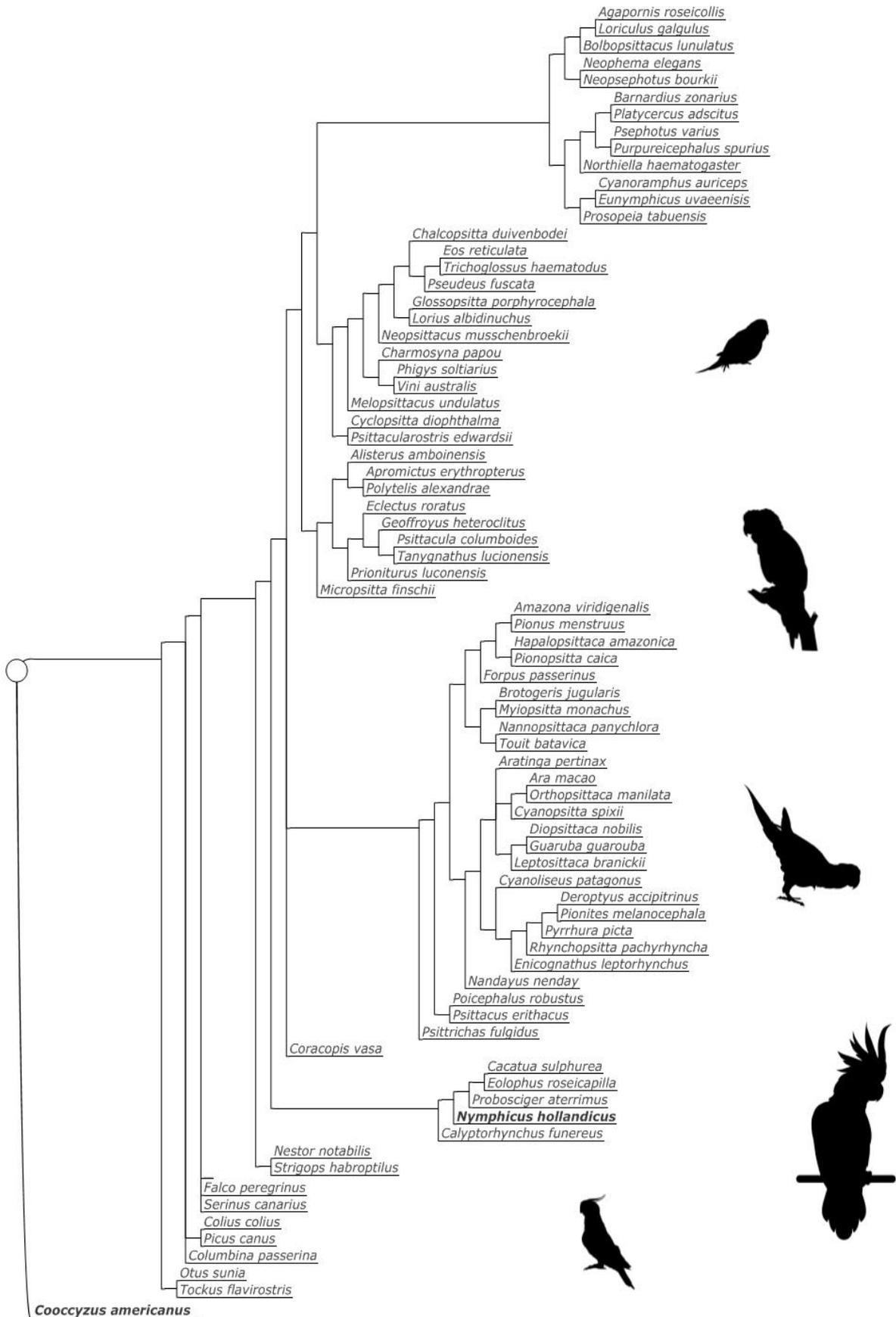


Abbildung 2: Phylogenetische Zusammengehörigkeit der Papageienarten nach WRIGHT U. A. (2008)

### 2.1.3 Fortpflanzungsverhalten innerhalb der Ordnung *Psittaciformes*

Die meisten Papageienarten leben monogam und gehen lange, in manchen Fällen sogar lebenslange, Partnerschaften ein. Vom Kea (*Nestor notabilis*) ist jedoch bekannt, dass er polygam lebt (JACKSON, 1963). Der Kakapo (*Strigops habroptilus*) findet sich hingegen, als einzige Spezies unter den Papageien, zur Brutzeit an Balzplätzen ein, an denen die Männchen kompetitive Balzrituale aufführen („lekking“) (HOGLUND, 1989). Bei Edelpapageien (*Ecliptus roratus*) kopuliert das Weibchen mit mehreren Männchen und wird während der Brutzeit auch von mehreren Männchen gefüttert (FORSHAW UND COOPER, 1977), wohingegen auch ein Männchen mehrere Weibchen begattet. Eine promiskuitive Lebensweise weist auch der Große Vasapapagei (*Coracopsis vasa*) auf (EKSTROM U. A., 2007). Innerhalb der monogamen Spezies lassen sich jedoch Paare und Familiengruppen oft gut innerhalb von größeren Schwärmen erkennen, so zum Beispiel bei Amazonen und Kakadus (FORSHAW UND COOPER, 1977). Miteinander harmonisierende Individuen sitzen oft dicht beieinander und betreiben gegenseitige Gefiederpflege, schnäbeln oder füttern sich gegenseitig. Viele Arten zeigen sowohl in der Natur, als auch in Menschenobhut ein saisonales Fortpflanzungsgeschehen, wobei sich das Balzverhalten dabei von Art zu Art unterscheidet. Harmonisierende Paare kopulieren mehrmals täglich miteinander, indem das Männchen mit beiden Beinen auf den Rücken des Weibchens steigt und mit seitlich genommenem Schwanz seine Kloake gegen die des weiblichen Tieres drückt. Durch einen Lymphstau und die vermehrte Durchblutung schwellen die Kloaken der Geschlechtspartner an, sodass die *Papillae ductus deferentes* des Männchens und die Öffnung des Ovidukts des Weibchens während der Ejakulation dicht beieinander liegen. Während der Ejakulation wird das im Samenleiter befindliche Sperma durch rhythmische Kontraktionen der Samenleiter- und Kloakenmuskulatur über die Samenrinne ausgetrieben (WAIBL UND SINOWATZ, 2004).

## 2.1.4 Der Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*)

### 2.1.4.1 Kennzeichen



Abbildung 3: Geschlechtsdimorphismus bei wildfarbenen Nymphensittichen (*Nymphicus hollandicus*)

(links: Weibchen, rechts: Männchen); aus:  
FORSHAW UND COOPER (1977)

Der Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*) wurde erstmals 1792 von KERR als *Psittacus hollandicus* beschrieben. Es handelt sich um den einzigen Vertreter des Genus *Nymphicus* in einer eigenen Subfamilie (*Nymphicinae*) der Familie *Cacatuidae*. Ausgewachsen ist der Nymphensittich ca. 32 cm groß ist und wiegt zwischen 80 und 100 g, was ihn zur kleinsten Art der Kakakus macht. Zwischen den wildfarbenen Geschlechtern besteht ein ausgeprägter Geschlechtsdimorphismus. Die Männchen zeichnen sich durch ein dunkelgraues Gefieder aus, wovon sich die weißen Flügeldecken stark abheben. Sie besitzen eine ausgeprägte, leuchtend gelbe Gesichtsmaske mit großem, orangefarbenem Ohrfleck. Weibchen hingegen sind generell blässer gefärbt als die Männchen, die Gesichtsmaske wirkt grau verschleiert und der

Ohrfleck erscheint matt orange (FORSHAW UND COOPER, 1977). Die Schwanzunterseite der Weibchen ist schwarz-gelb gebändert, die der Männchen einheitlich gefärbt (Abbildung 3). Die Jungvögel ähneln zunächst den Weibchen und sind erst nach der Jungmauser am Gefieder zu unterscheiden. Beide Geschlechter besitzen einen schmalen nackten Augenring, einen grauen Schnabel, eine dunkelbraune Iris und graue Füße. Typisch für Arten, die zur Familie der *Cacatuidae* gehören, besitzt auch der Nymphensittich die bewegliche Federhaube. Seit dem ersten Auftreten von Farbmutationen im Jahr 1949 existieren eine Vielzahl unterschiedlichster Farbschläge, die jedoch keinen ausgeprägten Geschlechtsdimorphismus mehr aufweisen (THOMPSON, 1988).

#### 2.1.4.2 Natürlicher Lebensraum und Verhaltensweise

Frei lebende Nymphensittiche bewohnen in großen Gruppen offene Graslandschaften ganz Australiens (Abbildung 4), insbesondere in der Nähe von Wasser (FORSHAW UND COOPER, 1977). Man sieht sie häufig paarweise am Boden nach Grassamen suchen oder über vereinzelt Bäume in die offene Landschaft fliegen. Nymphensittiche sind sehr neugierig und suchen erst Schutz in naheliegenden Bäumen, wenn sie gestört werden. Sobald die Gefahr jedoch vorüber ist, kehren sie sofort zum Boden zurück um dort weiter nach Nahrung zu suchen. In Ruhephasen sitzen sie gerne auf kurzen Ästen von abgestorbenen Bäumen (FORSHAW UND COOPER, 1977). Ihre Nahrung besteht im Wesentlichen aus Grassamen, krautartigen Pflanzen, Getreide, Früchten und Beeren. Als Anpassung an Dürreperioden nomadisieren Nymphensittiche und sind dann auch häufig in Küstenregionen zu sehen, in denen sie normalerweise selten zu finden sind (FORSHAW UND COOPER, 1977). Nymphensittiche halten sich oft gemeinsam mit Wellensittichen (*Melopsittacus undulatus*) in großen Gruppen an Wasserplätzen auf (PARR UND JUNIPER, 2010).



Abbildung 4: Verbreitung des Nymphensittichs nach FORSHAW UND COOPER (1977)

Innerhalb des Nymphensittichschwarms leben monogame Paare, die auch außerhalb der Brutsaison bestehen bleiben (SMITH, 1978). Die Brutzeit ist variabel und hängt weitestgehend von klimatischen Bedingungen, insbesondere von Regenfällen, ab (FORSHAW UND COOPER, 1977). Die Nistzeit ist normalerweise von August bis Dezember im Süden Australiens und von April bis Juli im Norden des Landes, wobei bei günstigen

Bedingungen auch mehrmals hintereinander gebrütet werden kann (PARR UND JUNIPER, 2010). Das Männchen balzt mit etwas abgestellten Flügeln und trippelnden Schritten, begleitet von melodischem Gesang (ARNDT, 1996). Das Nest wird in einen hohlen Ast oder in ein Loch im Baumstamm gebaut, oft handelt es sich dabei um große hohle Eukalyptusbäume in Wassernähe (FORSHAW UND COOPER, 1977). Der Nymphensittich gilt als nicht bedroht und wird nicht im Washingtoner Artenschutzabkommen aufgeführt.

#### **2.1.4.3 Nachzucht in Menschenobhut**

Der Nymphensittich gehört, neben dem Wellensittich, zu den am häufigsten in Menschenobhut nachgezüchteten Papageienarten und wird nach SCHÖNE UND ARNOLD (1985) aufgrund der mittlerweile vielen Farbmutationsformen zu den voll domestizierten Arten gezählt. In Menschenobhut sind vier Zuchten pro Jahr beschrieben. Laut MILLAM U. A. (1988) kann die Reproduktionsphase von Nymphensittichen aber ganzjährig durch die Präsentation von Nistboxen stimuliert werden. Nichtsdestotrotz hängt der Reproduktionserfolg, außer von der Verfügbarkeit einer ausreichenden Anzahl von Nistboxen, auch von Temperatur, Photoperiode, Lichtintensität und Art der Fütterung (MILLAM U. A., 1988) ab. Von Züchtern ist bekannt, dass männliche Nymphensittiche gelegentlich auch andere Weibchen umgarnen, insbesondere wenn ihre Partnerin nicht auf ihre Annäherungsversuche reagiert (SMITH, 1978). Inzwischen wird davon ausgegangen, dass Nymphensittiche nicht streng monogam leben, sondern eine flexiblere Partnerwahl betreiben (SEIBERT UND CROWELL-DAVIS, 2001). Zur Paarungszeit steigt die Aggressionsbereitschaft männlicher Nymphensittiche gegenüber anderen Tieren im Schwarm, wohingegen die Aggressionsbereitschaft weiblicher Tiere gegenüber anderen Nymphensittichen nicht signifikant erhöht ist (SEIBERT UND CROWELL-DAVIS, 2001). Das Männchen sucht den Nistkasten aus und beginnt die Balz mit dem charakteristischen Gesang, seitlichem Trippeln und Flügen mit plötzlichen Wendungen (ARNDT, 1996). Die freie Partnerwahl und die Kompatibilität der Partner auch außerhalb der Brutsaison nehmen einen entscheidenden Einfluss auf den Reproduktionserfolg und die Brutpflege von Nymphensittichpaaren (SPOON U. A., 2006). Finden die Paare von selbst zueinander und verstehen sich gut, so verbringen sie auch außerhalb der Paarungszeit viel Zeit miteinander, was zu verbesserten Absprachen in der Nestlingsaufzucht führt (SPOON U. A.,

2006). Die Vögel betreten das Nest mit dem Schwanz zuerst und legen pro Gelege drei bis sieben Eier im Abstand von zwei Tagen (ROWLEY, 1997). Männchen und Weibchen wechseln sich während der 21 bis 23 Tage dauernden Bebrütung ständig ab, wobei das Männchen vom frühen Morgen bis zum späten Nachmittag ununterbrochen auf den Eiern sitzt (FORSHAW UND COOPER, 1977; BRERETON, 1963). Die beim Schlupf gelb bedunten Nestlinge verlassen vier bis fünf Wochen nach dem Schlupf das Nest und werden noch ca. drei Wochen nach dem Ausflug von den Eltern gefüttert (ARNDT, 1996).

## 2.2 Anatomie des Geschlechtsapparates von Papageien

Die Literatur über die Anatomie von Papageien (*Psittaciformes*) ist sehr begrenzt, weshalb im Folgenden näher auf die Anatomie des Nutzgeflügels eingegangen und an entsprechenden Stellen auf artbedingte Besonderheiten verwiesen wird.

### 2.2.1 Weibliche Geschlechtsorgane

Die weiblichen Geschlechtsorgane (*Organa genitalia feminina*) des Vogels umfassen den Eierstock (*Ovarium*) und den Eileiter (*Oviductus*). Bei fast allen Vogelarten ist nur der linke Eierstock und der linke Eileiter vollständig ausgebildet (Abbildung 6), während rechts in den meisten Fällen nur noch Rudimente derselben zu finden sind (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Viele Greifvogelarten und auch der Kiwi (*Apteryx*) behalten die beidseitige Entwicklung der Anlagen, allerdings konnte bisher nur für den Habicht (*Accipiter gentilis*) die Bildung legereifer Eier auch aus dem rechten Eileiter nachgewiesen werden (STIEVE, 1918). Bei einigen Papageienarten kommt es individuell ebenfalls zu einer bilateralen Ausbildung, von denen aber nur die linke Anlage funktionsfähig ist.

#### 2.2.1.1 Eierstock (*Ovarium*) und Oogenese

Obwohl bei den meisten Vogelarten im adulten Alter nur der linke Eierstock seine Funktionalität erhält, werden embryonal beide Gonaden angelegt und mit Keimzellen besiedelt (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Das funktionell reife Ovar zeigt sich im legereifen Zustand als ein Organ variabler Größe, dessen Umfang von der Größe mehrerer gelbgefärbter Dotterkugeln bestimmt wird. Der Eierstock liegt kraniodorsal im

Eingeweideluftsack (*Saccus abdominalis*) im Bereich des vorderen Nierenpols (Abbildung 6) und besitzt nur ein sehr kurzes Gekröse (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Nach kranial wird das Ovar vom kaudalen Abschnitt der linken Lunge, nach kaudal von den kranialen Abschnitten des Eileiters, begrenzt. Dorsal steht es in Kontakt zu den großen Gefäßen der Leibeshöhle, *Aorta descendens* und *Vena cava caudalis* (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Die arterielle Blutversorgung erfolgt über die *A. ovarica sinistra*, der venöse Abfluss über die *Vv. ovaricae sinistrae*. Die Funktionskörper (Follikel) des legereifen Eierstocks präsentieren sich je nach Stadium von unterschiedlicher Größe und Farbe. So finden sich eine große Anzahl kleiner, graugelber Follikel, von denen einige wenige die volle Ausbildung als sprungreife, gelbliche Dotterkugel erreichen. Dieser Follikel wird von einer mehrschichtigen Follikelwand umgeben und ist gestielt am Eierstock befestigt. Beim Follikelsprung (*Ovulation*) reißt die Follikelwand am dafür vorgesehenen *Stigma folliculare* ohne Blutung auf und bleibt als leerer Kelch (*Calix*) auf dem Ovar zurück. Bereits während der frühembryonalen Entwicklung differenzieren sich die Urkeimzellen beim weiblichen Vogel zu Ureizellen (*Oogonien*), die sich wiederholt mitotisch teilen, wobei bei jeder Teilung eine kleine Zytoplasmabrücke zwischen den Zellen bestehen bleibt (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Die letzte aus dieser Teilungsreihe hervorgehende Zellreihe wird als Oozyten 1. Ordnung bezeichnet. Während der Reifung sammelt die Oozyte 1. Ordnung unter dem Einfluss gonadotroper Hormone eine große Menge an Dotter (*Vitellus*) in ihrem Zytoplasma an, sodass diese Phase als *Vitellogenese* bezeichnet wird. Die 1. Reifeteilung wird erst wenige Stunden vor der Ovulation beendet und führt zur Bildung der Oozyte 2. Ordnung. Die Ovulation wird durch das Luteinisierende Hormon (LH) aus der Adenohypophyse ausgelöst (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Die zweite Reifeteilung, die wahrscheinlich durch das Eindringen von Spermien ausgelöst wird, findet bereits im *Infundibulum* des Eileiters statt, wodurch das reife Ei (*Ovum*) entsteht. Im Unterschied zum Säugetier findet beim Vogel eine physiologische Polyspermie statt, d. h. es dringen mehrere Spermien in die Eizelle ein. Es fusioniert aber nur ein Spermatozoenkern mit dem Eikern, die restlichen degenerieren im Zytoplasma (WAIBL UND SINOWATZ, 2004).

### 2.2.1.2 Eileiter (*Oviductus*)

Der Eileiter des weiblichen Vogels besteht aus mehreren Abschnitten, die durch ihren unterschiedlichen histologischen Aufbau verschiedene Funktionen bei der Bildung des legereifen Vogeleis übernehmen. Das *Infundibulum* ist ein trichterförmiges Gebilde, das mit wenigen Fimbrien (*Fimbriae infundibulares*) eine weite Öffnung (*Ostium infundibulare*) formt, welche mit dem linken Ovar in Verbindung steht (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Durch das Vorhandensein glatter Muskulatur ist das *Infundibulum* kontraktile in der Lage, ovulierte Dotterkugeln von der gesamten Oberfläche des Ovars aufzunehmen. Im sich verengenden *Tubus infundibularis* findet die Befruchtung der Eizelle durch die Spermien statt. Die Passage des Eis durch das *Infundibulum* dauert beim Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) nur etwa 20 Minuten. In dieser Zeitspanne werden Glykoproteine sezerniert, die sich schichtartig um die Dotterkugel lagern und im weiteren Verlauf die äußere Perivitellinmembran und die Hagelschnüre (*Chalazae*) formen. Der folgende Abschnitt, *Magnum*, bildet den längsten Abschnitt des Eileiters. In einer beim Haushuhn dreistündigen Passagedauer werden dem Ei etwa 40 verschiedene Proteine (*Ovalbumin*) aufgelagert. Im nächsten Abschnitt, dem schmalen *Isthmus*, wird dem Ei die doppelte Schalenhaut, die später die Luftkammer am stumpfen Pol bildet, beigefügt. Nach dieser Engstelle erweitert sich der Eileiter zum muskelstarken, sackartigen Uterus, in dem das Ei die längste Zeit seiner Passage, beim Haushuhn ca. 20 Stunden, verbringt und währenddessen das Eiweiß durch Wassereinlagerungen zur Quellung gebracht wird (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Im Folgenden wird durch schrittweise Auflagerungen die Kalkschale gebildet und gehärtet. Der Uterus wird durch den Ringmuskel *Musculus sphincter vaginae* vom letzten Abschnitt, der relativ kurzen *Vagina*, getrennt. Hier verweilt das Ei die kürzeste Zeit (ca. 5 bis 10 Minuten), da ihm nur noch die Eihaut (*Cuticula*) aufgelagert wird. Der Eileiter öffnet sich mit dem *Ostium cloacale oviductus sinistri* ins *Urodeum* (WAIBL UND SINOWATZ, 2004).

Die Wand des Eileiters ist in drei Schichten, der *Tunica mucosa*, *Tunica muscularis* und *Tunica serosa*, aufgebaut. Zur Zeit der Legereife ist die Schleimhaut stark vaskularisiert und wirft im Lumen typischerweise ausgebildete Falten, die je nach Abschnitt aus einem histologisch unterschiedlich geformten Epithel bestehen. In der darunter liegenden Bindegewebsschicht (*Lamina propria*) finden sich die Drüsen, die zur Sekretion der

unterschiedlichen Bestandteile des legereifen Eis notwendig sind. Lediglich der Anfang des *Infundibulum*s, der *Pars translucens isthmi* und der kaudale Teil der Vagina besitzen keine Drüsen (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Im Übergangsbereich zwischen Uterus und Vagina befinden sich Uterovaginaldrüsen (*Tubuli spermatici*), in denen die Spermien je nach Vogelart zum Teil wochenlang überleben können (BAKST U. A., 1994). Der Zeitpunkt der Freisetzung der Spermien aus den Uterovaginaldrüsen scheint an die Ovulation und Legeperiode gebunden zu sein (VERMA UND CHERMS, 1965; BOBR U. A., 1964). Das Gekröse des Eileiters besteht aus dem dorsalen Eileiterband (*Ligamentum dorsale oviductus*), welches den Eileiter an der dorsalen Leibeshöhlenwand befestigt und von dort über den kranialen Anteil der linken Niere verläuft um nachfolgend bis zur Kloakenwand abzustiegen (WAIBL UND SINOWATZ, 2004) und dem ventralen Eileiterband (*Ligamentum ventrale oviductus*), welches vom *Infundibulum* bis zur *Vagina* reicht. Die arterielle Blutversorgung des Eileiters erfolgt über die *A. oviductalis cranialis*, die als Seitenast des gemeinsamen Stammes der *A. renalis cranialis* und der *A. ovarica sinistra* entspringt, die *A. oviductalis media* und die *A. oviductalis caudalis*. Der venöse Abfluss erfolgt über die *V. oviductalis media* zur *V. renalis caudalis sinistra*, die ihrerseits über die *V. iliaca communis sinistra* in die kaudale Hohlvene (*V. cava caudalis*) mündet. Die vegetative Innervation erfolgt durch die Äste des *Nervus hypogastricus* und die Äste des 8. und 9. Lumbosakralnerven (WAIBL UND SINOWATZ, 2004).

## 2.2.2 Männliche Geschlechtsorgane

Zu den männlichen Geschlechtsorganen (*Organa genitalia masculina*) des Vogels zählen die keimzellbildenden Hoden (*Testes*), die samenspeichernden Nebenhoden (*Epididymis*), die Samenleiter (*Ductus deferentes*), die zur Samenzellreifung und –ausstoßung dienen, sowie das Kopulationsorgan (*Phallus*) mit Hilfsorganen (WAIBL UND SINOWATZ, 2004), das bei Papageien, außer beim Vasapapagei, jedoch nur in Form einer kloakalen Protuberanz ausgebildet ist (MONTGOMERY, 2010).

### 2.2.2.1 Hoden und Spermatogenese

Die paarig angelegten Hoden sind von ovaler Form, wobei ein kranialer (*Extremitas cranialis*) und ein kaudaler Pol (*Extremitas caudalis*) die Längsrichtung im Körper

bestimmen (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Die Lage der Hoden ist hochdorsal beidseits der *Aorta descendens*, sie reichen im aktiven Zustand vom kaudalen Drittel der Lunge bis zur *Divisio renalis cranialis*. Ventral der Hoden schließen sich Drüsen- und Muskelmagen, sowie Abschnitte der Leber und der Darmschlingen an. Nach kraniodorsal sind sie vom kranialen und kaudalen Brustluftsack (*Sacci thoracici cranialis et caudalis*), nach kaudal vom Bauchluftsack (*Saccus abdominalis*) umgeben. Der unmittelbaren Nähe zu den Luftsäcken wird in der Literatur eine Kühlfunktion für die keimzellbildenden Organe zugesprochen. Die Größe der Hoden ist abhängig von Art, Alter und besonders vom Fortpflanzungsstadium des betreffenden Tieres. So ändert sich das Hodenvolumen des Haussperlings (*Passer domesticus*) zwischen Ruhe- und Fortpflanzungsperiode um das 300fache (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Im Allgemeinen ist der linke Hoden geringgradig größer als der rechte. Die Hoden haben bei den meisten Papageienarten eine weißlich-gelbliche Farbe, es kommen jedoch auch speziesspezifische, physiologische Pigmentierungen vor. So sind die Hoden von vielen Kakadus schwarz pigmentiert (RAE, 2006). Die Blutversorgung findet über die *A. testicularis* statt, die der *A. renalis cranialis* entspringt; der venöse Abfluss wird über verschiedene testikuläre Venen direkt in die *Vena cava caudalis* gewährleistet. Von außen wird der Hoden von einer bindegewebigen Kapsel, der *Tunica albuginea*, umgeben, die wiederum außen von einer dünnen Serosa, dem *Epidorchium* überzogen ist. Vögel, die eine ausgeprägte Fortpflanzungssaisonalität aufweisen, lassen sich histologisch an einer Änderung der Struktur der *Tunica albuginea* erkennen. In der Phase der sexuellen Stimulation beginnt parallel zur Größenzunahme des Hodens eine ausgeprägte Fibroblastenproliferation in der Bindegewebskapsel des Hodens. Das Hodenparenchym wird von den *Tubuli seminiferi contorti* gebildet, in deren Zwischenräumen die androgenproduzierenden Leydig-Zwischenzellen liegen. Ein *Mediastinum testis* ist beim Vogel nicht ausgebildet. Jeder *Tubulus seminiferus contortus* besteht im Querschnitt aus der Basalmembran, dem aufliegenden Keimepithel und einem Geflecht aus kollagenen und kontraktilen Zellen, die eine Rolle bei der Freisetzung der Spermien spielen. Das Keimepithel wiederum besteht aus den sogenannten Stützzellen (Sertolizellen) und den dazwischen eingelagerten Spermatogonien und ist in Phasen der sexuellen Inaktivität lediglich einschichtig ausgeprägt. Während der Reproduktionsphase kann das Keimepithel durch zahlreiche mitotische Teilungen der Zellen auf mehrere Schichten anwachsen. Den Sertolizellen wird hierbei wie beim Haussäugetier ernährende

Wirkung zugesprochen (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Im Verlauf der Spermatogenese entstehen aus denen, der Basalmembran aufliegenden, A-Spermatogonien die sogenannten B-Spermatogonien, die den Kontakt zur Basalmembran bereits verlieren und weiter lumenwärts liegen. Aus dem B-Spermatogonien entstehen wiederum durch mitotische Teilungen die primären Spermatozyten, die zunächst eine Wachstumsphase durchlaufen und dann eine meiotische Reifeteilung erleben (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Als Resultat der ersten Reifeteilung entstehen so die sekundären Spermatozyten, die einen haploiden Chromosomensatz (Z-Chromosom) besitzen. Im Unterschied zum Säugetier sind beim Vogel die männlichen Tiere das homogametische Geschlecht. Als Ergebnis der zweiten Reifeteilung entstehen die rundkernigen Spermatiden, die in der nachfolgenden Spermiogenese in hochspezialisierte Spermien ausdifferenziert werden. Diese werden in das Lumen der *Tubuli seminiferi contorti* abgegeben und können nun durch Kontraktionen in das *Rete testis* transportiert werden. Beim Haushahn beträgt die Zeitspanne von der Bildung der primären Spermatozyten bis zur Ausdifferenzierung zu Spermien ca. 12 Tage (WAIBL UND SINOWATZ, 2004).

#### 2.2.2.2 Aufbau der Spermien

Ausdifferenzierte Vogelspermien unterscheiden sich von Säugetierspermien im Wesentlichen durch die schmale, langgezogene Kopfform (Abbildung 5). Der Aufbau des Spermiums bestimmt sich durch die Kopffregion (*Caput*), die den Kern (*Nucleus*) und das Akrosom (*Acrosoma*) beinhaltet. Daran schließen sich der Hals (*Pars conjugans*), das Mittelstück (*Pars intermedia*) und der Schwanz (*Pars principalis*) an (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Da für Nymphensittichspermien bereits detaillierte Studien zur Ultrastruktur vorliegen, wird im Folgenden auf deren Aufbau eingegangen. Der Akrosomkomplex mit einer Länge von 1,4  $\mu\text{m}$  besteht aus einem glatten, langgestreckten, konischen Akrosomvesikel und einem stäbchenförmigen Perforatorium (Abbildung 5), das frei im subakrosomalen Raum vorliegt (JAMIESON U. A., 1995). Das Akrosomvesikel grenzt an das proximale Ende des Nucleus an, ein direkter Kontakt zwischen den beiden Strukturen besteht jedoch nicht, sie werden lediglich durch das gemeinsame Perforatorium in Position gehalten (JAMIESON U. A., 1995; LOVAS U. A., 2012). Der Kern ist zylindrisch geformt und besitzt eine Länge von ca. 6,5  $\mu\text{m}$ . In Phase III Spermatiden erscheinen im Kern hohle

Granula, die sich im weiteren Verlauf der Spermiogenese verdichten (LOVAS U. A., 2012), sodass das Chromatin gänzlich verdichtet vorliegt. Die Oberfläche des Kerns erscheint rau und die Kernmembran steht in enger Verbindung mit der Plasmamembran. Das ebenfalls zylindrische Mittelstück steht proximal mit einer Basalmembran mit dem distalen Ende des Nucleus in Verbindung. Innerhalb des kurzen Mittelstücks liegen zwei Zentriolen, die im Inneren eine zylindrische Anordnung von  $9 \times 3$  Mikrotubulstrukturen aufweisen (JAMIESON U. A., 1995). Aus dem distalen Zentriol (*Centriolum distale*) geht der Achsenfaden (*Axonema*) in seiner typischen  $9 \times 2 + 2$  Mikrotubulstruktur hervor, die von einer Schicht Mitochondrien umgeben sind (Abbildung 5) (MCINTOSH UND PORTER, 1967). Der Übergang des Mittelstücks zur Schwanzregion (Länge 53-55  $\mu\text{m}$ ) wird lediglich durch eine Reduktion des Spermiendiameters gekennzeichnet, der strukturelle Aufbau des Axonems bleibt bis zum Ende erhalten (JAMIESON U. A., 1995). Die Gesamtlänge von ausdifferenzierten Nymphensittichspermien erstreckt sich somit über ca. 70  $\mu\text{m}$ . Vogelspermien besitzen im Vergleich zu Säugetierspermien durch die langgestreckte Kopfform und den großen Kern nur wenig Zytoplasmavolumen, was laut DONOGHUE UND WISHART (2000) als Ursache diskutiert wird, dass Kryoprotektiva nur schlecht in den Spermienkopf penetrieren können und die Spermien somit den Gefrierprozess nur unzureichend überleben.

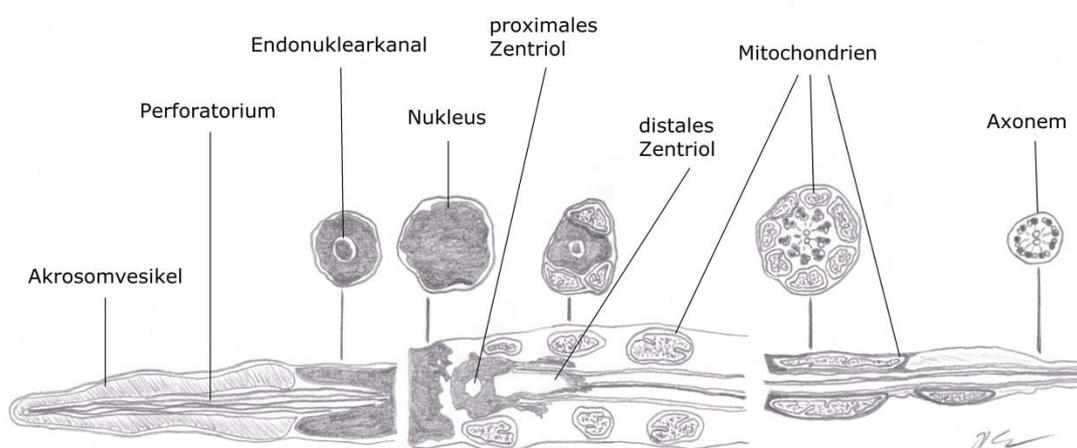


Abbildung 5: Illustration von Längs- und Querschnitten eines Nymphensittichspermiums nach JAMIESON U. A. (1995)

### 2.2.2.3 Nebenhoden

Der Nebenhoden (*Epididymis*) lagert sich dorsomedial dem Hoden an, wobei eine *Extremitas cranialis* und *caudalis* unterschieden werden. Er dient zur Spermienaufbewahrung und –reifung, die im *Appendix epididymidis* gelagert sind. Der mit glatten Muskelzellen ausgestattete Nebenhodengang (*Ductus epididymidis*) führt nach kaudal in den Samenleiter (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). LAKE (1957) vermutet, dass dem Seminalplasma im Nebenhoden Lipide, Proteine und Polysaccharide zugesetzt werden. Der Transport der Spermien erfolgt über ein hochprismatisches Epithel, das mit apikalen Stereozilien ausgestattet ist.

### 2.2.2.4 Samenleiter

Der stark geschlängelte Samenleiter (*Ductus deferens*) reicht vom Nebenhoden bis zur Kloake und mündet in die Lateralwand des *Urodeums* ein, nachdem er den Harnleiter gekreuzt hat (Abbildung 7). Der kraniale Abschnitt des Samenleiters, der retroperitoneal an der dorsalen Leibeswand nach kaudal verläuft, wird wegen seiner zahlreichen Windungen als *Ansa ductus deferentis* bezeichnet. Kurz vor der Kloake befindet sich ein gerader Mündungsabschnitt (*Pars recta ductus deferentis*), der sich jedoch dicht vor der Mündung in die Kloake zum ampullenförmigen *Receptaculum ductus deferentis* ausweitet. Eine drüsenhaltige Wand fehlt allerdings im Vergleich zu den Säugetieren (WAIBL UND SINOWATZ, 2004). Die Mündungsöffnung des Samenleiters in das Kloakenlumen (*Ostium cloacale ductus deferentis*) befindet sich am Ende der *Papilla ductus deferentis*. Diese ist bei einigen Vogelarten, wie zum Beispiel den Sperlingen (*Passerinae*) oder auch dem Wellensittich bläschenartig zum *Glomerulum seminale* erweitert (BAILEY, 1953; SAMOUR U. A., 1988), welches sich in der Fortpflanzungsperiode zum *Promontorium cloacale* vergrößert. Je nach Fortpflanzungsstadium sind Gewicht und Länge des Samenleiters unterschiedlich stark ausgeprägt. In Ruhezeiten bildet er sich zurück, wohingegen er zu Beginn der Fortpflanzungszeit stark an Gewicht und Länge zunimmt und sich wieder in zahlreiche Windungen legt. Ähnlich wie beim Nebenhoden erfolgt auch im Samenleiter der Transport der Spermien über ein mit Stereozilien ausgestattetes Epithel. Die Länge der Zilien nimmt jedoch distalwärts stark ab.

### 2.2.2.5 Kloake und Kopulationsorgan

Die Kloake ist der gemeinsame Abschnitt des Verdauungs- und Urogenitalsystems (Abbildung 7). Sie mündet über die Kloakenöffnung (*Ventus*) nach außen und ist durch Ringfalten in drei Abteilungen unterteilt. Der kraniale Abschnitt wird als Kotraum (*Coprodeum*), der mittlere Abschnitt mit Mündung der Harn- und Samenleiter als Harnraum (*Urodeum*) und der kaudale Abschnitt als Endraum (*Proctodeum*) bezeichnet. Das *Coprodeum* wird durch die *Plica rectocoprodealis* eher undeutlich vom Rektum abgetrennt. Als Grenze zwischen dem größeren *Coprodeum* und der kleineren Abteilung des *Urodeums* gilt die *Plica coprourodealis*, wohingegen die *Plica uroproctodealis* den Harnraum zum Endraum hin abgrenzt (VOLLMERSHAUS UND SINOWATZ, 2004). In die Dorsalwand des *Urodeums* münden mit je einem *Ostium cloacale ureteris* die beiden Harnleiter, während die beiden Samenleiter auf je einer *Papilla ductus deferentis* mit dem *Ostium cloacale ductus deferentis* in die Lateralwand münden. Während des Kotabsatzes tritt der kreisrunde Innenrand der *Plica coprourodealis* aus der Kloakenöffnung hervor und deckt somit die Mündungsöffnungen der Harn- und Geschlechtsgänge ab (VOLLMERSHAUS UND SINOWATZ, 2004). Dorsal und lateral in der Wand des *Proctodeums* sind bei einigen Vogelarten Drüsen (*Glandulae proctodeales dorsales et laterales*) untergebracht, die in der Reproduktionsphase extrem anschwellen können (MCFARLAND U. A., 1968). Das Kopulationsorgan der Vögel (*Phallus*) ist tierartlich unterschiedlich ausgeprägt und unterscheidet sich im Aufbau von dem der Säugetiere (KING, 1981). Bei Hühnervögeln ist ein *Phallus nonprotrudens*, d. h. ein nicht ausstülpbares Phallusrudiment ausgebildet, wohingegen bei Enten- und Gänsevögeln ein *Phallus protrudens* vorkommt. Bei den meisten Papageien ist das Kopulationsorgan nur in Form einer kloakalen Protuberanz ausgebildet (MONTGOMERY, 2010). Eine Ausnahme bildet der Vasapapagei, bei dem durch das Anschwellen der Kloakenschleimhaut ein ausstülpbarer Phallus als Kopulationsorgan eine feste Verankerung in der Kloake des Weibchens ermöglicht (WILKINSON UND BIRKHEAD, 2008).

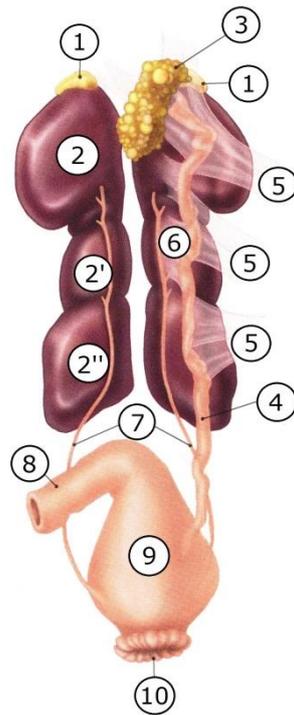


Abbildung 6: Digitale Illustration: Urogenitaltrakt eines weiblichen, hormonell aktiven Papageis  
 Nebennieren (1); kranialer (2), mittlerer (2') und kaudaler (2'') Teil der Niere; Ovar (3); Eileiter (4); dorsales  
 Eileiterband (5); ventrales Eileiterband (6); Harnleiter (7); Rektum (8); Kloake (9); Ventus (10); Quelle:  
 HERMANN (2014).

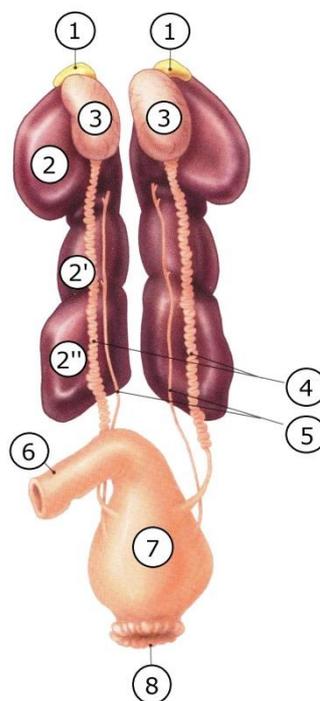


Abbildung 7: Digitale Illustration: Urogenitaltrakt eines männlichen, hormonell aktiven Papageis  
 Nebennieren (1); kranialer (2), mittlerer (2') und kaudaler (2'') Teil der Niere; Hoden (3); Samenleiter (4);  
 Harnleiter (5); Rektum (6); Kloake (7); Ventus (8); Quelle: HERMANN (2014)

### 2.2.2.6 Akzessorische Geschlechtsorgane

Neben den Spermien besteht das Sperma aus einer zellfreien Flüssigkeit, dem Seminalplasma. Die bei Säugetieren bekannten akzessorischen Geschlechtsdrüsen (*Glandula bulbourethralis*, *Glandula vesicularis*, *Ampulla ductus deferentis* und *Prostata*) existieren in der Form bei Vögeln nicht. Die akzessorischen Geschlechtsorgane des Geflügels bestehen laut NISHIYAMA (1955) hingegen aus zwei Anteilen, einer lymphgefäßreichen Falte (NISHIYAMA, 1950) und den parakloakalen Gefäßkörpern (LIEBE, 1914). Die in zahlreichen Lymphsinus gebildete Lymphflüssigkeit steht sowohl mit dem Gefäßkörper, als auch mit dem *Phallus*, falls vorhanden, in Verbindung und sorgt für ein Anschwellen von Kloakenwand und *Phallus* (NISHIYAMA, 1955). Dem aus den Samenleitern austretenden Sperma wird also bei Eintritt in den Harnraum der Kloake durch die dort angesiedelten Lymphdrüsen eine seminalplasmaähnliche Flüssigkeit beigegeben, die von NISHIYAMA (1951, 1955) als „transparent fluid“ bezeichnet wird. Bei Zugabe von kleineren Mengen „transparent fluid“ wird von einer Zunahme der Spermienbeweglichkeit berichtet, wohingegen größere Volumina zu einer Spermienagglutination und somit Hemmung der Motilität führen (NISHIYAMA, 1955). Zusammensetzung und Volumen des Seminalplasmas weichen stark von dem der Säugetiere ab. Die Seminalplasmazusammensetzung von domestiziertem Geflügel wurde bereits in den 1960iger Jahren untersucht (LAKE U. A., 1958; BELL UND LAKE, 1962; LAKE U. A., 1962). Hierbei zeigte sich, dass Geflügelsperma einen hohen Gehalt an freien Aminosäuren hat. Zu einem großen Anteil (ca. 80 %) bestehen diese aus Glutaminsäure, der offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Einstellung des pH-Wertes und der Osmolalität zukommt (LAKE UND McINDOE, 1959). Weitere Aminosäuren wurden in wesentlich geringeren Konzentrationen nachgewiesen und scheinen daher eine untergeordnete Rolle einzunehmen. Im Gegensatz zum Seminalplasma des Säugers enthält das von Geflügel kein Zitrat und einen vielfach niedrigeren Zinkwert (0,0285 mmol/l) (LAKE U. A., 1958) (vgl. 2,4 mmol/l bei Menschen (KAVANAGH, 1985), was möglicherweise auf das Fehlen der Prostata zurückzuführen ist (LAKE, 1957b). Der Chloridgehalt lag im Mittel bei 59 mmol/l, was verglichen mit Werten des Hengstes ( $\text{Cl}^- = 114,5 \text{ mmol/l}$ ) (PESCH U. A., 2006a) ebenfalls sehr niedrig ist, während der Kaliumwert mit 17 mmol/l (LAKE U. A., 1958) ähnlich hoch liegt wie der in Hengstsperma gemessene Wert (22,1 mmol/l) (PESCH U. A., 2006a). In der Ordnung der

Papageien liegen detaillierte Untersuchungen zur Seminalplasmazusammensetzung für den Wellensittich durch SAMOUR (1986) vor, der unter anderem die Zuckerkonzentrationen mit 4,3 mmol/l für Glukose und 0,3 mmol/l für Fruktose angab. Der Glukosewert lag hierbei im Bereich der für Wirtschaftsgeflügel gemessenen Werte (vgl. 4,1 mmol/l (HAMMOND U. A., 1965), wobei der Fruktosewert deutlich höher lag (vgl. 0,1 mmol/l (LORENZ, 1959)). Die im Vergleich zum Wirtschaftsgeflügel hohen gemessenen Kalium- (16,4 mEq/l) und Chloridwerte (109,2 mEq/l) werden vom Autor durch Kontaminationen mit Uraten und „transparent fluid“ erklärt. Die Zusammensetzung des Seminalplasmas bestimmt daher maßgeblich die Überlebensfähigkeit von Spermien nach der Ejakulation. SEXTON (1988) fand jedoch heraus, dass die Zugabe von ungefiltertem, inkubierten Seminalplasma in vitro die Befruchtungsfähigkeit von Hahnenspermien dramatisch senkt. Als Gründe hierfür werden Kontaminationen des durch Massage gewonnenen Seminalplasmas mit Kot und/oder Harnsäure angesehen, da die Spermienmotilität nach Filterung signifikant anstieg (SEXTON, 1988).

## 2.3 Spermagewinnung beim Vogel

Die ersten Versuche der Spermagewinnung beim Vogel liegen mittlerweile über ein Jahrhundert zurück, wobei verschiedene Techniken Verwendung fanden. Erstmals strich IVANOV (1913) die Samenleiter von getöteten Hähnen aus. PAYNE (1914) gewann Hahnensperma, indem er unmittelbar postkoital die Flüssigkeit aus der Kloake der Henne sammelte. ISHIKAWA (1930) entwickelte eine, aus einer tierischen Membran bestehenden, künstliche Kloake, die der Henne umgeschlallt wurde und beim Tretakt die Spermien auffing. Als zuverlässige, erfolgreich reproduzierbare Methode vom männlichen Vogel Sperma in ausreichender Menge zu gewinnen, zeigte sich erstmals die Massagemethode von BURROWS UND QUINN (1935).

### 2.3.1 Kooperative Ejakulation

Die Methode der kooperativen Ejakulation wird hauptsächlich bei fehlgeprägten männlichen Vögeln angewendet, die in ihrem Trainer einen Geschlechtspartner sehen und freiwillig mit ihm kopulieren und auf ihm ejakulieren. BOYD UND SCHWARTZ (1983) entwickelten dazu für Wanderfalken (*Falco peregrinus*) einen speziellen Hut, den der

Trainer auf dem Kopf trägt, auf dem der Vogel kopuliert und ejakulieren kann. Das herunterlaufende Sperma kann aus einer Rinne am Hutrand mit Hilfe einer Spritze aufgesaugt werden. BOYD U. A. (1977) berichten außerdem von der kooperativen Spermagewinnung beim Präriefalken (*Falco mexicanus*). Auch von Steinadlern (*Aquila chrysaetos*) (GRIER, 1973), Emus (*Dromaius novaehollandiae*) (MALECKI U. A., 1997), Magellan-Pinguinen (*Spheniscus magellanicus*) und Felsenpinguinen (*Eudyptes chrysocome*) ist eine kooperative Ejakulation bekannt. Zur erfolgreichen kooperativen Ejakulation ist allerdings langes und intensives Training oder eine Fehlprägung der Tiere auf den Menschen notwendig, sodass diese Methode sehr aufwendig und oft nicht angezeigt ist.

### 2.3.2 Massagetechnik

In den 1930er Jahren wurden von BURROWS UND QUINN (1935) eine Methode zur routinemäßigen Spermaentnahme durch abdominale Massage entwickelt. Hierbei wurde der Vogel von einer Hilfsperson fixiert, während eine andere Person durch schnelle, rhythmische Massage der weichen Abdominalregion unmittelbar neben dem knöchernen Becken die Ejakulation herbeiführte. Die Kloake wurde anschließend mit zwei Fingern umfasst, durch sanften beidseitigen Druck ausgestülpt und das Sperma konnte nachfolgend aus dem *Ventus* in einem entsprechenden Gefäß (z.B. Becherglas) aufgefangen werden (BURROWS UND QUINN, 1935). In einer Weiterentwicklung dieser Methode konnte die Spermaentnahme durch die Zuhilfenahme einer Fixationsvorrichtung auch von einer Einzelperson durchgeführt werden. LAKE (1957a) modifizierte die Massagemethode dementsprechend, dass eine zusätzliche, gleichzeitige Massage der Lumbalregion erfolgte, was laut Autor zu einer stärkeren Ejakulation ohne Kontamination mit „transparent fluid“ führte. Diese Methoden wurden über Jahrzehnte erfolgreich beim Wirtschaftsgeflügel angewandt, wobei eine regelmäßige Spermaentnahme von mindestens einmal pro Woche angeraten ist, um eine ausreichend gute Spermaqualität zu erhalten. Längere Pausen zwischen den Spermaabnahmen vermindern laut SCHRAMM (2005) die Reaktionsfähigkeit auf die Massage und bewirken Degenerationen der Spermienzellen und des Spermienbildungsgewebes in den Hoden. Bei Hähnen kann die Ejakulatgewinnung laut Autor drei- bis fünfmal wöchentlich erfolgen, ohne zu signifikanten Änderungen des Volumens oder der Qualität zu führen. Beim

Wassergeflügel kann eine analoge Anwendung der Massagemethode erfolgen, wobei das anschwellende Kopulationsorgan hierbei jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die Spermagewinnung nimmt (SCHRAMM, 2005). Der Ganter wird von einer Hilfsperson in waagerechter Stellung fixiert, während eine andere Person durch gleichzeitige kräftige Rücken- und Abdominalmassage die Ejakulation auslöst. Durch kräftigen Druck auf die Kloake kommt es zu einem Ausstülpen des Phallus, an dessen Ende das abfließende Sperma aufgesammelt werden kann (SCHRAMM, 2005). Bei Moschusenten (*Cairina moschata*) kann auf die eigentliche Massage verzichtet werden, indem den paarungswilligen Erpeln eine Ente zugesetzt wird und während der Begattung, kurz vor der Ejakulation, der Phallus aus der Kloake vorgelagert wird, um das Sperma in einem entsprechenden Behältnis aufzufangen (SCHRAMM, 2005).

In den vergangenen Jahrzehnten häuften sich zudem die Versuche der Spermagewinnung durch Massage an nichtdomestizierten Vogelspezies. So konnte beispielsweise Sperma von Buntfalken (*Falco sparverius*) (GEE U. A., 1993) und Habichten (CORTEN, 1973) durch eine modifizierte Massagemethode nach BIRD UND LAGUE (1977) gewonnen werden. Hierbei werden die männlichen Vögel in Rückenlage fixiert, wobei darauf zu achten ist, dass die Füße entsprechend fixiert sind. Bei an die Haube gewöhnten Falken (*Falconiformes*) und Adlern (*Aquilinae*) sollte vor der Anwendung der Massagemethode eine Verhaubung erfolgen, während der Kopf von nicht an die Haube gewöhnten Tieren mit einem Tuch abgedeckt werden kann. Die Massage erfolgt durch leichten Druck auf die Abdominalregion in kраниokaudaler Richtung der Kloake, um das Sperma aus den Samenleiterampullen auszumassieren und es nachfolgend aus dem *Ventus* aufzunehmen (HEIDENREICH, 1995). GEE UND TEMPLE (1978) modifizierten die Massagemethode zur Spermaentnahme bei Kanadakranichen (*Grus canadensis*), was von BLANCO U. A. (2012) übernommen wurde. Hierbei wird das Tier von einem Assistenten in aufrechter Position fixiert, wobei gleichzeitig die Innenschenkel und die ventrale Abdominalregion gestreichelt werden (GEE, 1983). Der Untersucher stimuliert in der gleichen Zeit die Rücken- und Kloakenpartie, indem er mit der linken Hand vom dorsalen Rücken zum Becken hin streicht, um anschließend mit der gleichen Hand die seitliche Schwanzpartie zu massieren. Nun wird der Schwanz mit der linken Hand nach oben hin fixiert, während die rechte Hand die Sternal- und Abdominalregion von kranial nach kaudal hin ausstreicht (GEE, 1983). Die Kloake wird mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand umgriffen,

sodass das austretende Sperma mit einem Glasgefäß in der rechten Hand aufgefangen werden kann (GEE, 1983). Bei Papageien konnten erste Erfolge der Spermaentnahme durch Massage durch HARRISON (1982) bei Nymphensittichen verzeichnet werden, welches später durch leichte Abwandlungen auch routinemäßig erfolgen konnte (NEUMANN U. A., 2013). Bei Wellensittichen (SAMOUR U. A., 1986; SAMOUR U. A., 1988; BEHNCKE, 2002) und Mönchsittichen (*Myiopsitta monachus*) (ANDERSON U. A., 2002) war es ebenfalls möglich, routinemäßig Sperma durch eine modifizierte Massagemethode zu gewinnen, wohingegen die routinemäßige Spermaentnahme bei Großpapageien lange Zeit nur unzureichend erfolgreich war. So waren von 146 Versuchen der Spermaentnahme durch Massage bei Blaukronenamazonen (*Amazona ventralis*) nur 51 % erfolgreich (BROCK, 1991), während Versuche bei Blaustirnamazonen lediglich zu einer Erfolgsrate von 6,6 % (22/336) führten (DELLAVOLPE U. A., 2011).

### 2.3.3 Elektroejakulation

Die Elektroejakulation entstammt ursprünglich der Säugetiermedizin und wurde von SEREBTOVSKII UND SOKOLOVAKAJA (1934) erstmals erfolgreich bei Vögeln durchgeführt. Hierzu wurde eine Nadel in die Haut von Perlhühnern (*Numididae*), Enten (*Anatidae*), Gänsen (*Anserinae*), Hähnen und Fasanen (*Phasianidae*) eingeführt und eine elektrische Spannung von 30 bis 90 V angelegt. Eine zweite Nadel wurde zur Ableitung in ein wassergefülltes Gefäß gehalten, in die auch der Schnabel des jeweiligen Vogels getaucht wurde, um den Kreislauf zu schließen (SEREBTOVSKII UND SOKOLOVAKAJA, 1934). Das Hauptproblem dieser Methode bestand in der vergleichsweise hohen Komplikationsrate, die sich durch Hautverbrennungen, Krämpfe, Atemstillstand, Herzstillstand oder sogar dem Tod des Tieres äußerte. Später wurde die Nadel durch ein Zinnblech oder eine mit physiologischer Kochsalzlösung getränkte Mullbinde ersetzt, um die Komplikationsrate zu senken. Ein Vorteil der elektrostimulierten Ejakulation im Vergleich zur Massagemethode und zur kooperativen Ejakulation liegt darin, dass der Untersucher keinerlei weiterführende Erfahrung benötigt (BETZEN, 1985). Die Methode der Elektroejakulation fand in der Wirtschaftsgeflügelzucht lange Zeit jedoch nur wenig Beachtung, da die Massagemethode zuverlässig erfolgreich war. WATANABE (1957) modifizierte die Elektroejakulationsmethode bei Erpeln dahingehend, dass eine Spannung von 30 V über zwei Elektroden, von denen eine in der Sakralgegend und die andere innerhalb der Kloake angelegt wurde. Das auf

diese Weise gewonnene Sperma hatte im Vergleich zu der Massagemethode sowohl ein größeres Volumen, als auch eine höhere Spermienkonzentration. Bei nicht-domestizierten Vögeln wurde die Elektroejakulation von HARRISON UND WASMUND (1983) erstmals bei Papageien (*Psittaciformes*) beschrieben. Die angelegte Wechselspannung variierte hierbei zwischen 4 und 17 V und die elektrische Stromstärke zwischen 4 und 19 mA. Über die Frequenz wurde keine Aussage getroffen. Bei einem Wellensittich konnte auf diese Weise in 76 % der Versuche Sperma gewonnen werden, beim Nymphensittich betrug die Erfolgsrate lediglich 37,5 %. Beim Hahn's Zwergara (*Diopsittaca nobilis*) war die Spermaentnahme in keinem der Versuche erfolgreich, während vom Großen Soldatenara (*Ara ambiguus*) in 80 % der Fälle Sperma durch die Elektroejakulation gewonnen werden konnte (HARRISON UND WASMUND, 1983).

LIERZ U. A. (2013) entwickelten und etablierten eine Elektroejakulationsmethode an 243 Männchen 151 verschiedener Papageienarten. Hierzu wird der Vogel von einer Hilfsperson in Rückenlage fixiert. Die zweite Person führt eine, der Größe des Vogels angepasste, biopolare Elektrode, in die Kloake ein, sodass sie maximal bis ins *Urodeum* reicht. Eine leichte elektrische Spannung (zwischen 1 und 14 V) wird nachfolgend in kurzen, ein bis zwei Sekunden andauernden Intervallen angelegt, wobei zwischen den Intervallen Pausen von zwei bis zehn Sekunden eingehalten werden. Im Bedarfsfall wird jedes Intervall mit einer geringgradig erhöhten Spannung durchgeführt, bis Kontraktionen der Kloaken- und Schwanzmuskulatur eine erfolgreiche Stimulation anzeigen. Das gewonnene Sperma kann in skalierten Mikrokapillaren aus dem *Ventus* gesammelt werden. Auf diese Weise war eine erfolgreiche Spermaentnahme von Großpapageien in 79,9 % der Versuche möglich, was zuvor durch alleinige Massagemethode nicht möglich war (LIERZ U. A., 2013).

## 2.4 Artificielle Insemination

Die Techniken der artifiziellen Insemination (AI) beim Vogel gehen ebenfalls auf IVANOV (1913) zurück, der Hahnsperma zur intrakloakalen Insemination von Hennen nutzte und eine Fertilisationsrate von 23,26 % (10/43) erzielen konnte. JULI UND QUINN (1931) erreichten eine ähnliche Fertilisationsrate (19,1 %) bei der Erzeugung von Hybrid-Rassehühnern nach artifizierter Insemination. Erst QUINN UND BURROWS (1936) konnten

durch intravaginale Insemination von Hühnern Fertilisationsraten von bis zu 97 % erreichen. Hierzu wurden die Hennen mit Hilfe der linken Hand des Untersuchers unter der Brust fixiert, wobei der Zeigefinger zwischen den Beinen des Tieres zu liegen kam. Die Henne wurde dann kopfüber mit dem Rücken an der Brust des Untersuchers liegend fixiert, sodass durch leichten Druck von Daumen und Zeigefinger die Kloake vorgelagert werden konnte. Zusätzlicher Druck der rechten Hand auf das Abdomen führte nun zu einer Auslagerung der Oviduktöffnung in der Kloakenwand (QUINN UND BURROWS, 1936). In einem späteren Versuch mit Truthühnern (*Meleagris gallopavo*), bei denen die Hennen ebenfalls auf eine ähnliche Weise intravaginal besamt wurden, konnten Fertilisationsraten von 80 % erreicht werden (BURROWS UND MARSDEN, 1938). Die intrauterine Spermieninjektion kann hingegen mit Infektionen des Eileiters bis hin zum Einstellen der Legetätigkeit verbunden sein. Sie sollte daher vermieden werden (SCHRAMM, 2005). Nach der Insemination werden ca. 1 % der inseminierten Spermien in den Uterovaginaldrüsen (semen storage tubules, SST) des uterovaginalen Bereiches des Eileiters gespeichert (BAKST U. A., 1994), deren Befruchtungsfähigkeit jedoch, je nach Art, über Tage bis Wochen aufrechterhalten wird. Gleichzeitig erfolgen die Spermienselektion und die gleichzeitige gesteuerte kontinuierliche Freisetzung der Spermatozoen und ihr Transport zum *Infundibulum*, wo die Befruchtung der Eizellen stattfindet (BAKST U. A., 1994; SASANAMI U. A., 2013; WAIBL UND SINOWATZ, 2004). In der kommerziellen Geflügelzucht werden zufriedenstellende Befruchtungsergebnisse (> 80 %) über die gesamte Reproduktionsperiode durch wöchentliche intravaginale Inseminationsintervalle mit einer Inseminationsdosis von 50 bis 300 Millionen motiler Spermien erreicht (BAKST U. A., 1994). Auch im Bereich der nichtdomestizierten Vogelspezies konnten im Verlauf der letzten Jahrzehnte zahlreiche Arten durch artifizielle Insemination reproduziert werden. So erzielte erstmals TEMPLE (1972) bei geprägten Rotschwanzbussarden (*Buteo jamaicensis*) eine Fertilisationsrate von 100 % nach intravaginaler artifizieller Insemination. Aber auch bei nicht geprägten Buntfalken konnte durch BIRD U. A. (1976) mithilfe intravaginaler Insemination eine Fertilisationsrate von 75,2 % erzielt werden. Auch Präriefalken (BOYD U. A., 1977), Steinadler (GRIER, 1973), Spießenten (*Anas acuta*) (PENFOLD U. A., 2001), Kanadakraniche (BLANCO U. A., 2012) und verschiedene Pinguinarten (O'BRIEN U. A., 1999; O'BRIEN UND ROBECK, 2014) konnten erfolgreich durch künstliche Besamung reproduziert werden. Aus der Ordnung der Psittaziden konnten ebenfalls aus artifizieller Insemination

Nachzuchten von Wellensittichen (SAMOUR U. A., 1988), Blaukronenamazonen (BROCK, 1991), Königsamazonen (FISCHER U. A., 2013a) erzielt werden. Weiterhin konnten LIERZ U. A. (2013) in ihrer Studie durch artifizielle Insemination sieben verschiedener Großpapageienarten (*Cacatua haematuropygia*, *Ara chloroptera*, *Amazona petrei*, *Amazona xantholora*, *Amazona finschii*, *Tanygnathus lucionensis*, *Eclectus roratus polychlorus*) erfolgreiche Befruchtungen erzielen. Auch bei Nymphensittichen wurden in der Vergangenheit die Techniken der assistierten Reproduktion (AR) erfolgreich angewandt und modifiziert, sodass detailliertere Erkenntnisse hierzu bereits vorliegen. Nach intrakloakaler Insemination konnte eine Befruchtungsrate von 73,9 % erzielt werden (NEUMANN U. A., 2013). Die minimale Besamungsdosis zur erfolgreichen Befruchtung lag nach intrakloakaler Besamung bei 232.500 Spermien in 5 µl, wohingegen ein geringeres Volumen nicht zu einer erfolgreichen Befruchtung führte, selbst wenn eine größere Anzahl Spermien appliziert wurde (FISCHER U. A., 2014b). Zur erfolgreichen intravaginalen Besamung war eine Besamungsdosis von 250.000 Spermien in 2 µl notwendig (FISCHER U. A., 2014b).

## 2.5 Spermaqualitätsuntersuchung

Eine spermatologische Untersuchung des gewonnenen Ejakulats gibt Aufschluss über die Quantität und Qualität und liefert somit Hinweise zur Befruchtungsfähigkeit des gewonnenen Spermas. Eine definitive Aussage zur Befruchtungsfähigkeit kann jedoch nur über einen Fruchtbarkeitsnachweis erfolgen (WEITZE, 2001).

### 2.5.1 Makroskopische Untersuchung

Frisch gewonnenes Sperma wird zunächst einer makroskopischen Untersuchung hinsichtlich Volumen, Farbe, Konsistenz, sowie dem Vorliegen von Ejakulatverunreinigungen nach den Standardmethoden der Weltgesundheitsorganisation unterzogen (WHO, 2010). Zur Volumenmessung eignen sich graduierte Glaspipetten oder Mikrokapillaren. Für Wellensittiche wurden von SAMOUR U. A. (1986) Ejakulatvolumina von 3,5 bis 13,5 µl angegeben, wohingegen BEHNCKE (2002) die entsprechenden Werte getrennt für Zuchtwellensittiche (0,2 bis 3,7 µl) und Schauwellensittiche (0,1 bis 5,2 µl) ermittelte. ANDERSON U. A. (2002) geben Volumina von 1,0 bis 3,0 µl als Standardwerte von

Mönchsittichen an (Tabelle 1). Bei der Blaukronenamazone konnten Spermavolumina zwischen 5,3 und 30,4  $\mu\text{l}$  gewonnen werden (BROCK, 1991), während das durchschnittliche Spermavolumen von Königsamazonen 5,2  $\mu\text{l}$  (0,1 – 62  $\mu\text{l}$ ) betrug (FISCHER U. A., 2013a). In einer Studie an 243 männlichen Papageien aus 151 verschiedenen Spezies wurden Ejakulatvolumina getrennt für die Gruppen „Kakadus“ ( $\bar{x}$  = 12,4  $\mu\text{l}$ ; 1,8 – 54  $\mu\text{l}$ ), „Aras“ ( $\bar{x}$  = 7,4  $\mu\text{l}$ ; 3,0 – 19,5  $\mu\text{l}$ ), „Amazonen“ ( $\bar{x}$  = 8,5  $\mu\text{l}$ ; 2,8 – 18,4  $\mu\text{l}$ ), „*Electus ssp*“ ( $\bar{x}$  = 11,4  $\mu\text{l}$ ; 1,0 – 29  $\mu\text{l}$ ), „Loris“ ( $\bar{x}$  = 6,3  $\mu\text{l}$ ; 1,3 – 12,6  $\mu\text{l}$ ) und „Andere“ ( $\bar{x}$  = 7,1  $\mu\text{l}$ ; 1,5 – 29,8  $\mu\text{l}$ ) angegeben (LIERZ U. A., 2013). Im Gegensatz dazu liegen die gewonnenen Volumina vom Wirtschaftsgeflügel deutlich höher. So werden für Haushähne Werte von 0 bis 3 ml angegeben (BURROWS UND QUINN, 1935), wohingegen bei Putenhähnen ein deutlich geringes Durchschnittsvolumen von 0,2 ml erzielt werden konnte (BURROWS UND QUINN, 1937). Selbst bei deutlich größeren Vogelarten wie dem Strauß (*Struthio camelis*) konnte lediglich ein mittleres Volumen von 0,6 ml (0,1 – 1,5 ml) gewonnen werden (HEMBERGER U. A., 2001). GRIER (1973) konnte durch kooperative Ejakulation beim Steinadler ein Maximalvolumen von 0,2 ml gewinnen. BOYD U. A. (1977) konnten durch kooperative Ejakulation beim wesentlich kleineren Präriefalken ein Spermavolumen von maximal 100  $\mu\text{l}$  gewinnen konnte. Beim Haushahn hat das Sperma eine weißliche bis opake Farbe (WAIBL UND SINOWATZ, 2004), während HEMBERGER U. A. (2001) für Straußenejakulat eine Färbung von weiß bis elfenbeinfarben mit physiologischer Konsistenz von dünnflüssig bis dick-cremig angibt. Laut BEHNCKE (2002) kann bei Sperma von milchiger Konsistenz mit einer höheren Spermakonzentration gerechnet werden als bei wässriger Konsistenz. Bei Königsamazonen zeigten 71 % der gewonnenen Ejakulate eine molkig-wässrige Konsistenz bei gleichzeitiger Farbgebung von farblos bis gräulich (FISCHER U. A., 2013a). In 19/31 gewonnenen Ejakulaten von Spix-Aras (*Cyanopsitta spixii*) war die Farbe als gräulich bis weiß einzustufen, während die Konsistenz in 77,4 % der Proben wässrig bis molkig war (FISCHER U. A., 2014a). Eine veränderte Farbe der Spermaprobe kann auf Verunreinigungen wie Blut, Harnsäure oder Kot hinweisen, deren Vorkommenshäufigkeit je nach Spermaentnahmetechnik variieren kann. So waren 9,9 % der Ejakulate von Nymphensittichen, die durch Massagemethode gewonnen wurden, kontaminiert (7,7 % Harnsäure, 1,1 % Blut, 1,1 % Kot) (NEUMANN U. A., 2013). Bei den von Königsamazonen (*Amazona guildingii*) gewonnenen Spermaproben zeigten sogar 46,3 % der Proben Spuren

von Verunreinigungen (FISCHER U. A., 2013a), während die Kontaminationsrate der Ejakulate von Spix-Aras 41,9 % betrug (FISCHER U. A., 2014a).

## 2.5.2 Chemisch-physikalische Untersuchung

### 2.5.2.1 pH-Wert

Zur chemisch-physikalischen Spermauntersuchung zählt in erster Linie die Bestimmung des pH-Wertes. Der pH-Wert sollte laut WHO (2010) innerhalb einer Stunde nach Ejakulation gemessen werden. Durch den auftretenden CO<sub>2</sub>-Verlust während der Lagerung wird bei später evaluierten Proben häufig ein erhöhter pH-Wert ermittelt (WHO, 2010). Zur Evaluierung wird kommerzielles Indikatorpapier genutzt, dessen Farbumschlag den pH-Wert anzeigt. Bei Vögeln wird der pH-Wert speziesspezifisch unterschiedlich angegeben. Der pH-Wert von Geflügelsperma wird von NISHIYAMA (1952) mit 7,2 und von WALES UND WHITE (1958) mit 7,6 angegeben. Im Vergleich dazu liegt der pH-Wert des Seminalplasmas verschiedener Papageienarten deutlich alkalischer. So wurden für Wellensittiche Werte zwischen 8,2 (SAMOUR, 1986) und 8,7 (BEHNCKE, 2002) ermittelt. Ebenfalls alkalische pH-Werte von 8,0 bis 8,5 wurden bei Mönchsittichen gemessen (ANDERSON U. A., 2002), während verschiedene Großpapageienarten eher im pH-neutralen Bereich anzusiedeln waren. So konnten für Spermaproben von Spix-Aras ( $n = 31$ ;  $\bar{x} = 7,0$ ; 6,4 – 8,0) (FISCHER U. A., 2014a), sowie die Gruppen "Kakadus" ( $\bar{x} = 7,0$ ; 5,4 – 8,0), "Amazonen" ( $\bar{x} = 7,3$ ; 5,7 – 8,0), "Aras" ( $\bar{x} = 6,8$ ; 5,4 – 7,8) und "*Electus ssp.*" ( $\bar{x} = 7,0$ ; 5,4 – 7,8) deutlich niedrigere pH-Werte bestimmt werden (Tabelle 1). NISHIYAMA (1952) und WALES UND WHITE (1958) ermittelten Werte von 7,2 bzw. 7,6 für Sperma von Haushähnen, für Spermaproben von Straußen wurde ein mittlerer pH-Wert von 7,3 (6,4 – 8,0) angegeben (HEMBERGER U. A., 2001). BLANCO U. A. (2002) konnten beispielhaft an Greifvögeln zeigen, dass mit Harnsäure (Urin) kontaminiertes Sperma einen niedrigeren pH-Wert (6,5 – 6,9) aufwies als nichtkontaminiertes Sperma (7,2 – 7,6). Die ermittelten Werte für Nymphensittiche lagen indes, ähnlich zu denen der Wellensittiche, im alkalischen Bereich ( $\bar{x} = 9,0$ ; 8,0 – 9,5) (STELZER, 2004)

### 2.5.2.2 Osmolalität

Aus der chemischen Zusammensetzung des Seminalplasmas, insbesondere dem Anteil der Aminosäuren, bestimmt sich die Osmolalität, die den Anteil osmotisch aktiver Substanzen pro kg einer Lösung angibt. Diese organischen Moleküle, aber auch Kaliumionen ( $K^+$ ) werden von somatischen Zellen zur Volumenregulation genutzt (YEUNG, 2003). In Tiermodellen wurde nachgewiesen, dass die Spermien im männlichen Genitaltrakt einem eher hyperosmotischem Milieu ausgesetzt sind, um deren Strapazierfähigkeit für die Passage des deutlich hypoosmotischen weiblichen Genitaltraktes zu erhöhen (COOPER UND YEUNG, 2003). Die Messung der Osmolalität gehört laut WHO jedoch nicht zu den Standardqualitätsuntersuchungen. Zur Osmolalitätsbestimmung des Seminalplasmas wurden in verschiedenen Studien Dampfdruckosmometer, die mit Hilfe standardisierter Lösungen kalibriert waren und zu deren Messungen jeweils geringe Probenvolumina ausreichten, genutzt (SAMOUR, 1986; SONTAKKE U. A., 2004; PENFOLD U. A., 2001). Eine weitere Methode der Osmolalitätsmessung ist die der Kryoskopie, indem die Gefrierpunktniedrigung der gemessenen Probe im Vergleich zu Wasser Aufschluss über den Anteil osmotisch aktiver Substanzen liefert. SAMOUR (1986) gibt für die Osmolalität von Wellensittich-Seminalplasma einen Wert von 329,9 mOsm/kg an, für Emus wurde ein mittlerer Wert von 310 mOsm/kg ermittelt (MALECKI UND MARTIN, 2000), wohingegen der Osmolalitätswert des Seminalplasmas der Spießente mit 275 mOsm/kg deutlich niedriger liegt (PENFOLD U. A., 2001) (Tabelle 1). Vergleichsweise dazu ist die gemessene Osmolalität des Spermias der Felsentaube (*Columba livia*) mit 340 mOsm/kg (SONTAKKE U. A., 2004) im hyperosmotischeren Bereich anzusiedeln.

## 2.5.3 Mikroskopische Untersuchung

### 2.5.3.1 Mikroskopische Voruntersuchung

Die mikroskopische Voruntersuchung wird von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für alle ungefärbten Spermiproben unmittelbar nach der Entnahme zu einer ersten Qualitätseinschätzung empfohlen (WHO, 2010). Diese wird unter einem Phasenkontrastmikroskop in 100facher Vergrößerung vorgenommen, um Spermienaggregationen oder -agglutinationen oder die Beimengungen anderer Zellen,

wie z.B. Epithelzellen, Erythrozyten oder Leukozyten, zu erkennen. In diesem Zuge erfolgt auch eine erste Einschätzung der Spermienmenge, um die nachfolgende Verdünnung zur Spermindichtezählung vorzunehmen, sowie eine erste Beurteilung der Spermienmotilität (WHO, 2010). NEUMANN U. A. (2013) durchmustern hierzu das in einer Mikrokapillare befindliche Sperma und graduieren die geschätzte Spermienanzahl und -motilität von gering, über mittel bis hoch. In einer Studie zur Spermienqualität von Spix-Aras wiesen nur 5/31 (16,1 %) Proben eine hohe Spermienanzahl auf, wohingegen 9 Proben als moderat eingestuft wurden und der größte Anteil der Spermaproben (54,8 %) nur einen geringen Anteil an Spermien in der Kapillare aufwies (FISCHER U. A., 2014a).

### **2.5.3.2 Spermienmotilität**

Die Spermienmotilität sollte laut WHO so schnell wie möglich nach der Spermaentnahme, spätestens aber nach 30 Minuten, bestimmt werden, um schädliche Effekte wie Dehydratation, pH-Wert- oder Temperaturveränderungen zu vermeiden (WHO, 2010), da diese das Ergebniss negativ beeinflussen. Zur Bestimmung der Motilität sollte eine Gesamtzahl von ca. 200 Spermien in fünf Gesichtsfeldern ausgezählt werden, wobei progressiv motile Spermien von nicht-progressiv motilen und immotilen Spermien unterschieden werden. Die Spermienmotilität wird in der Literatur als wichtigster prognostischer Faktor für die Fertilität angegeben (BIRKHEAD U. A., 1999; FROMAN U. A., 1999; BLESBOIS U. A., 2008). Nichtsdestotrotz wird in der Praxis oft auf die Methode der Schätzung zurückgegriffen, die jedoch stark auf der Erfahrung des Untersuchers basiert und daher subjektiv und untersucherabhängig ist. Auf diese Weise ist es jedoch möglich, einen schnellen Überblick über die Probe zu gewinnen (WABERSKI UND PETRUNKINA, 2007). Objektiv kann die Spermienmotilität über die computergestützte Spermienanalyse (CASA) evaluiert werden (VERSTEGEN U. A., 2002). Unverdünntes Vogelsperma ist oft zu dicht, um Einzelbewegungen der Spermien zu erkennen und somit die Motilität bestimmen zu können, weshalb diese Untersuchung in der Regel an verdünnten Proben vorgenommen wird. Bei domestiziertem Wirtschaftsgeflügel, welches hinsichtlich Fertilität selektiert wurde, werden regelmäßig Beweglichkeitsraten von über 80 % ermittelt (EHLING U. A., 2012; TABATABAEI U. A., 2009). HEMBERGER U. A. (2001) ermittelten eine Spanne von 42 bis 96 % Gesamtmotilität mit ca. 78 % Vorwärtsbeweglichkeit bei unverdünntem

Straußensperma. Für verdünntes Wellensittichsperma wurden Vorwärtsbeweglichkeiten zwischen 6 und 100 % geschätzt (BEHNCKE, 2002), während verdünntes Nymphensittichsperma im Mittel eine geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit von 41,7 % aufwies (STELZER, 2004). In einer Studie an 151 Papageienarten ergaben sich insgesamt ähnliche Gesamtmotilitätsraten von 75,8 % bis 87,3 % und Vorwärtsmotilitätsraten von 70 % bis 82,3 % zwischen den verschiedenen Papageiengruppen (LIERZ U. A., 2013). Die durchschnittlich ermittelte Gesamtmotilität von Spermien von 31 Spix-Aras betrug in einer Studie hingegen lediglich 29 % bei einer Vorwärtsbeweglichkeit von 16 % (FISCHER U. A., 2014a). Ein Vergleich zwischen konventioneller und computergestützter Motilitätsanalyse von Nymphensittichsperma ergab mediane Werte von 55 % Gesamt- und 50 % Vorwärtsbeweglichkeit bei manueller Auszählung, sowie 51,8 % Gesamt- und 44,6 % Vorwärtsbeweglichkeit bei computergestützter Auswertung (FISCHER U. A., 2014b).

### 2.5.3.3 Spermiovitalität

Die Spermiovitalität wird über die Membranintegrität bestimmt und gehört laut WHO zu den Standarduntersuchungen der Spermatologie (WHO, 2010). Ihre Evaluation wird als besonders wichtig bei einer Vorwärtsbeweglichkeit von unter 40 % erachtet (WHO, 2010). Die Evaluation sollte so schnell wie möglich nach der Probengewinnung erfolgen, spätestens jedoch eine Stunde nach der Ejakulation, um schädliche Einflüsse auf die Spermien, und somit die negative Beeinflussung des Ergebnisses, auszuschließen. Der Prozentsatz lebender Spermien wird über die Identifikation der Spermienzellen mit intakter Zellmembran ermittelt, wozu verschiedene Färbemethoden genutzt werden können. Zellmembranen von toten Spermien sind permeabel für verschiedene Farbstoffe, die durch die intakte Membran lebender Spermien hingegen nicht permeieren können. Auf diese Weise ist eine einfache Unterscheidung möglich. Im Geflügelbereich wurden mit Hilfe der Eosin-Nigrosin-Färbung Vitalitätsraten von  $82,3 \pm 2,0$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) und  $89,6 \pm 1,3$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) bei Rassehuhnhybriden evaluiert (TABATABAEI U. A., 2009). In einer Studie an Großfalken wurden anhand von 25 Spermaproben acht verschiedene Supravitalfärbeprotokolle (Eosin B 2% + 3% Natriumzitat, Eosin B 2%, Eosin B-Nigrosin 5%, Eosin Y-Nigrosin 5%, Eosin Y-Nigrosin 10%, Eosin B-Anilin, Eosin Y-Anilin, Bromphenolblau-Nigrosin) evaluiert und miteinander verglichen (FISCHER U. A., 2013b). Die 2%ige Eosin B-

Lösung erwies sich hierbei am besten geeignet, um lebende von toten Spermien zu unterscheiden. Zudem korrelierte die Lebendrate bei der Färbung mit Eosin B 2% signifikant mit der Spermiengesamt- ( $r_s = 0,54$ ;  $p = 0,001$ ) und der -vorwärtsmotilität ( $r_s = 0,42$ ;  $p = 0,014$ ) (FISCHER U. A., 2013b). Auch bei der Evaluierung der Vitalität von Papageienspermien hat die Färbung mit Hilfe 2%iger Eosin B-Lösung bewährt. So konnten bei Nymphensittichen Spermienlebensraten von 85 % bis 94 % (STELZER, 2004), beziehungsweise von  $90 \pm 6,7$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) (FISCHER U. A., 2014b) evaluiert werden. Die mittels Eosin B untersuchte Vitalitätsrate von Wellensittichspermien lag in Untersuchungen von BEHNCKE (2002) zwischen 93 % und 97 %. Die Vitalitätsraten der mit 2%iger Eosin B-Lösung gefärbten Spermien verschiedener Gruppen von Papageienarten lagen zwischen 87,1 % und 95,9 % (LIERZ U. A., 2013). Vor allem im Zuge der computergestützten Spermieevaluation (CASA), aber auch zur manuellen Evaluierung wird weiterhin immer häufiger auf Fluoreszenzfarbstoffe zurückgegriffen (BISHOP UND SMILES, 1957; BAYYARI U. A., 1990; BILGILI UND RENDEN, 1984; GARNER UND JOHNSON, 1995), die eine schnelle und sichere Unterscheidung zwischen toten und lebenden Spermien ermöglichen. Bei der dualen Färbung mittels SYBR-14 und Propidiumjodid (PI) können die Fraktionen fehlerfrei unterschieden werden. Der membrangängige SYBR-14-Nukleinsäurefarbstoff markiert vitale Spermien mit leuchtend grüner Fluoreszenz, während die Nukleinsäuren von Spermien mit geschädigter Zellmembran durch das nicht membrangängige Propidiumjodid rot leuchten. Die mithilfe der Fluoreszenzfärbung bestimmte Überlebensrate von Nymphensittichspermien betrug in der Studie von FISCHER U. A. (2014c) im Mittel  $93,3 \pm 6,1$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ). Mit Hilfe der Fluoreszenzfärbung wurden Vitalitätsraten von  $51,8 \pm 18,7$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) bei promiskuitiv lebenden Wellensittichen und  $64,4 \pm 9,7$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) bei paarweise gehaltenen Wellensittichen evaluiert (GLORIA U. A., 2014).

#### **2.5.3.4 Spermienkonzentration und Spermiengesamtzahl**

Die Spermienkonzentration wird pro Volumeneinheit ( $\mu\text{l}$ ) über mikroskopische Zählverfahren mit Hilfe von Zählkammern (Neubauer, Neubauer improved, Bürker Türk, etc.) ermittelt. Die Spermiengesamtzahl ergibt sich aus der Multiplikation der Spermienkonzentration mit dem Ejakulatvolumen. Beide Parameter werden als

Indikatoren für die Fertilisationsrate betrachtet (ZINAMAN U. A., 2000). Für den Haushahn ermittelte Werte liegen bei  $6.600.000 \pm 530.000$  Spermien/ $\mu\text{l}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) (TABATABAEI U. A., 2009), für den Truthahn mit  $8.500.550$  Spermien/ $\mu\text{l}$  (KAMAR UND RIZIK, 1972) sogar noch höher. Auch beim Rosenköpfchen (*Agapornis roseicollis*) wurden hohe Werte von  $7.194.000 \pm 6.735.100$  Spermien/ $\mu\text{l}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) ermittelt (DOGLIERO, 2015). Geringfügig niedrige Spermienkonzentrationen ergaben sich beim Emu ( $2.900.000$  Spermien/ $\mu\text{l}$ ) (MALECKI UND MARTIN, 2000) und beim Wellensittich von  $3.723.300 \pm 92.900$  Spermien/ $\mu\text{l}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) (GLORIA U. A., 2014). Für Nymphensittiche werden im Mittel niedrigere Werte ( $305.300$  Spermien/ $\mu\text{l}$ ) angegeben (FISCHER U. A., 2014b), die vergleichbar mit den Werten von Mönchsittichen ( $346.600 \pm 64.600$  Spermien/ $\mu\text{l}$ ) (ANDERSON U. A., 2002) waren. In einer Studie an verschiedenen Gruppen von Großpapageien wurden für die Gruppen "Kakadus" ( $\bar{x} = 427.704/\mu\text{l}$  [ $c_{\text{sp}}$ ];  $\bar{x} = 5.183.354$  [SGZ]), "Amazonen" ( $\bar{x} = 77.532/\mu\text{l}$  [ $c_{\text{sp}}$ ];  $\bar{x} = 675.050$  [SGZ]), "Aras" ( $\bar{x} = 70.068/\mu\text{l}$  [ $c_{\text{sp}}$ ];  $\bar{x} = 435.750$  [SGZ]), "*Eclectus ssp.*" ( $\bar{x} = 3.781.285/\mu\text{l}$  [ $c_{\text{sp}}$ ];  $\bar{x} = 35.828.804$  [SGZ]), „Loris“ ( $\bar{x} = 1.534.965/\mu\text{l}$  [ $c_{\text{sp}}$ ];  $\bar{x} = 9.806.674$  [SGZ]) und „Andere“ ( $\bar{x} = 1.317.526/\mu\text{l}$  [ $c_{\text{sp}}$ ];  $\bar{x} = 5.318.745$  [SGZ]) unterschiedliche Werte ermittelt (LIERZ U. A., 2013). Im Vergleich dazu lagen die Werte aus Spermaproben von Spix-Aras ( $\bar{x} = 24.437,5/\mu\text{l}$  [ $c_{\text{sp}}$ ];  $\bar{x} = 237.887$  [SGZ]) deutlich darunter (FISCHER U. A., 2014a) (Tabelle 1).

### 2.5.3.5 Spermienmorphologie

Die Evaluation der Spermienmorphologie erfolgt an einem gefärbten Spermaausstrich, indem eine qualitative und quantitative Differenzierung normaler von morphologisch veränderten Spermien vorgenommen wird. Die Einteilung der pathomorphologischen Veränderungen erfolgt nach Angaben der WHO in Kategorien nach unterschiedlicher Priorität (WHO, 2010). Hierbei finden zuerst Kopfveränderungen, gefolgt von Hals- und Mittelstückveränderungen und Schwanzveränderungen Beachtung. Da der Anteil der lebenden, morphologisch unveränderten Spermien beim Haushuhn maßgeblich den Befruchtungserfolg bestimmt (BLESBOIS U. A., 2008), kann auch für andere Vogelspezies von diesem Einfluss ausgegangen werden. Zahlreiche morphologische Abweichungen besitzen einen negativen Einfluss auf die Spermengeschwindigkeit (LÜPOLD U. A., 2009). Eine detaillierte Beschreibung der Spermienanomalien des Ganters wurde durch MARVAN U. A. (1981) durchgeführt, wobei bis zu 30 % der Spermien morphologisch verändert waren.

---

Davon entfielen 77 bis 83 % auf Kopfveränderungen, 1 bis 2 % auf Akrosomveränderungen und 13 bis 16 % auf Veränderungen des Spermischwanzes. Bei der morphologischen Auswertung von Straußenspermien traten durchschnittlich 17 % (5 -26 %) morphologische Abweichungen auf (HEMBERGER U. A., 2001), Emuspermien wiesen hingegen im Mittel lediglich 3 % membranintakte, abnorme Spermien auf (MALECKI UND MARTIN, 2000). Bei der Evaluation von Spix-Ara-Spermien erschienen im Durchschnitt nur 26,5 % der Spermien normal (FISCHER U. A., 2014a). Bei den morphologisch veränderten Spermien traten die meisten Veränderungen am Kopf auf (50,2 %), gefolgt von der Schwanzregion (20,5 %), dem Akrosom (2 %), gefolgt vom Verbindungsstück (0,8 %) auf (FISCHER U. A., 2014a). Nymphensittichspermien stellten sich in der Untersuchung von STELZER (2004) in 66,3 % als Normospermatozoen dar, der Anteil der Veränderungen entfiel nur zu einem geringen Prozentsatz (1,5 %) auf Veränderungen, die weder Kopf noch Hals betrafen.

Tabelle 1: Vergleichende Mittelwerte (und Standardabweichungen) von Spermaparametern verschiedenen Vogelspezies aus unterschiedlichen Ordnungen

Ordnung	Gattung/ Gruppe	Volumen [μl]	pH	Osmo- lalität [mOsm/ kg]	c <sub>Sp</sub> [n/μl]	SGZ [N]	MOT [%]	PMOT [%]	Viabi- lität [%]	Literatur
Psittaci- formes	Nymphen- sittich ( <i>Nymphicus hollandicus</i> )	1,6	9	k.A.	1.050.000	1.470.000	k.A.	41,7	90	(STELZER, 2004)
	Wellen- sittich ( <i>Melo- psittacus undulatus</i> )	5,4 ± 1,2	8,4	329,9	3.723.300 ± 92.900	k.A.	68,7 ± 8,9	54,0 ± 15,9	64,4 ± 9,7	(GLORIA U. A., 2014) (BEHNCKE, 2002) (SAMOUR U. A., 1986)
	Mönchsittich ( <i>Myiopsitta monachus</i> )	2,0 ± 0,3	8,1 – 8,5	k.A.	346.600 ± 64.600	710.000 ± 1.600.000	k.A.	k.A.	k.A.	(ANDERSON U. A., 2002)
	Spix-Ara ( <i>Cyano- psitta spixii</i> )	6,9 ± 5,9	7,4 ± 0,4	k.A.	24.857 ± 23.509	183.429 ± 238.366	29,0 ± 11,0	16,0 ± 7,0	50,5 ± 20,5	(Fischer et al., 2014a)
	Königsama- zone ( <i>Amazona guildingii</i> )	5,9	k.A.	k.A.	21.252	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	(FISCHER U. A., 2013a)
	Rosenköpf- chen ( <i>Agapornis roseicollis</i> )	1,6 ± 0,6	k.A.	k.A.	7.194.000 ± 6.735.100	k.A.	48,4 ± 28,1	44,4 ± 26,3	k.A.	(DOGLIERO, 2015)
	Kakadus	12,4	7	k.A.	427.704	5.183.354	77,9	71,5	90,3	
	Aras	7,4	6,8	k.A.	70.068	435.750	75,8	70	87,1	
	Amazonen	8,5	7,3	k.A.	77.532	675.050	80	75	87,9	(LIERZ U. A., 2013)
	Edelpapa- geien	11,4	7	k.A.	3.781.285	35.828.80 4	87,3	82,3	94,6	
Loris	6,3	k.A.	k.A.	1.534.965	9.806.674	86,8	81,4	95,9		
Galli- formes	Haushahn ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	bis 3000	7,2	k.A.	6.600.000 ± 530.000	k.A.	78,0 ± 1,7	k.A.	82,3 ± 2,0	(BURROWS UND QUINN, 1935) (NISHI- YAMA, 1952) (TABATA- BAEI ET AL., 2009)
	Bronze- Truthahn ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	290	k.A.	k.A.	8.500.000	2.450.000 .000	k.A.	k.A.	83,2	(KAMAR UND RIZIK, 1972)
Anseri- formes	Spießente ( <i>Anas acuta</i> )	66,0 ± 14,1	8,5 ± 0,1	275 ± 8,2	5.700.000 ± 4.300.000	k.A.	57,4 ± 6,1	2,7 ± 0,2	k.A.	(PENFOLD U. A., 2001)
Accipitri- formes	Bengalgeier ( <i>Gyps bengalensis</i> )	340 ± 260	7,1 ± 0,2	k.A.	58.400 ± 33.200	k.A.	46,8 ± 16,5	k.A.	k.A.	(UMAPATHY U. A., 2005)
Struthio- niformes	Strauß ( <i>Struthio camelus</i> )	640 ± 220	7,3 ± 0,1	k.A.	16.400.000 ± 5.200.000	k.A.	78,0 ± 4,0	k.A.	80,0 ± 5,1	(HEM- BERGER U. A., 2001)

Spermienkonzentration (Csp); Spermiengesamtzahl (SGZ); Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT); keine Angabe (k. A.)

## 2.6 Spermakonservierung

Die zunehmende Nachfrage nach den Techniken der assistierten Reproduktion in Erhaltungszuchtprogrammen (BLANCO U. A., 2009) trug dazu bei, dass gezielte Untersuchungen zur geeigneten Spermakonservierung notwendig wurden (LAKE, 1960; VAN WAMBEKE, 1967; LAKE UND RAVIE, 1981). Die Möglichkeit der Verdünnung und Konservierung von Vogelspermien würde Zuchtprogramme von bedrohten Vogelarten vereinfachen, indem Sperma auch über weite Strecken hinweg transportiert werden könnte. Zudem wäre es möglich das Sperma von körperlich beeinträchtigten Männchen, die zu natürlicher Kopulation nicht mehr fähig sind, in den Genpool zu inkludieren, sowie die Aufteilung von Sperma genetisch wertvoller Männchen auf mehrere Weibchen, um so die genetische Information schneller in der Population zu verbreiten (LIERZ U. A., 2016).

### 2.6.1 Kurzzeitkonservierung

#### 2.6.1.1 Spermaverdünner

Bedingt durch die kleinen Volumina kommt es insbesondere bei Vogelsperma schnell zu einer Dehydratation (BLANCO U. A., 2009). Um dies und weitere schädliche Einflüsse, wie zum Beispiel Energieverlust oder das Auftreten toxischer Stoffwechselwechselprodukte, zu verhindern, muss das Sperma nach der Entnahme bis zur Verdünnung vor Temperatureinflüssen geschützt gelagert werden. Spermaverdünner sind gepufferte Elektrolytlösungen, die dazu dienen, die Spermienbefruchtungsfähigkeit über einen gewissen Zeitraum zu erhalten, indem sie die Plasmalemm stabilisieren, Energiesubstrate bereitstellen und schädliche Schwankungen von pH-Wert und Osmolalität verhindern (BILGILI U. A., 1987; SIUDZINSKA UND LUKASZEWICZ, 2008). Für Geflügelsperma wurde gezeigt, dass mit Hilfe eines geeigneten Verdünners eine Lagerung von Sperma bei Kühlschranktemperatur bis zu 24 Stunden möglich ist, ohne zu einer Beeinträchtigung der Vitalität oder Befruchtungsfähigkeit zu führen (VAN WAMBEKE, 1972; SEXTON, 1977, 1978a; LAKE UND RAVIE, 1979). Um den optimalen Erhalt der Spermienfunktionen zu gewährleisten, sollten pH-Wert und Osmolalität des Spermaverdünners möglichst identisch zu den Werten des Seminalplasmas der betreffenden Vogelart sein (SIUDZINSKA UND LUKASZEWICZ, 2008). Hahnensperma toleriert pH-Wertschwankungen zwischen 6,0 und 8,0 (VAN

WAMBEKE, 1967; BOGDONOFF UND SHAFFNER, 1954), wobei die besten Fertilisationsergebnisse in einem pH-Bereich von 6,8 bis 7,1 erzielt werden konnten (LAKE UND RAVIE, 1979). Die Befruchtungsfähigkeit bleibt hingegen in einem Osmolalitätsbereich zwischen 250 und 460 mOsm/kg erhalten, wobei die ideale Osmolalität mit 325 bis 350 mOsm/kg eng begrenzt ist (SEXTON UND FEWLASS, 1978). Beginnend mit den ersten Versuchen der Entwicklung eines synthetischen Verdünners für Spermien des Haushahns (LAKE, 1960), sind die Untersuchungen zur optimalen Spermaverdünnung bei den verschiedenen Vogelarten immer noch nicht abgeschlossen. Seit Entdeckung der Glutaminsäure als Hauptbestandteil des Vogelseminalplasmas (CHERMS, 1967; LAKE UND MCINDOE, 1959; LAKE U. A., 1958) wird diese in Verdünnern für aviäres Sperma eingesetzt. Viele gepufferte Salzlösungen können als Spermaverdünner genutzt werden, wovon einige mittlerweile kommerziell erhältlich sind (z.B. 6-Hour SemAid™, PHL Associates, Inc., Davis, CA, USA; Ovodyl™ Poultry Semen Extender, IMV International Corp., Maple Grove, MN, USA). Häufig genutzte Spermaverdünner bei Wirtschaftsgeflügel sind der Verdünner nach LAKE UND STEWART (1978) und der Beltsville-Poultry-Semen-Extender (BPSE) (SEXTON, 1977). Dem gegenüber steht die Herstellung eigener Spermaverdünner, die auf die individuellen Bedürfnisse der jeweils untersuchten Vogelspezies angepasst sind und spezifische Zusätze wie z.B. pasteurisierte Milch, Eiweiß, Eidotter oder Antibiotika enthalten können (SEXTON UND FEWLASS, 1978). BLANCO U. A. (2011) stellten einen positiven Einfluss von Betainhydrochlorid auf die Spermienviabilität und -motilität von Truthähnen durch Zugabe in den Verdünner fest, während die Spermaqualität von Kanadakranichen (*Grus canadensis*) durch die Zugabe von Adenosintriphosphat (ATP) verbessert wurde. Geflügelspermaverdünner dienen häufig als Basis zur Entwicklung von Verdünnern für nichtdomestizierte Vogelspezies. So diente der Verdünner nach LAKE UND STEWART (1978) (Lake-Verdünner) zur Spermaverdünnung von Blaukronenamazonen vor artifizieller Insemination (BROCK, 1991). SAMOUR U. A. (1988) ermittelte bei Wellensittchen eine Spermienmotilitätsrate von 89 % bei der Verwendung des Lake-Verdünners, verglichen mit 92 % unter der Verwendung von Biggers, Whitten und Whittinghams Medium. BEHNCKE (2002) untersuchte den Einfluss dreier Verdünnungsmedien (1%ige Ringer®-Glukose-Mischung, 5%ige Glukoselösung, Ringer®-Lösung) auf die Qualität und Halbwertszeit der Spermienbeweglichkeit von Wellensittchen. Hierzu wurden drei unterschiedliche Ejakulate von ( $V_{sp} = 1,6 \mu\text{l}$ ;  $2,3 \mu\text{l}$  und  $4,3 \mu\text{l}$ ) jeweils gedrittelt und auf

einen Objektträger gegeben. Zu jeder Spermaportion wurden 20 µl der auf 37 °C vorgewärmten Lösungen gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Unter 400facher Vergrößerung wurde nun die Spermienmotilität semiquantitativ ermittelt. Zudem wurde zusätzlich die Zeit ermittelt, nach der augenscheinlich nur noch die Hälfte der Spermien beweglich war (BEHNCKE, 2002). Bei der Auswertung erwies sich die 1%ige Ringer-Glukose-Mischung als am besten geeignet, da sie eine konstante Einzelbeweglichkeit der Spermien über einen Zeitraum von zwei Minuten garantierte. Im Vergleich dazu war die Einzelbeweglichkeit der Spermien bei Verwendung der Ringer®-Lösung deutlich geringer, jedoch über einen längeren Zeitraum (fünf Minuten) nachvollziehbar. Bei der 5%igen Glukoselösung bewegten sich die Spermien zwar schneller, jedoch ließ die Beweglichkeit in weniger als einer Minute stark nach (BEHNCKE, 2002). In einer ähnlich konzipierten Studie evaluierte STELZER (2004) den Einfluss sechs verschiedener Verdünnermedien (Ringer®-Lösung, 1%ige Glukoselösung, 5%ige Glukoselösung, Verdünner nach LAKE UND STEWART (1978), Verdünner nach SCHRAMM UND LÖHLE (1984), Verdünner nach BECHSTEDT U. A. (1974)) auf die Vorwärtsbeweglichkeit von Papageienspermien über einen Zeitraum von 120 Minuten. Die Spermaprobe wurde zu 30 µl des jeweiligen angewärmten Verdünnungsmediums gegeben, wovon 5 µl sofort auf einen angewärmten Objektträger gegeben und wiederum mit 10 µl des jeweiligen angewärmten Verdünnungsmediums vermischt wurden (STELZER, 2004). Unmittelbar danach wurde in 400facher Vergrößerung in drei verschiedenen Gesichtsfeldern die Vorwärtsbeweglichkeit eingeschätzt und davon der Mittelwert gebildet. Die verdünnte Spermaprobe wurde zwischen den Untersuchungszeitpunkten im Kühlschrank bei + 5 bis + 8 °C gelagert. Nach jeweils 10 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten wurden wiederholt 5 µl der Spermien suspension mit weiteren 10 µl des angewärmten Verdünners auf einem angewärmten Objektträger vermischt und unter dem Mikroskop beurteilt. Die Werte für die Vorwärtsbeweglichkeit wurden in folgende Intervalle eingeteilt:  $x = 0 \%$ ,  $0 \% < x \leq 10 \%$ ,  $10 \% < x \leq 25 \%$ ,  $25 < x \leq 50 \%$ ,  $50 \% < x \leq 75 \%$  und  $75 \% < x \leq 100 \%$ . Insgesamt wurden 14 Spermaproben von 7 verschiedenen Tieren (4 x Nymphensittich, 1 x Rosenköpfchen, 2 x Wellensittich) auf diese Weise untersucht. Bei allen untersuchten Proben jeder Vogelart zeigte sich, dass die besten Ergebnisse unter Verwendung der 1%igen Glukoselösung erzielt werden konnten. Bei den Nymphensittichen lag die Vorwärtsbeweglichkeit innerhalb der ersten 30 Minuten zwischen 40 % und 60 %. Nun

folgte ein linearer Abfall auf unter 10 % bis zum Ende der Messreihe nach 120 Minuten. Während der Verwendung von Ringer®-Lösung und 5%iger Glukose- Lösung lag die Vorwärtsbeweglichkeit anfangs zwischen 40 % und 50 %, dann fiel die Kurve der Ringer®-Lösung zügig steil ab, sodass schon nach 30 Minuten die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien unter 10 % fiel und nach 60 Minuten bei null lag. Die 5%ige Glukoselösung zeigte insgesamt einen flacheren Abfall, nach 60 Minuten war nur noch eine Vorwärtsbeweglichkeit von unter 10 % zu verzeichnen und nach 120 Minuten fand keinerlei Bewegung mehr statt. Bei Verwendung des Verdünners nach LAKE UND STEWART (1978) lag die Vorwärtsbeweglichkeit während der ersten 10 Minuten zwischen 10 % und 20 %. Nach 30 Minuten war diese bereits unter 10 % gefallen und sank dann flach über die nächsten 90 Minuten bis zu 0 % (STELZER, 2004). Bei den beiden Proben des Rosenköpfchens erzielte der Verdünner nach LAKE UND STEWART (1978) ähnlich gute Ergebnisse wie die 1%ige Glukoselösung, sodass bei beiden Verdünnern am Ende der Beobachtungszeit noch eine Beweglichkeit von ca. 30 % zu verzeichnen war (STELZER, 2004). Bei der Verdünnung des Wellensittichspermas begann die Vorwärtsbeweglichkeit bei 5%iger Glukoselösung bei 70 %, bei 1%iger Glukoselösung hingegen nur bei 50 %. Nach 120 Minuten Beobachtungszeit lag die progressive Motilität bei beiden verwendeten Lösungen bei ca. 25 %. Bei Verwendung des Verdünners von LAKE UND STEWART (1978) lag die Vorwärtsbeweglichkeit anfangs zwischen 50 und 60 %, fiel jedoch schon nach 10 Minuten rasch unter 20 % (STELZER, 2004). Die restlichen untersuchten Verdüner erzielten bei den Vogelspezies insgesamt schlechtere Ergebnisse. Weitere detaillierte Studien zu Spermaverdünnern bei Papageienspezies existieren in der aktuell verfügbaren Literatur hingegen nicht.

### **2.6.2 Langzeitkonservierung**

Die Kryokonservierung von Sperma ermöglicht durch Senkung aller Stoffwechselfvorgänge eine nahezu unbegrenzte Lagerungsdauer durch Tiefgefrieren in flüssigem Stickstoff (LN<sub>2</sub>) bei -196 °C (MAZUR, 1984). Sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin ist die Tiefgefrierung von Spermien ein etabliertes Verfahren. Bei den Haussäugetieren, vor allem beim Rind, ist der Einsatz von kryokonserviertem Sperma üblich; so wurden bereits im Jahr 1998 in Europa 61% der Kühe mit kryokonserviertem Sperma besamt (THIBIER UND WAGNER, 2001). Im aviären Bereich wurde die Kryokoservierung von Sperma bisher nur bei

zwölf Vogelspezies beschrieben. Aus der Ordnung der Greifvögel gelang die erfolgreiche Kryokonservierung von Spermien in Einzelfällen lediglich beim Wanderfalken (PARKS U. A., 1986; BLANCO U. A., 2002b) und beim Steinadler (KNOWLES-BROWN UND WISHART, 2001). GEE U. A. (1993) demonstrierten anhand einer Befruchtungsrate von 29 % und daraus resultierender Schlupfrate von 12,5 % nach artifizierter Insemination mit Tiefgefriersperma (TG-Sperma) des Buntfalken, dass die Techniken der Kryokonservierung und der AI auf dem Gebiet der Reproduktionsmedizin bei Vögeln bei weitem nicht hinreichend erforscht sind. PARKS U. A. (1986) erzielten nach AI mit TG-Sperma von Wanderfalken eine ähnliche Befruchtungsrate (33,3 %; 2/6 Eiern). Weitere Vogelspezies, deren Sperma erfolgreich kryokonserviert wurde, sind die Kragentrappe (*Chlamydotis undulata*) (HARTLEY U. A., 1999), der Kanadakranich (GEE U. A., 1985), die Kanadagans (GEE UND SEXTON, 1990), der Himalaya-Glanzfasan (*Lophophorus impejanus*) (DURRANT UND BURCH, 1991), der Silberfasan (*Lophura nycthemera*) und der Edwardsfasan (*Lophura edwardsi*) (ROSE, 1996), der Königspinguin (*Aptenodytes patagonicus*) (O'BRIEN UND ROBECK, 2014) und der Magellan-Pinguin (O'BRIEN U. A., 1999). Aus der Ordnung der Psittaziden gelang die Kryokonservierung von Spermien bislang einzig beim Wellensittich. SAMOUR U. A. (1988) erzielten durch AI mit TG-Sperma eine Befruchtungsrate von 66,6 % (16/24), aus den Eiern schlüpften insgesamt 12 Wellensittichküken. Die mitunter dürftigen Ergebnisse der Versuche der Kryokonservierung von Vogelsperma lassen sich womöglich durch die spezielle Anatomie der Vogelspermatozoen im Vergleich zu Säugetierspermien erklären. Durch den langgestreckten, sehr schmalen Kopf und das geringe Zytoplasmavolumen können Kryoprotektiva nur ungenügend in den Spermienkopf eindringen und zusätzlich zeigt sich der längere Spermienchwanz empfindlicher für Tiefgefrierschäden (DONOGHUE UND WISHART, 2000; HAMMERSTEDT UND GRAHAM, 1992). Die Befruchtungsraten in der Kryokonservierung aviärer Spermien liegen vergleichsweise niedrig zu den routinemäßig erzielten Raten bei Rindern (*Bos primigenius taurus*) (ca. 65 %) (JANUSKAUSKAS U. A., 1999). Die Gründe für diese Diskrepanz liegen zum einen in der höheren Sensitivität gegenüber den Einfrier- und Auftauprozessen. Des Weiteren wird auch eine, durch die Spermienzusätze bedingte, veränderte Funktionalität der Spermienaufbewahrung und des Spermientransportes im weiblichen Tier angenommen (DONOGHUE UND WISHART, 2000). Von BAKST U. A. (1994) ist bekannt, dass selbst von intravaginal inseminiertem Frischsperma nur ca. 1 – 2 % der Spermien die Uterovaginaldrüsen erreichen, wo sie für mehrere Wochen

gespeichert werden können, bevor sie zum *Infundibulum* weiterwandern. Bei einer solch ausgeprägten intravaginalen Selektion müssen die inseminierten Spermien eine hohe Ausgangsqualität aufweisen, um überhaupt zu einer erfolgreichen Befruchtung fähig zu sein, besonders da die Spermienqualität durch den Einfrier- und Auftauprozess erheblich beeinträchtigt wird (CEROLINI U. A., 2001).

### **2.6.2.1 Grundlagen der Kryokonservierung und Gefrierschäden**

Bei -196 °C ist der einzig bestehende physikalische Zustand kristallin oder glasartig und es laufen keinerlei thermodynamische Reaktionen mehr ab. Jedoch beeinflusst das Überleben der Zelle nicht die Verweildauer in diesem tiefen Temperaturbereich, sondern die zweimalige drastische Temperaturveränderung, der die Zelle beim Tiefgefrieren und beim Auftauen ausgesetzt wird. Die meisten Schäden entstehen dabei in einem kritischen Zwischenbereich von -15 °C bis -60 °C (MAZUR, 1984). Für die Entstehung eines Hauptteils der Gefrierschäden kommen im Wesentlichen zwei Ursachen in Betracht. Zum einen ist es die intrazelluläre Eiskristallbildung, zum anderen betrifft es andere Lösungseffekte, die während der Temperaturveränderung auftreten. Deren Auswirkungen werden maßgeblich von der Kühlrate beeinflusst und werden im Folgenden näher beleuchtet.

#### **2.6.2.1.1 Kälteschock „cold shock“**

Bei der Abkühlung von +15 °C auf +1 °C erfahren die Spermien einen Stress, der als „Kälteschock“ bezeichnet wird (MORRIS, 1987). Hinsichtlich der Kälteschocksensibilität der Spermien bestehen jedoch tierartige und individuelle Unterschiede. So reagieren Spermien des Ebers (*Sus scrofa domesticus*) extrem empfindlich auf Temperaturveränderungen, während Geflügelspermien eine vergleichsweise hohe Kälteresistenz besitzen. Durch die Abkühlung kommt es zu einer Formveränderung der in der Plasmamembran enthaltenen Phospholipide, wobei eine Streckung der Fettsäureketten auftritt, die eine Zusammenballung der Phospholipide bedingt. Die Moleküle der Membran können sich folglich nicht mehr frei bewegen und es kommt zu einer erhöhten Membranpermeabilität und dem Verlust metabolischer Funktionen (CROWE U. A., 1989; DROBNIS U. A., 1993; PARKS UND LYNCH, 1992). Die Membran wird durch die Kälteschockwirkung durchlässig für Substanzen, wie z. B. Sukrose, Natrium, Kalium,

welche sonst nicht passieren können (DAW ET AL., 1973; QUINN AND WHITE, 1966; WATSON AND PLUMMER, 1985). Mit sinkender Temperatur kommt es ebenfalls zu einem Absinken der Spermienmotilität bis hin zur Unbeweglichkeit aller Spermien. Dies ergibt sich aus dem Energieverlust einerseits, die Zunahme der Membranpermeabilität und den Verlust intrazellulärer Moleküle und Ionen andererseits (MAZUR, 1984). Die Membranschäden des Spermienkopfes betreffen zuerst die Plasmamembran und danach die Akrosommembran (WATSON U. A., 1987). Durch den Kälteschock wird auch die Aktivität verschiedener Enzyme herabgesetzt, wodurch die Glykolyse, die Fruktolyse und die Atmungsaktivität der Spermatozoen reduziert werden. Des Weiteren führt die Temperatursenkung zu einer Verringerung der ATP-Produktion (QUINN, 1985), was eine Effizienzminderung der ATP-abhängigen membranständigen Pumpen bedingt. Deren Funktion ist für die Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts jedoch von großer Bedeutung, weshalb es zu einer Verschiebung der Ionenverhältnisse und folglich zur Depolarisation der Plasmamembran kommt. Die Depolarisation führt wiederum zur Öffnung ladungsgesteuerter Kalziumkanäle und somit zu einem Kalziumeinstrom und Kalziumakkumulation im Inneren des Spermiums (QUINN UND WHITE, 1966). Bedingt durch die erhöhte Kalziumkonzentration im Zytosol werden Phospholipasen und Proteasen aktiviert und Membrankomponenten infolgedessen hydrolysiert (GRAHAM U. A., 1990). Insgesamt wird eine gravierende Erhöhung der Membranpermeabilität ausgelöst, die bis zum Tod der Zelle führen kann.

#### **2.6.2.1.2 Intrazelluläre Eiskristallbildung**

Im Temperaturbereich bis  $-5\text{ °C}$  bleiben intra- und extrazelluläres Wasser ungefroren. Im Bereich zwischen  $-5\text{ °C}$  und  $-10\text{ °C}$  beginnt extrazellulär eine Eiskristallbildung, während das intrazelluläre Wasser weiterhin ungefroren bleibt (Abbildung 8; Mitte). Durch diese Ungleichheit in beiden Kompartimenten entsteht ein osmotischer Druckgradient, dem folgend das Wasser aus der Zelle hinaus in den Extrazellulärraum strömt (MAZUR, 1984). Die Temperaturspanne zwischen  $-15\text{ °C}$  bis  $-60\text{ °C}$  wird von MAZUR (1984) als „kritischer Bereich“ bezeichnet, da dort vermehrt Wärme- und Wassertransporte zwischen dem Intra- und dem Extrazellulärraum auftreten, die zur irreparablen Schädigung der Zellmembran und somit zum Tod des Spermiums führen können. Die auftretenden Schäden werden hierbei maßgeblich durch die Kühlrate bestimmt. Wenn die Kühlrate

langsam genug gewählt wird, ist das Spermium in der Lage intrazelluläres Wasser schnell genug durch Exosmose zu verlieren, um die intrazellulären gelösten Substanzen zu konzentrieren und somit einer Unterkühlung entgegenzuwirken. Auf diese Weise wird das chemische Potential des intrazellulären Wassers mit dem des extrazellulären Wassers im Gleichgewicht gehalten. Als Ergebnis findet statt der schädlichen intrazellulären Eiskristallbildung eine reversible Dehydratation der Zelle statt (Abbildung 8, rechts oben).

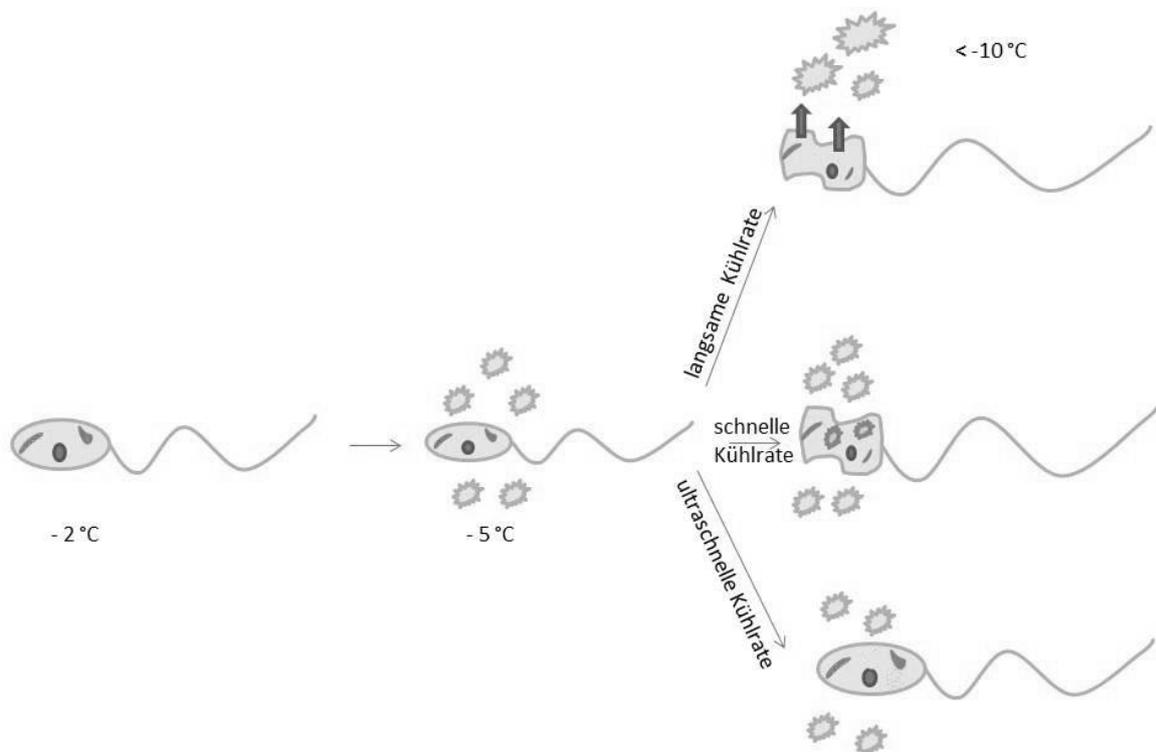


Abbildung 8: Physikalische Vorgänge beim Gefrierprozess nach MAZUR (1984)

rechts oben: reversible Dehydratation der Zelle durch langsame Kühlung; rechts mittig: intrazelluläre Eiskristallbildung bei schneller Kühlung; rechts unten: Ausbleiben der intrazellulären Eiskristallbildung durch Vitrifikation

Werden die Spermien jedoch einer zu schnellen Kühlrate ausgesetzt, sind sie nicht in der Lage schnell genug zu dehydrieren, um ein osmotisches Gleichgewicht zwischen Intra- und Extrazellulärraum herzustellen, in dessen Folge die Zellen unterkühlen und eine intrazelluläre Eiskristallbildung stattfindet (Abbildung 8, rechts mittig). Bei ultraschnellen

Kühlraten von mehr als 10.000 °C/min, die bei der Methode der Vitrifikation Verwendung finden, kommt es hingegen zu einem Ausbleiben der letalen intrazellulären Eiskristallbildung (Abbildung 8, rechts unten), indem die intrazelluläre Flüssigkeit in einen glasähnlichen Zustand überführt wird (RALL UND FAHY, 1985). Die intrazelluläre Eiskristallbildung ist als Letalfaktor bei der Zellgefrierung einzustufen. Zusätzlich zum Spermienkopf und -akrosom erfährt auch der Spermischwanz Schäden durch physikalische Störungen, die durch Eiskristalle verursacht werden. So können der Verlust mitochondrialer Enzyme und eine Verzerrung des axialen Filamentkomplexes hervorgerufen werden, die nachfolgend zum Motilitätsverlust führen (PONTBRIAND U. A., 1989).

### 2.6.2.2 Kryoprotektiva

Kryoprotektiva stabilisieren die Zellmembranen, verringern die Eiskristallbildung und minimieren den Einfluss hoher Elektrolytkonzentrationen durch die Bindung von Wassermolekülen. Durch den Einfriervorgang und hohe extrazelluläre Salzkonzentrationen kann es zu einem Stabilitätsverlust der Zellmembran oder einer Denaturierung der intrazellulären Proteine kommen, die mit einem Weiterleben der Zelle nicht vereinbar sind (CROWE U. A., 1984). Um das Tiefgefrieren und ein Überleben der Zellen bei einer Temperatur von -196 °C zu sichern, ist der Einsatz von Gefrierschutzmitteln daher essentiell. Vor über 60 Jahren wurden die kryoprotektiven Eigenschaften von Glycerin beim Tiefgefrieren von Hahnensperma entdeckt (POLGE U. A., 1949), was die Techniken der Spermakonservierung revolutionierte.

Die heutzutage verwandten protektiven Substanzen werden in penetrierende, also in die Spermien hineindringende, und nicht penetrierende, demzufolge im Extrazellulärraum verbleibende Stoffe, eingeteilt (DOEBBLER, 1966; MERYMAN, 1971; MCGANN, 1978). Als penetrierende Kryoprotektiva finden Stoffe wie Glycerin, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylacetamid (DMA), Ethylenglycol, Propandiol, Ethanol und andere Alkohole Verwendung. Aufgrund der Membrandurchlässigkeit für das Kryoprotektivum erfolgt eine Äquilibration zwischen dem beim Kühlprozess aus der Zelle ausströmenden Wasser und dem einströmenden Kryoprotektivum. Somit wird die Schrumpfung der Zelle verhindert (MAZUR, 1984). Die nicht penetrierenden Kryoprotektiva gehören zu den Gruppen der

Monosaccharide (Galaktose, Glukose, Fruktose), den Disacchariden (Laktose, Trehalose, Saccharose) oder den Lactamen (Methylpyrrolidon) (WISHART, 1995). Ihre Wirkungsweise ist derer der nicht penetrierenden Stoffe konträr. Sie beruht darauf, dass diese Kälteschutzmittel den Anstieg der extrazellulären Ionenkonzentration verzögern und somit den Wasseraustritt aus der Zelle vermindern. Damit wird der Dehydratation der Zelle und den entsprechenden Folgeschäden entgegengewirkt (MCGANN, 1978).

Trotz der schützenden Eigenschaften der kryoprotektiven Substanzen darf deren konzentrationsabhängige, toxische Wirkung auf die Spermien nicht außer Acht gelassen werden. FAHY (1986) nennt zwei Hauptgründe, weshalb die Toxizität eine relevante Rolle in der Kryobiologie spielt. Zum einen limitiert die Toxizität die einsetzbare Konzentration des jeweiligen Kryoprotektivums und somit auch dessen schützende Eigenschaften, zum Anderen besitzt jedes Kryoprotektivum auch direkte schädliche Einflüsse auf die einzufrierenden Zellen und muss daher individuell für die jeweilige Tierart und Zellart evaluiert werden. Die toxischen Eigenschaft von DMSO wurden von MERYMAN (1967) erstmals beim Einfrieren menschlicher Erythrozyten als proportional ansteigende Hämolyse bei steigender Konzentration von DMSO entdeckt. Diese toxischen Eigenschaften wurden für Methanol, Ethanol, Dimethylformamid und Diethylenglykol bereits in geringen Konzentrationen bestätigt, wohingegen sie bei Glycerin (10 mol/l), Ammoniumazetat (6 mol/l) und Ethylenglykol (8 mol/l) erst ab wesentlich höheren Konzentrationen auftraten (MERYMAN, 1971). Nichtsdestotrotz besitzt auch Glycerin spermenschädigende Eigenschaften. So ist das Glycerinmolekül sehr viel größer als das Wassermolekül und penetriert die Plasmamembran langsamer als Wasser (GAO U. A., 1995). Während Glycerin also in die Zelle ein- oder ausdringt, wird diese einem massiven osmotischen Stress ausgesetzt, der zu einer Schädigung der Plasmamembran führen kann (HAMMERSTEDT UND GRAHAM, 1992). Kryoprotektiva geringerer Größe, die folglich die Plasmamembran schneller permeieren führen zu weniger osmotischem Stress (PURDY U. A., 2009; SASAKI U. A., 2010).

In einem Vergleich des Einflusses von Glycerin, DMA und DMSO auf den Anteil lebender, morphologisch normaler Haushahnspermien hatte jedoch DMSO, trotz der geringsten Molekülgröße, den schädlichsten Einfluss (22 – 26 %). DMA hatte vergleichsweise höhere Werte (62 – 68 %), die besten Ergebnisse wurden jedoch mit Glycerin erzielt (72 – 76 %)

(TSELUTIN U. A., 1999). Obwohl Haushahnspermien, die mit einem glyzerinhaltigen Kryoverdünner versetzt wurden, eine ähnliche Motilität und Viabilität wie unverdünnte Spermien besaßen, war die Befruchtungsfähigkeit deutlich herabgesetzt. Dies wird durch einen kontrazeptiven Effekt bedingt (SMITH UND POLGE, 1950; HAMMERSTEDT UND GRAHAM, 1992), der möglicherweise auf eine Behinderung des Spermientransportes im Eileiter zurückzuführen ist (ABOUELEZZ U. A., 2015a). Aus diesem Grund sollte Glycerin vor einer artifiziellen Insemination entfernt, beziehungsweise auf eine Konzentration  $< 0,1$  M abgesenkt werden (LAKE, 1986; SEXTON, 1973, 1975). Die Entfernung kann durch Verdünnung und nachfolgender Zentrifugation, mehrfache, serielle Verdünnung, oder Dialyse erreicht werden (LONG UND KULKARNI, 2004). SAMOUR U. A. (1988) nutzten zur Kryokonservierung von Wellensittichspermien Glycerin als Kryoprotektivum, welches vor der artifiziellen Insemination durch Dialyse entfernt wurde. Sie erzielten so eine Fertilisationsrate von 66,6 %. Bei Kanadakraanichen wurden die höchsten Fertilisationsraten nach AI mit TG-Sperma, wenn dieses mit 10%igem DMSO eingefroren wurde ( $\bar{x} \pm SD = 73,9 \pm 20,4$  %), im Vergleich dazu lagen die Fertilisationsraten von 18 %igem DMA ( $\bar{x} \pm SD = 57,7 \pm 14,4$  %) und 26%igem DMA ( $\bar{x} \pm SD = 41,7 \pm 12,9$  %) deutlich niedriger (BLANCO U. A., 2012). Bei der Kryokonservierung der Spermien von Magellan-Pinguinen mit Hilfe von 16%igem DMSO oder 16%igem Ethylenglykol wurde kein statistischer Unterschied hinsichtlich Motilität, Viabilität und Morphologie zwischen den Kryoprotektiva ermittelt (O'BRIEN U. A., 1999). BAKST UND SEXTON (1979) führten eine elektronenmikroskopische Untersuchung der morphologischen Schäden von Haushahn- und Truthahnspermien nach Kryokonservierung mit DMSO durch. Hierbei zeigte sich, dass bei beiden Spezies 60 – 70 % der Spermien nach dem Auftauen eine defekte Plasmamembran aufwiesen, von denen wiederum 25 % der Köpfe und Hälse gekrümmt erschienen und bei 75 % geschwollene Mitochondrien sichtbar waren. In einer weiteren Untersuchung zum Einfluss verschiedener Kryoprotektiva (Glycerin, Methylformamid, DMSO, Ethylenglykol) auf die Spermienmorphologie von Haushähnen traten die meisten Anomalien bei der Verwendung von DMSO auf. In allen Proben traten hauptsächlich gekrümmte Spermien mit verändertem Mittelstück auf. Interessanterweise war ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Kryoprotektiva jedoch erst nach dem Einfrierprozess zu verzeichnen (MAEDA U. A., 1984).

### 2.6.2.3 Kühlraten

#### 2.6.2.3.1 Schnelle Kühlraten

Abgesehen von der Verwendung geeigneter Kryoprotektiva sind die einzusetzenden Kühl- und Auftaugeschwindigkeiten speziesspezifisch unterschiedlich und von der Größe der einzufrierenden Zellen abhängig. Das anhand von Haushähnen entwickelte Protokoll zur Kryokonservierung von Spermien sah nach der Verdünnung eine Abkühlung auf +5 °C vor, indem die Probe über Eis gelagert wurde (MAZUR, 1984). Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe des Kryoprotektivums und eine ausreichend lange Äquilibrationsphase, um die Penetration des Kryoprotektivums ins Innere der Zelle zu ermöglichen (HAMMERSTEDT U. A., 1990; AMANN UND PICKETT, 1987). Eine optimale Befruchtungsfähigkeit der Spermien wurde von SEXTON (1980) erreicht, wenn die Spermaproben von +5 °C auf -20 °C mit einer Rate von 1 °C/min gekühlt wurden, dann in Stickstoffdampf mit einer Rate von 30 °C/min auf -80 °C gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff versenkt wurden. Eine genaue Evaluation der Gefrierate ist bei dieser Methode jedoch schwierig. Vielmehr hängt die Kühlrate vom Volumen der Spermaprobe, dem Durchmesser der Pailletten, sowie ihrem Abstand zur Oberfläche des flüssigen Stickstoffs ab. Bei einem Abstand von 5 cm wird das Kühlgut mit einer Geschwindigkeit von etwa 60 °C/min eingefroren (HEITLAND U. A., 1996). Eine weitere Methode zur schnellen Kühlung besteht in der Methode des „direct plunging“, indem die mit Spermalösung gefüllten Gefäße (Cryovials, Pailletten, etc.) oder aber als Pellet direkt in flüssigen Stickstoff überführt werden, ohne dass eine vorangegangene Lagerung im Dampf stattgefunden hat. Auf diese Weise werden sehr hohe Kühlraten erzielt, mit denen Fertilisationsraten von bis zu 92,7 % bei Legehennen erreicht werden konnten (TSELUTIN U. A., 1999). Die Methode der Vitrifikation, die erstmalig von LUYET UND HODAPP (1938) anhand von Froschspermien entwickelt wurde, beruht auf einem ähnlichen Prinzip. Durch das Überführen sehr kleiner Volumina in flüssigen Stickstoff werden ultraschnelle Kühlraten von mehr als 10.000 °C/min erreicht, was in Kombination mit einer hohen Konzentration an Kryoprotektiva (30 – 50 %) zu einem Ausbleiben der letalen intrazellulären Eiskristallbildung führt und stattdessen in einer glasähnlichen Erstarrung der Zellflüssigkeit resultiert (RALL UND FAHY, 1985). Da solche hohen Konzentrationen an Kryoprotektiva jedoch ihrerseits toxische bis letale Wirkung auf die relativ kleinen Spermatozoon besitzen, wird diese Methode vorwiegend für die sehr

viel größeren Oozyten und Embryonen genutzt (VAJTA U. A., 1998; COBO U. A., 2008; SARAGUSTY UND ARAV, 2011). Bei der Kryokonservierung humaner Spermien gelang es jedoch, Motilitätsraten von  $49,5 \pm 12,5$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) nach Vitrifikation ohne Kryoprotektiva, im Vergleich zu  $37,9 \pm 14,4$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) nach konventionellem Tiefgefrieren zu erreichen (NAWROTH U. A., 2002). Ähnliche Versuche mit Sperma von Hasenartigen (*Leporidae*), Ratten (*Rattus* sp.), Mäusen (*Mus* sp.), Meerschweinchen (*Caviidae*) und Bullen schlugen jedoch fehl und resultierten in Motilitäts- und Viabilitätsraten nahe 0 % (HOAGLAND UND PINCUS, 1942). Beim Vogel existieren in der gegenwärtig verfügbaren Literatur keine entsprechenden Untersuchungen.

#### **2.6.2.3.2 Langsame Kühlraten**

LAKE U. A. (1981) und LAKE UND RAVIE (1985) erzielten Fertilisationsraten von über 90 % nach AI mit kryokonserviertem Hahnensperma, welches mit Hilfe eines programmierbaren Minieinfrierautomaten (Type R202/200 R Planer Products Ltd, Sunbury, England) eingefroren wurde. Auf diese Weise war es möglich die Proben mit einer konstanten Rate von 1 °C/min bis zu einer Temperatur von -35 °C abzukühlen, wo eine Äquilibrationsphase von 5 Minuten eingehalten wurde, bevor eine schnellere Abkühlung auf -196 °C erfolgte. Langsame Kühlraten werden erst durch den Gebrauch dieser programmierbaren Einfrierautomaten zuverlässig erreicht, was zusammen mit dem Einsatz von Kryoprotektiva das spermenschädliche Phänomen des Kälteschocks minimieren bzw. sogar umgehen kann. Im Inneren des Einfrierautomaten werden die Spermproben horizontal auf Metallrosten gelagert. Entsprechend der in der Gefrierkammer gemessenen Temperatur wird der flüssige Stickstoff aus einem Druckbehälter als Dampf in die Gefrierkammer geleitet. Der zerstäubte Stickstoff wird über einen Turbinenventilator gleichmäßig in der Gefrierkammer verteilt, wobei die Kristallisation spontan in Form eines Massenseedings abläuft. Nach Erreichen der Endtemperatur wird das Gefriergut in flüssigem Stickstoff gelagert (ZIRKLER, 2005). BELLAGAMBA U. A. (1993) geben als Einfrierrate von Geflügelspermien eine Kühlrate von 1 - 10 °C/min und eine Auftaurate von 50 – 70 °C/min an. In einer Studie von BLANCO U. A. (2000) zeigte sich, dass die Spermien von Truthähnen, Steinadlern, Habichtsadlern (*Hiernaetus fasciatus*) und Wanderfalken durch schnelle Kühlraten von ca. 50 °C/min irreparabel geschädigt wurden, wohingegen eine langsamere Kühlrate von 1 °C/min (von

+4 °C bis -20 °C), gefolgt von 2 °C/min (von -20 °C bis -70 °C) in signifikant höheren Viabilitätsraten resultierte. Lediglich die Spermiviabilität von Haushähnen und Kaiseradlern (*Aquila adalberti*) war nach schnellen Kühlraten von ca. 50 °C/min signifikant höher ( $20 \pm 4 \%$  und  $64 \pm 6 \%$ ) als bei langsamer Gefriertrate ( $4 \pm 1 \%$  und  $20 \pm 3 \%$ ). Unter Verwendung der schnellen Gefriertrate ergab sich bei beiden Spezies eine progressiv steigende Spermivitalität bei steigender DMA-Konzentration (BLANCO U. A., 2000). Das Gegenteil war unter Verwendung der langsamen Kühlrate bei den Spermien des Kaiseradlers der Fall. Hier kam es unter steigender DMA-Konzentration zu einer Reduktion der Spermivitalität (BLANCO U. A., 2000). Die Unterschiede in der Überlebensfähigkeit der Spermien des Kaiseradlers können demnach nicht auf die Verträglichkeit des Kryoprotektivums, sondern tatsächlich auf die Einfriergeschwindigkeit zurückgeführt werden. In einem weiteren vergleichenden Versuch an Sperma von Haushähnen ließen sich mit Hilfe konventionell, das heißt mit Hilfe eines Einfrierautomaten, gefrorenen Spermas Befruchtungsraten von 49,3 % erzielen, wohingegen schnell gekühltes Sperma lediglich eine Befruchtungsrate von 11,5 % erreichte (EHLING U. A., 2012). Das langsame Einfrieren erfolgte hierbei in einem Einfrierautomaten in zwei Schritten. Von 0 °C bis -35 °C fiel die Temperatur um 3 °C/min und von -35 °C bis -130 °C um 50 °C/min. Beim schnellen Einfrieren wurden die Proben in einer Styroporkiste im Stickstoffdampf 4 bis 4,5 cm über dem flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Einfriertrate betrug -40 °C/min.

#### 2.6.2.4 Auftauraten

Bei hohen Gefriergeschwindigkeiten kommt es zur Bildung kleinster intrazellulärer Eiskristalle, die thermodynamisch sehr instabil sind und beim Auftauen zur Aggregation und zur Bildung größerer Kristalle neigen. Dieses Phänomen der sogenannten „Rekristallisation“ tritt insbesondere bei gegensätzlichen Einfrier- und Auftauraten (schnelles Einfrieren & langsames Auftauen / langsames Einfrieren & schnelles Auftauen) auf. Die Rekristallisation verursacht jedoch massive Zellschäden (MAZUR, 1984). Die optimale Auftaurate ist daher abhängig von der eingesetzten Gefriertrate und kann eine Minimierung der durch Rekristallisation aufgetretenen Schäden bewirken (HAMMERSTEDT U. A., 1990). Bei einer schnellen Gefriertrate sollte auch eine schnelle Auftaurate gewählt werden. Bei einer langsamen Gefriertrate ist hingegen auch eine langsame Auftaurate

empfehlenswert. Humane Spermien werden in der Regel im Warmwasserbad bei 37 °C aufgetaut (NAWROTH U. A., 2002; ISACHENKO U. A., 2005), während bei Säugetierspermien vereinzelt noch höhere Temperaturen (70 °C) zum Einsatz kommen (SÖDERQUIST U. A., 1997). Das Auftauen von tiefgefrorenem Vogelsperma wird hingegen normalerweise zwischen +2 und +5 °C vorgenommen (BAKST UND SEXTON, 1979; BLANCO U. A., 2011; EHLING U. A., 2012), wobei von manchen Autoren auch Wasserbäder von +37 °C zum Erreichen schnellerer Auftauraten genutzt werden (MAEDA U. A., 1984; SAMOUR U. A., 1988; O'BRIEN UND ROBECK, 2014). SEXTON (1980) taute Spermproben von Haushähnen frühestens 24 Stunden nach einer schnellen Einfriermethode bei +2 °C in einem Eiswasserbad auf. In einer anschließenden AI ergab sich eine Befruchtungsrate von 47 %. In einer Studie von TSELUTIN U. A. (1999) wurden tiefgefrorene Spermproben von Haushähnen zum einen durch Überführen der Straws in ein +5 °C Wasserbad aufgetaut. Zum anderen wurden Spermproben in Pelletform auf 60 °C heißen Thermoplaten aufgetaut. Bei einem anschließenden Fertilisationsversuch ergaben sich die höchsten Fertilisationsraten bei Verwendung der Pelletsuspension (schnelles Einfrieren/schnelles Auftauen). Ob jedoch der Auftauprozess maßgeblich daran beteiligt war, lässt sich schwer nachvollziehen, da die Sperm pellets nicht vergleichend im Wasserbad aufgetaut wurden. Nach einer moderaten Einfrierrate von 5 °C/min untersuchten BLANCO U. A. (2012) den Einfluss zweier verschiedener Auftauraten (moderat: 12,8 °C/min; langsam: 6,3 °C/min) auf die Viabilität und Motilität von Kanadakranich- und Truthahnspermien, stellten hierbei jedoch keinen signifikanten Unterschied fest. Die angestrebten Auftaugeschwindigkeiten sollten sich demnach an den, für die jeweilige Spezies geeigneten, Einfrierraten orientieren. Hier scheint die Empfindlichkeit der Spermienmembran eine wichtige Rolle zu spielen, die jedoch von Art zu Art unterschiedlich ist. BLANCO U. A. (2000) vermuten eine höhere Widerstandsfähigkeit von Haushahn- und Kaiseradlerspermien, da diese schnelle Einfrierraten im Gegensatz zu den anderen untersuchten Spezies (Truthahn, Steinadler, Habichtsadler und Wanderfalke) besser tolerierten. Letztendlich sollten die geeigneten Einfrier- und Auftauraten experimentell evaluiert werden, wobei die Ausgangswerte der jeweiligen Raten von phylogenetisch verwandten Spezies übernommen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem ersten Schritt ein für Nymphensittichsperma geeigneter Spermaverdünner evaluiert, indem drei verschiedene, bereits bei mehreren Vogelspezies verwendete Verdünner miteinander verglichen wurden. Nachfolgend wurde ein geeignetes Kryoprotektivum zur Langzeitkonservierung von Nymphensittichsperma evaluiert, wobei die Zytotoxizität der Kryoprotektiva im Fokus stand. In einem dritten Schritt wurde der Einfluss der Kühlrate auf die Spermienqualität im Kryokonservierungsprozess untersucht, indem die langsame, schnelle und ultraschnelle Kühlung im Vergleich durchgeführt wurde. Das auf diese Weise entwickelte Protokoll wurde abschließend hinsichtlich der Befruchtungsfähigkeit der Spermien überprüft. Hierzu diente ein In-vivo-Fertilisationsversuch, um so die praktische Anwendbarkeit anhand tatsächlich befruchteter Eier zu bestätigen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Nymphensittiche und Unterbringung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nymphensittiche als Modelltiere ausgewählt, da sie aufgrund ihrer geringen Größe und der Geselligkeit leicht zu halten sind. Zudem reproduzieren sie auch in Menschenobhut nahezu ganzjährig zuverlässig, was einen möglichst ausgedehnten Untersuchungszeitraum garantierte. Überdies lagen für diese Spezies bereits Orientierungsdaten für Spermaparameter zum Vergleich der Daten vor und die Techniken der assistierten Reproduktion wurden bereits im Vorfeld der Studie an Papageien dieser Spezies erfolgreich durchgeführt.

Aus dem Nymphensittichbestand der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden 70 Versuchstiere ausgewählt und klinisch untersucht. Alle Vögel waren erfahrene Zuchtvögel, die in den vorherigen Zuchtsaisons bereits erfolgreich Nachwuchs produziert hatten. Ein Body Condition Score (BCS) von 3 bis 4 auf einer Skala von 1 bis 5 (1: sehr schlechte Kondition; 5: adipös), sowie die Freiheit von verschiedenen Infektionserregern (*Chlamydia* sp., *Candida* sp., Parrot Bornavirus, Aviäres Polyomavirus, Psittacines Circovirus, Paramyxovirus 1 & 3, Endo- und Ektoparasiten) waren Bedingung für die Aufnahme in die Studie. Die Nymphensittiche wurden zur eindeutigen Identifizierung mit farblich unterschiedlichen und fortlaufend nummerierten Fußringen markiert. Die Unterbringung erfolgte in separaten Volieren, bei denen der Außenbereich überdacht und somit vor Witterungseinflüssen geschützt war. Die Temperatur im Innenbereich der Volieren betrug durchschnittlich 21 °C und es wurde ein künstliches Lichtprogramm (Arcadia 20 W Fluorescent Bird Lamp, 2,4 % UVB / 12 % UVA; Arcadia Products plc, Redhill, United Kingdom) von 13/11 Stunden Licht-/Dunkelphase gefahren. Die Nymphensittiche wurden mit einer rationierten Diät aus Körnerfutter (Big Parakeets Prestige, Versele-Laga, Deinze, Belgien), sowie täglich frischem Obst und Gemüse versorgt. Zweimal wöchentlich wurde dem Futter eine Vitamin-Mineralstoffmischung (Korvimin® ZVT & Reptil, WDT, Garbsen, Deutschland) zugegeben. Frisches Wasser stand jederzeit *ad libitum* zur Verfügung. In den Sommermonaten wurden zusätzliche Wasserschalen als Bademöglichkeiten aufgestellt.

### **3.1.1 Männliche fertile Nymphensittiche zur Spermagewinnung**

Aus drei Großgruppen wurden jeweils 10 adulte, männliche Nymphensittiche ausgewählt, sodass insgesamt 30 Tiere als Samenspender zur Verfügung standen. Diese wurden zusammen mit den entsprechenden weiblichen Partnertieren in der jeweiligen Großgruppe belassen und zur besseren Erkennung mit farbigen Fußringen markiert. Jede Gruppe war in einer separaten, kombinierten Außen-, (2,4 x 2,9 x 2,4 m) & Innenvoliere (2,4 x 3,0 x 2,4 m) untergebracht. Die ausgewählten Samenspendertiere wurden im weiteren Verlauf des Versuches in ihrer ursprünglichen Gruppe belassen. Die jeweiligen Partnerinnen dienten lediglich zur sexuellen Stimulation der männlichen Nymphensittiche und wurden zu keiner Zeit des Versuches verwendet. Sie zählten daher nicht zu den Versuchstieren.

### **3.1.2 Weibliche Nymphensittiche**

Zur Durchführung des Inseminationsversuches wurden zwanzig weibliche Tiere, deren Partner nicht als Samenspender dienten, aus den drei Großgruppen ausgewählt. Sie wurden zufällig in zwei Kleingruppen eingeteilt, sodass jede Kleingruppe aus zehn Hennen bestand. Jede Kleingruppe wurde in einer Außenvoliere (1,8 x 2,0 x 2,0 m) in Hör- und Sichtkontakt zu den übrigen Gruppen vergesellschaftet. Zur Anregung des normalen Reproduktionsverhaltens der weiblichen Nymphensittiche während der Fertilisationsversuche war die Vergesellschaftung mit männlichen Partnertieren essentiell. Zum Ausschluss einer natürlichen Befruchtung war es demzufolge notwendig, die 20 männlichen Partnertiere vor der Vergesellschaftung zu sterilisieren (SAMOUR, 2002; NEUMANN U. A., 2013) (s. Kap. 3.4.8.1). Jedem Paar stand ein ausgehöhlter Baumstamm (Nisthöhlen Hackmann, Recke, Deutschland) als Nisthöhle zur Verfügung, um das Reproduktionsverhalten anzuregen, als Nistmaterial wurde Vollholzgranulat (CHIPSI EXTRA Small, J. RETTENMAIER & SÖHNE GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland) verwendet.

### **3.1.3 Männliche sterilisierte Nymphensittiche**

Die jeweiligen männlichen Partnertiere der 20 Hennen des Inseminationsversuches wurden zum Ausschluss der natürlichen Befruchtungsfähigkeit einer endoskopischen Vasektomie unterzogen (s. Kap. 3.4.8.1). Nach dem chirurgischen Eingriff wurden die

männlichen Tiere zunächst vier Wochen in einer separaten Außenvoliere (1,8 x 2,0 x 2,0 m) in Hör- und Sichtweite zu ihren weiblichen Partnertieren gehalten, um eine natürliche Befruchtung mit in den kaudalen Bereichen der Samenleiter (*Ductus deferentes*) residualem Sperma auszuschließen. Die Vergesellschaftung erfolgte nach Ablauf der Separationszeit, indem jeweils zehn sterilisierte Männchen in die Gruppe zu ihren Partnerinnen gesetzt wurden.

### 3.2 Spermagewinnung von männlichen, fertilen Nymphensittichen

Die Entwicklung eines geeigneten Protokolls zur Kryokonservierung von Nymphensittichspermien erforderte die regelmäßige Verfügbarkeit frischer Nymphensittichspermaproben. Anhand dieser Spermaproben erfolgte die Evaluierung verschiedener Spermazusätze, sowie Kühlverfahren. Die Spermagewinnung erfolgte einmal wöchentlich an den 30 fertilen Nymphensittichhähnen. Das Spermaentnahmeintervall von einer Woche wurde gewählt, da dieses von SCHRAMM (2005) als geeignet angegeben wurde, um eine ausreichend gute Spermaqualität zu erhalten. Längere Pausen zwischen den Spermaabnahmen vermindern hingegen die Reaktionsfähigkeit auf die Massage und bewirken Degenerationen der Spermienzellen und des Spermienbildungsgewebes in den Hoden. Obwohl bei Haushähnen sogar drei- bis fünfmal wöchentlich eine Spermagewinnung erfolgen kann, reagierte die Kloakenschleimhaut der Nymphensittichhähne jedoch sehr empfindlich auf die häufigere Massage, sodass bei kürzeren Spermaentnahmeintervallen Verunreinigungen der Ejakulate durch Blut auftraten. Die Spermagewinnung wurde erstmals im April 2012 durchgeführt und bis zum April 2016 vorgenommen. Hierbei wurde die Massagemethode nach NEUMANN U. A. (2013) angewendet. Ungefähr eine Stunde vor der Spermaentnahme wurden die Tiere mit Hilfe eines Keschers aus der Gruppe gefangen und in einen kleineren Käfig (86 x 54 x 95 cm) gesetzt, um einen Kotabsatz zu forcieren und somit das Risiko der Ejakulatkontamination zu minimieren. Während des Vorversuches wurden pro Absamungstermin immer alle 30 Tiere gleichzeitig genutzt. Während des Hauptversuches wurde pro Absamungstermin nur bei zehn Nymphensittichhähnen die Spermagewinnung versucht. Bei einem Absamungsintervall von 1x/Woche/Vogel bedeutete dies, dass pro Woche an drei Tagen jeweils zehn Tiere aus einer Gruppe separiert wurden. Zur

Spermaentnahme wurden die Tiere durch eine Hilfsperson in Rückenlage fixiert. Falls Verunreinigungen durch Exkreme vorlagen, wurde die Kloake mit weichen Tüchern (Kleenex® Original, Kimberly-Clark GmbH, Koblenz, Deutschland) gereinigt. Daumen und Zeigefinger der rechten Hand lagen beidseits der Kloake, wobei der Mittelfinger nahe der Bürzeldrüse des Vogels positioniert wurde (Abbildung 9). Vorsichtige, entgegengesetzte Bewegungen von Daumen und Zeigefinger für eine Dauer von ca. 30 Sekunden führten zur Ejakulation. Im Falle des Ausbleibens einer aktiven Ejakulation wurden durch vorsichtige Massage der Abdominalregion von kranial nach kaudal die Samenleiter zur Kloake hin ausgestrichen. Durch sanftes Zusammenpressen von Daumen und Zeigefinger seitlich der Kloake konnte das Sperma tropfenförmig im *Ventus* (Kloakenöffnung) sichtbar gemacht und durch Kapillarkräfte in einer gläsernen, skalierten Mikrokapillare (Wiretrol® II 1 to 5 µl, Drummond Scientific Co, Broomall, PA, USA) aufgefangen werden (Abbildung 10). Nach der Spermaentnahme bis zur Untersuchung wurden die Glaskapillaren mit den einzelnen Spermproben in einer für ihre sichere Aufbewahrung präparierten Plastikbox gelagert, die sich in einer mit kaltem Wasser (+4 °C) und Kühlakkus gefüllten Kühlbox befand. Die Konstanz der Temperatur wurde durch ein digitales Thermometer überprüft.



Abbildung 9: Fixation und Anwendung der Massagemethode bei einem männlichen Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*)

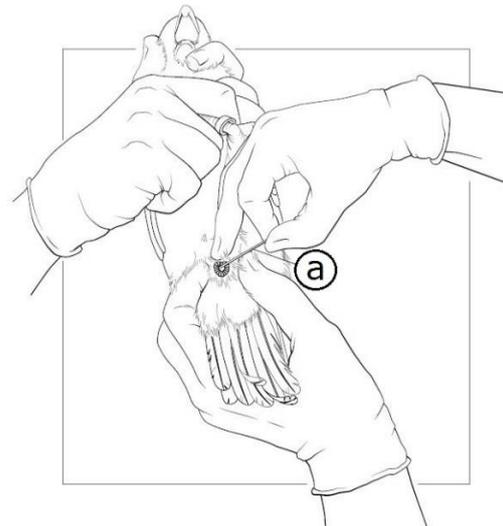


Abbildung 10: Digitale Illustration: Aufsaugen des Spermatropfens in die skalierte Mikrokapillare (a);  
Quelle: HERMANN (2014)

### **3.3 Vorversuch**

Im Vorversuch wurden die gewonnenen Spermaproben der Nymphensittiche einer Qualitätsuntersuchung unterzogen, um grundlegende Ausgangswerte der Spermaqualität der Spendertiere als Vergleichswerte für die spätere Entwicklung des Kryokonservierungsprotokolls zu erhalten. Zudem sollten die zu untersuchenden Spermaverdünner exakt auf die Werte und Anforderungen von Nymphensittichsperma angepasst werden, um möglichst gute Ergebnisse bei der Konservierung zu erzielen. In einer Studie von STELZER (2004) wurden die angewendeten Spermaverdünner nicht auf die Bedürfnisse des Spermas der jeweiligen Vogelart angepasst, was in der vorliegenden Studie verbessert werden sollte. Zudem wurden unverdünnte Spermaproben elektronenmikroskopisch untersucht, um die Spermienmembran im unbehandelten Zustand beurteilen zu können. Diese sollte nach der Entwicklung des Kryokonservierungsprotokoll noch einmal an tiefgefrorenen Spermien im Vergleich beurteilt werden, um gegebenenfalls Schäden besser beurteilen zu können.

#### **3.3.1 Makroskopische Spermauntersuchung**

##### **3.3.1.1 Volumen**

Anhand der Skalierung der Mikrokapillare (Wiretrol® II 1 bis 5 µl, Drummond Scientific Co, Broomall, PA, USA) war es möglich, das in der Kapillare befindliche Volumen auf ca. eine Nachkommastelle abzulesen.

##### **3.3.1.2 Konsistenz und Farbe**

Die Bestimmung der Ejakulatkonsistenz erfolgte während des Aufsaugens in die Mikrokapillare, während die Farbe erst bestimmt wurde, wenn die gesamte Spermamenge in der Kapillare war. Folgende Einteilung (Abbildung 11) wurde hierbei zugrunde gelegt: Das Vorkommen von Kontaminationen wie Erythrozyten, Harnsäure und/oder Kot wurden getrennt dokumentiert.

Farbe	klar	Konsistenz	wässrig
	gräulich		molzig
	weißlich		milchig
	elfenbein		sahnig
	strohfarben		rahmig
	gelblich		
	orange		
	rötlich		
	bräunlich		

Abbildung 11: Einteilung der Ejakulatfarbe und –konsistenz von Nymphensittichsperma

### 3.3.1.3 Geschätzte Spermiedichte und –beweglichkeit

Zur Abschätzung der Spermiedichte der Probe, sowie der Beweglichkeit der Spermien wurde die Glaskapillare auf einem Objektträger (Assistent® Objektträger Elka 76 x 26 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) fixiert und in 100facher Vergrößerung (Objektiv: Leica ∞/-/B N PLAN 10x/β,25 526260, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit Hilfe eines Leica DM2500 Mikroskops (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) in ihrer ganzen Länge durchmustert. Eine Einschätzung der Spermienanzahl erfolgte indem die Spermiedichte im Inneren der Kapillare subjektiv von 0 bis 4 eingeteilt wurde, was nach dem Schema in Tabelle 2 vorgenommen wurde. Die Spermienbeweglichkeit wurde subjektiv geschätzt indem die Geschwindigkeit der Spermien am konkaven Flüssigkeitsmeniskus innerhalb der Kapillare beurteilt und in das Schema in Tabelle 3 eingeteilt.

Tabelle 2: Vorabbeurteilung der Spermienanzahl von Nymphensittichsperma unmittelbar nach der Entnahme im Inneren der Kapillare

Einteilung	Anzahl Spermien / Gesichtsfeld
0	keins
1	einige wenige
2	viele
3	sehr viele
4	massenhaft

Tabelle 3: Vorabbeurteilung der Spermienbeweglichkeit von Nymphensittichsperma unmittelbar nach der Entnahme im Inneren der Kapillare

Einteilung	Geschwindigkeit
0	keine Bewegung
1	langsam
2	gemächlich
3	zügig
4	sehr schnell

### 3.3.2 Chemisch-physikalische Spermauntersuchung

#### 3.3.2.1 pH-Wert

Zur pH-Wert-Bestimmung wurde ein kleiner Tropfen Sperma ( $\leq 0,05 \mu\text{l}$ ) der einzelnen Spermaproben auf einen Streifen Spezialindikatorpapier (pH 5,5 – 9,0; 5,4 – 7,0 & 6,4 – 8,0; Macherey-Nagel GmbH & co. KG, Düren, Deutschland) gegeben. Nach etwa 30 Sekunden Wartezeit wurde der Farbumschlag an der Rückseite des Indikatorpapiers mit der Farbskala verglichen und der daraus resultierende Wert dokumentiert.

#### 3.3.2.2 Osmolalität

Die Messung der Osmolalität erfolgte anhand von neun gepoolten Spermaproben. Diese Anzahl der Messungen war mindestens notwendig, um auftretende Messabweichungen auszugleichen und ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Zur Messung der Osmolalität war ein Spermavolumen von mindestens  $100 \mu\text{l}$  pro Messung notwendig. Die Einzelejakulate von 30 Nymphensittichen wurden daher in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bis zum benötigten Volumen gepoolt und bis zur Untersuchung in einer mit kaltem Wasser und Kühlakkus gefüllten Kühlbox bei  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die Messung erfolgte einmal pro Woche mit Hilfe eines Semi-Mikroosmometers (Löser Osmometer Typ 6, Löser Messtechnik, Berlin, Deutschland) über das Verfahren der Gefrierpunkterniedrigung. Das Osmometer wurde entsprechend der Herstellerangaben vor jeder Messung mit destilliertem Wasser auf den Nullpunkt und mit Hilfe einer mitgelieferten NaCl-Lösung von 300 mosm auf einen Standardpunkt kalibriert. Die im Reaktionsgefäß befindliche Probe wurde nun in den Messkopf des Osmometers platziert, wodurch der Kühlprozess eingeleitet wurde. Nach ca. einer Minute ertönte ein Summen, was die Unterkühlung der Probe anzeigte. Die manuelle Auslösung des Gefrierens geschah durch das Eintauchen der mit Eiskristallen besetzten Nadel in die Probe. Die Gefrierpunktserniedrigung im Vergleich zum reinen Wasser stellt ein direktes Maß für die osmotische Konzentration dar. Reines Wasser gefriert bei  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ , eine wässrige Lösung mit einer Osmolalität von  $1 \text{ osmol/kg H}_2\text{O}$  bei  $-1,858 \text{ }^\circ\text{C}$  was den folgenden Zusammenhang (Abbildung 12) ergibt. Aufgrund des linearen Zusammenhanges zwischen Osmolalität und Gefrierpunkt stellt die Messung der

Gefrierpunkttemperatur auch indirekt eine Messung der Osmolalität dar, weshalb vom Osmometer der Wert in [mosm/kg H<sub>2</sub>O] direkt angezeigt wurde und eine Berechnung des Osmolalitätswertes somit überflüssig war.

$$\Delta T [^{\circ}\text{C}] = \frac{\xi}{1000 [\text{mosm}]} \times 1,858 [^{\circ}\text{C}]$$

Abbildung 12: Berechnung der Gefrierpunktniedrigung einer wässrigen Lösung mit einer Osmolalität von 1 osmol/l im Vergleich zu reinem Wasser

### 3.3.3 Mikroskopische Spermauntersuchung

#### 3.3.3.1 Supravitalfärbung

Die Bestimmung des Anteils der lebenden Spermien im unbehandelten Ejakulat gehört zu den wichtigsten Spermaqualitätsuntersuchungen. Hierzu war es notwendig, eine sogenannte Supravitalfärbung durchzuführen. In vorausgegangenen Untersuchungen an Papageiensperma hatte sich 2%ige Eosin B-Färbelösung als geeignet erwiesen (FISCHER U. A., 2013b), sodass diese auch in der vorliegenden Studie Verwendung fand.

##### 3.3.3.1.1 Eosin B-Färbung

Die Herstellung der 2%igen Eosin B-Färbelösung (Rezeptur: s. Kap. 9.10.2.1) erfolgte zu Anfang des Versuchsvorhabens. Die Färbelösung wurde portioniert in Eppendorfgefäßen (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) aufbewahrt und bis zur jeweiligen Verwendung lichtgeschützt aufbewahrt. Das zur Färbung benötigte Volumen wurde mit sterilen Pipettenspitzen (10 µl, Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland) entnommen. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde für jede Entnahme eine neue, sterile Pipettenspitze verwendet. Zwei µl der Färbelösung wurden auf einem Objektträger (Assistent® Objektträger Elka 76 x 26 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG) mit einem gleich großem Volumen Sperma vermischt und 15

Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Anfertigung des Ausstrichs nach Standardprozeduren durchgeführt wurde (WHO, 2010). Im getrockneten Ausstrich wurden bei 400facher Vergrößerung (Leica 506099 $\infty$ /0.17/0 N PLAN 40x/0,65 PH2) unter dem Mikroskop (Leica DM2500, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) 200 Spermien ausgewertet. Hierbei wurden tote Spermien (rote Köpfe) von lebenden Spermien [weiße/farblose Köpfe (Abbildung 16 (A))] differenziert und nachfolgend die Lebend/Tot-Rate berechnet. Auf die beschriebene Weise wurden 70 zufällig ausgewählte Einzelejakulate im Vorversuch evaluiert.

### 3.3.3.2 Spermienkonzentration und Spermiengesamtzahl

Die Bestimmung der Spermienkonzentration und der Spermiengesamtzahl wurde an insgesamt 51 zufällig ausgewählten Einzelejakulaten nach bekannten Methoden durchgeführt. Hierzu wurden 2  $\mu$ l des nativen Spermas in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 0,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit 18  $\mu$ l *Aqua destillata* versetzt (1:10 Verdünnung). Nach mehrmaliger vorsichtiger Durchmischung mit Hilfe einer Pipette (PIPETMAN Classic™ P100, Gilson Inc., Middleton, WI, USA) wurden der Mischung weitere 180  $\mu$ l *Aqua destillata* zugesetzt, sodass eine endgültige Verdünnung von 1:100 vorlag. Eine Assistent® Neubauer-improved Zählkammer (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) wurde beidseitig mit der verdünnten Spermalösung befüllt und konnte nach ca. 10 Minuten Sedimentationsphase in 400facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Leica DM2500, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet werden. Hierzu wurden in beiden Kammern jeweils fünf Kleinquadrate der Erythrozytenzählfelder ausgezählt, wobei Spermienköpfe, die auf dem rechten oder oberen Rand eines Kleinquadrates lagen, nicht beachtet wurden. Spermienköpfe, die auf dem linken oder unteren Rand eines Kleinquadrates lagen, gingen in die Zählung mit ein. Die Spermienkonzentration ergab sich aus der nachfolgenden Formel (Abbildung 13). Die Spermiengesamtzahl (SGZ) wurde durch die Multiplikation der Spermienkonzentration ( $c_{Sp}$ ) mit dem Spermavolumen ( $V_{Sp}$ ) berechnet.

$$\text{Spermienkonzentration [n/}\mu\text{l]} = \frac{\text{Anzahl gezählte Spermien [N]}}{\text{Oberfläche der ausgewerteten Quadrate [mm}^2\text{] x Kammertiefe [mm] x Verdünnung}}$$

$$c_{\text{Sp}} = \frac{N \times 100}{0,2 \times 0,1 \times 1}$$

$c_{\text{Sp}}$ , Spermienkonzentration

Abbildung 13: Berechnung der Spermienkonzentration von Nymphensittichsperma mit Hilfe der Assistent® Neubauer-improved Zählkammer

### 3.3.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Zur genauen Beurteilung der Spermienmembran wurde eine unbehandelte, gepoolte Spermprobe einer transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung unterzogen. Zum Ende des Versuchsvorhabens sollte eine weitere, vollständig das etablierte Protokoll durchlaufende Probe auf die gleiche Weise evaluiert werden. So können durch die Behandlung entstandene Spermienmembranschäden sichtbar gemacht werden. Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung der Spermien war ein Volumen von mindestens 100  $\mu\text{l}$  notwendig. Die einzelnen Ejakulate wurden daher in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bis zum benötigten Volumen von 100  $\mu\text{l}$  gepoolt und bis zur Ejakulateinbettung in einer mit kaltem Wasser und Kühlakkus gefüllten Kühlbox bei +4 °C gelagert. Die gepoolte Spermprobe wurde nachfolgend für mindestens zwei bis maximal zwölf Stunden in 6%igem Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) fixiert. Nach zehn-minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm konnte der Überstand abpipettiert werden, wonach das verbliebene Pellet aus Spermien durch Waschung gereinigt wurde. Dies erfolgte durch Zugabe von 1 ml 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer, der nach zehn-minütiger Einwirkzeit durch Impulszentrifugation (2000 rpm) und Abpipettieren des Überstandes entfernt wurde. Die Waschung wurde drei Mal wiederholt. Die Nachfixierung erfolgte für 60 Minuten in 1%igem Osmiumtetroxid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Nachfolgend wurde der Waschungsschritt erneut drei Mal durchgeführt. Die Entwässerung erfolgte durch schrittweises Zugeben von Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in aufsteigender Konzentration (50 %, 70 %, 80 %, 96 %), wobei jeder Schritt einer 15-minütigen Einwirkzeit bedurfte. Der letzte Entwässerungsschritt bestand in einer einstündigen Inkubation in 100 %igem Ethanol, welches während der Inkubation zwei Mal erneuert wurde, wozu wiederum eine Impulszentrifugation (2000 rpm) nötig war, um einen spermienfreien Überstand zu erhalten. Als Zwischenmedium wurde Xylol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet, welches in drei Schritten jeweils zehn Minuten Einwirkungszeit bedurfte. Anschließend erfolgte die Inkubation des behandelten Ejakulates in einem Gemisch aus EPON® 812/Xylol (1:2) (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) über Nacht, gefolgt von der Einbettung in EPON® 812 über vier bis sechs Stunden. Die Polymerisation fand über 20 Stunden bei 60 °C statt. Ultradünne Schnitte (< 0,1 µm) wurden mit Hilfe eines Mikrotoms mit Diamantmesser (Leica Reichert-Jung, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) angefertigt, auf Kupfernetze verbracht und mittels 0,5%igem Uranylazetat und 0,2%igem Bleizitrat gefärbt (Leica Reichert-Jung Ultrastainer, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland). Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops (Zeiss EM 109, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) bei 80 kV untersucht. Besonderes Augenmerk bei der Auswertung wurde auf die Plasmamembranintegrität der Spermien gelegt. Hierzu wurden die verschiedenen Bereiche des Spermiums (Akrosom, Kopf, Verbindungsstück, Schwanz) getrennt betrachtet. Pro Spermienregion wurden zufällig 25 Anschnitte im Elektronenmikroskop eingestellt, die nicht schräg angeschnitten und daher klar zu erkennen waren. Diese Abschnitte wurden in der Gänze ihrer Abbildung eingehend auf die Membranintegrität untersucht. Dabei wurde in die beiden Kategorien „intakt“ und „nicht intakt“ eingeteilt und dokumentiert. Diese Untersuchung wurde sowohl bei der unbehandelten, als auch abschließend bei der behandelten, kryokonservierten Spermprobe durchgeführt, sodass insgesamt 200 Membranabschnitte betrachtet wurden.

### 3.4 Hauptversuch

Nach der Gewinnung grundlegender Erkenntnisse zu Nymphensittichspermien durch den Vorversuch erfolgte im Hauptversuch die eigentliche Entwicklung des Protokolls zur Kryokonservierung von Nymphensittichsperma. Hierzu wurden im ersten Schritt Spermaverdünner laut Literaturangaben hergestellt und auf die Anforderungen von Nymphensittichsperma, die sich aus dem Vorversuch ergaben, angepasst. Diese modifizierten Verdünner wurden in einem ersten Schritt einer vergleichenden Untersuchung unterzogen, um den Spermaverdünner mit den besten, qualitätserhaltenden Eigenschaften herauszufinden. In einem zweiten Schritt wurden die Einflüsse verschiedener Kryoprotektiva auf das mit dem ausgewählten Spermaverdünner versetzte Nymphensittichsperma evaluiert. Aufgrund der toxischen Eigenschaften sämtlicher Kryoprotektiva (FAHY, 1986) ging es hier in erster Linie darum, dasjenige Kryoprotektivum mit dem am wenigsten schädlichen Einfluss auf das Überleben, die Beweglichkeit und die Morphologie der Nymphensittichspermien zu evaluieren. Der dritte Schritt beschäftigte sich mit dem Einfluss verschiedener Einfrierraten auf die Spermienqualität des mit den evaluierten Spermaverdünnern und Kryoprotektiva versetzten Spermas. Abschließend wurde die tatsächliche Anwendbarkeit des in vitro entwickelten Protokolls auf das Nymphensittichsperma getestet. Hierzu wurde ein Befruchtungsversuch mit Tiefgefriersperma im Vergleich zur artifizialen Insemination mit Frischspermaproben durchgeführt.

#### 3.4.1 Herstellung der Verdünner

Aus der verfügbaren Literatur wurden drei Spermaverdünner ausgewählt, die schon bei einigen Vogelspezies zur Konservierung von Spermaproben eingesetzt wurden. Es handelte sich um den Verdünner nach LAKE UND STEWART (1978), den Verdünner nach BLANCO U. A. (2008) und den Beltsville-Poultry-Semen-Extender (SEXTON, 1977). Diese Spermaverdünner wurden gemäß Literaturangaben hergestellt. Hierzu wurden die einzelnen Chemikalien mittels einer Feinwaage (SI-234, Denver Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) abgewogen und in einen sterilen Erlenmeyerkolben (Enghals, 100 ml, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) verbracht, wo sie unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers (Ika® Ret basic, Ika®-Werke

GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) und durch Zugabe von Wasser für Injektionszwecke (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) hitzefrei gelöst wurden. Einzelheiten zur Komposition der Verdünner lassen sich den Originalveröffentlichungen entnehmen (Abbildung 14). Der pH-Wert der so hergestellten Spermaverdünner wurde mit Hilfe eines pH-Meters (S20 SevenEasy™ pH, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) bestimmt und durch die Zugabe von 1 M Natriumhydroxid (NaOH) oder 1 M Salzsäure (HCl) auf den mittleren pH-Wert von Nymphensittichsperma (Tabelle 5) eingestellt. Hiernach erfolgte die Messung der Osmolalität der Spermaverdünner nach der in Kapitel 3.3.2.2 beschriebenen Methode. Abweichungen der Werte vom mittleren Osmolalitätswert von Nymphensittichsperma wurden durch Modifikationen der Masse der Chemikalien adjustiert und auf die Werte des Vorversuches eingestellt. Die Rezepte der modifizierten Verdünner sind in Kapitel 9.10.1 dargestellt. Die modifizierten Verdünner wurden steril filtriert (Millex® GP Filtereinheit, 0.22 µm, 33mm, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und in kleinen Portionen zu je 10 ml in sterile Gefäße (CELLSTAR® TUBES, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) abgefüllt. Bis zur Verwendung wurden die modifizierten Verdünner bei -22 °C gelagert. Adenosinriphosphat (ATP) wurde wegen seiner Instabilität erst kurz vor der Verdünnung der Spermprobe zum Spermaverdünner 2 hinzugegeben. Die Spermaverdünner wurden sofort nach der Benutzung wieder eingefroren. Jede konfektionierte Portion wurde nicht häufiger als 14 Mal wieder aufgetaut. Eventuell vorhandene Restmengen wurden verworfen. Zur Kontrolle und zum Vergleich zu vorherigen Studien diente 1%ige Glukoselösung (STELZER, 2004; BEHNCKE, 2002), die nicht modifiziert und zu jeder Untersuchung frisch hergestellt wurde (s. Kap. 9.10.1.1). Zur besseren Vergleichbarkeit mit den modifizierten Spermaverdünnern erfolgte auch hier die Ermittlung der durchschnittlichen pH- und Osmolalitätswerte durch Messung in 9-facher Replikation.

Lake-Verdünner (SV 1)	LAKE UND STEWART (1978)
Verdünner nach Blanco (SV 2)	BLANCO U. A. (2008)
Beltsville-Poultry-Semen-Extender (SV 3)	SEXTON (1977)

Abbildung 14: Im Hauptversuch verwendete Spermaverdünner mitsamt Literaturangabe der Originalveröffentlichung

### 3.4.2 Spermaqualitätsuntersuchungen

#### 3.4.2.1 Motilitätsanalyse

Zur Auswertung der Spermienmotilität wurden 8  $\mu\text{l}$  der Spermalösung mittels einer Pipette (PIPETMAN Classic™ P10, Gilson Inc., Middleton, WI, USA) auf die Mitte eines Objektträgers (Assistent® Objektträger Elka 76 x 26 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) verbracht und mit einem Deckglas (Assistent® Deckgläser 18 x 18 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) so abgedeckt, dass keine Luftblasen zwischen Objektträger und Deckglas entstanden. Es wurden die Zeitpunkte 0 (direkt nach Zusatz der zu untersuchenden Spermazusätze), 30, 60, 90 und 120 Minuten nach deren Zusatz evaluiert. In 400facher Vergrößerung des Mikroskops (Leica DM2500, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden nacheinander fünf Gesichtsfelder ausgewertet, wobei in der Mitte des Deckgläschens begonnen wurde, gefolgt von der Auswertung vier weiterer Gesichtsfelder im Uhrzeigersinn, die jedoch mindestens 5 mm von den Rändern des Deckglases entfernt waren, um Beeinträchtigungen der Spermienmotilität durch Dehydratation oder die Grenzflächenspannung zwischen Flüssigkeit und Glas zu umgehen (FISCHER U. A., 2014b). Bei niedriger Spermiedichte ( $\leq 50$  Spermien/Gesichtsfeld) wurde das gesamte Gesichtsfeld ausgewertet, lag die Spermiedichte jedoch bei über 50 Spermien pro Gesichtsfeld wurde nur der linke obere Quadrant ausgezählt. Zunächst wurden die lineär oder in großen Kreisen vorwärtsbeweglichen Spermien gezählt, gefolgt von der Anzahl orts- und kreisbeweglicher und der Anzahl unbeweglicher Spermien. Die Prozentwerte der Gesamtmotilität (MOT) und Vorwärtsmotilität (PMOT) ergaben sich somit aus der folgenden Berechnung (Abbildung 15).

$$\text{MOT [\%]} = \frac{\text{Summe gesambeweglicher Spermien in 5 Gesichtsfeldern (V+O+K)[n]}}{\text{Summe aller Spermien in 5 Gesichtsfeldern (V+O+K+U)[n]}} \times 100$$

$$\text{PMOT [\%]} = \frac{\text{Summe vorwärtsbeweglicher Spermien in 5 Gesichtsfeldern (V) [n]}}{\text{Summe aller Spermien in 5 Gesichtsfeldern (V+O+K+U)[n]}} \times 100$$

vorwärtsbeweglich (V)	ortsbeweglich (O)
kreisbeweglich (K)	unbeweglich (U)
Gesambeweglichkeit (MOT)	Vorwärtsbeweglichkeit (PMOT)

Abbildung 15: Berechnung der Spermiengesamt- und vorwärtsbeweglichkeit aus mikroskopisch untersuchten Proben von Nymphensittichsperma

### 3.4.2.2 Viabilitätsanalyse

#### 3.4.2.2.1 Eosin B-Färbung

Die Eosin B-Färbung der Ausstriche sowie deren Auswertung wurde analog der Beschreibung in Kapitel 3.3.3.1.1 vorgenommen. Die Evaluation der Spermienvitalität erfolgte zum einen an unbehandelten Proben, zum anderen an den Spermaproben, denen die Zusätze (Verdüner, Kryoprotektiva) zugegeben wurden. Es wurde der Zeitpunkt 0 (direkt nach Zusatz der zu untersuchenden Spermazusätze) und der Zeitpunkt 120 (am Ende des Beobachtungszeitraumes) untersucht. Die genaue Anzahl der evaluierten Proben wird in den jeweiligen Abschnitten der einzelnen Protokollschritte behandelt. An den gleichen Ausstrichen wurde später die morphologische Auswertung vorgenommen. Daher wurden die Objektträger nach der Auswertung der Lebend/Tot-Rate zur besseren Haltbarmachung mit Hilfe des Schnelleindeckmittels Entellan® nach Herstellerangaben versiegelt. Hierzu wurde der Ausstrich tropfenweise mit Entellan® bedeckt. Sofort im Anschluss wurde ein Deckglas (Assistent® Deckgläser 60 x 24 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) aufgelegt. Durch kapillare Saugwirkung verteilte sich das Schnelleindeckmittel automatisch im Zwischenraum zwischen Objektträger und Deckglas. Nach ca. 20 Minuten Trocknungszeit war der Ausstrich vollständig versiegelt.

### 3.4.2.2.2 Fluoreszenzfärbung

Zusätzlich zur Eosin B-Färbelösung wurde die Fluoreszenz-Viabilitätsanalyse LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (Invitrogen™ - Molecular Probes™, Eugene, OR, USA) eingesetzt. Die Herstellung der Färbelösung ist in Kapitel 9.10.2.2 beschrieben. Analog zur Auswertung mit Hilfe von 2%iger Eosin B-Lösung erfolgte auch die Untersuchung der Fluoreszenzproben zu den Untersuchungszeitpunkten 0 und 120 Minuten. Fünf  $\mu\text{l}$  der Spermialösung wurden zu 2,5  $\mu\text{l}$  der vorbereiteten Färbelösung in braune Reaktionsgefäße (Eppendorf® Safe-Lock Tubes Amber 0,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert und zehn Minuten bei Raumtemperatur in einer Schublade inkubiert, um die Reagenzien vor Licht zu schützen. Sieben  $\mu\text{l}$  der Mischung wurden dann auf einen Objektträger (Assistent® Objektträger Elka 76 x 26 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) pipettiert, mit einem Deckglas (Assistent® Deckgläser 18 x 18 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) abgedeckt und in 400facher Vergrößerung mit einem Mikroskop mit Fluoreszenzlichtquelle (Leica DM2500, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) durchmustert. Grüne Zellen wurden als lebende Spermien kategorisiert (Exzitation: 488 nm, Emission: 516 nm), rote Zellen wurden als tote Spermien kategorisiert (Exzitation: 530 nm, Emission: 617 nm) [Abbildung 16 (B)]. Nachfolgend wurde die Lebend/Tot-Rate berechnet.

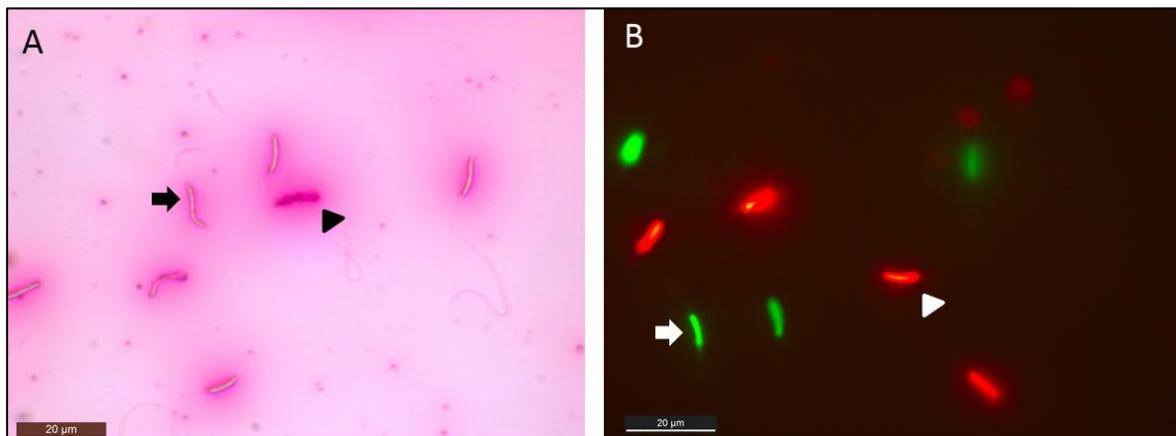


Abbildung 16: Supravitalfärbungen zur Evaluierung der Spermiviabilität in 400facher Vergrößerung (A) Eosin B; (B) Fluoreszenz; Pfeil: lebendes Spermium; Pfeilspitze: totes Spermium

### 3.4.2.3 Morphologische Analyse

Die Evaluation der Spermienmorphologie erfolgte aus den im Rahmen der Vitalitätsanalyse angefertigten Eosin B-Ausstrichen. Dementsprechend wurden auch hier die Zeitpunkte 0 und 120 Minuten betrachtet. Die genaue Anzahl der evaluierten Proben wird in den jeweiligen Abschnitten der einzelnen Protokollschritte behandelt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch (Leica DM2500, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) im Eosin B-Ausstrich in 1000facher Vergrößerung (Leica Germany 506132 $\infty$ /-/D N PLAN 100x/1.25-0,60 OIL) unter Zuhilfenahme von Immersionsöl. Der Ausstrich wurde mäanderförmig durchgemustert, wobei eine morphologische Differenzierung von 200 Spermien pro Ausstrich stattfand. Die Spermien wurden differenziert in morphologisch normale und abnorme Zellen. Die einzelnen morphologischen Abweichungen wurden weiterhin nach dem detaillierten Schema von MARVAN U. A. (1981) (s. Anhang 9.1.8) eingeteilt, was zuvor bereits in der morphologischen Beschreibung von Papageienspermien Anwendung gefunden hatte (BEHNCKE, 2002; STELZER, 2004; FISCHER U. A., 2014a). Bezugnehmend auf standardisierte Vorgehensweisen bei der morphologischen Auswertung von Spermien wurden die Veränderungen anhand spezifischer Kategorien klassifiziert (1: abgetrennte Köpfe, 2: andere Kopfveränderungen, 3: Akrosomveränderungen, 4: Verbindungsstückveränderungen, 5: Geißelveränderungen) nach der Reihenfolge ihrer Priorität (WHO, 2010).

### 3.4.3 Evaluierung der Verdüner

Es wurden drei zuvor ausgewählte Spermaverdüner in jeweils zwei Verdünnungsstufen (1:4 und 1:8) evaluiert. Für die Untersuchung musste das gewonnene Sperma der Nymphensittichhähne zu einer Probe gepoolt werden, um eine einheitliche Ausgangsprobe zu erhalten. Hierzu wurden die gewonnenen Einzelejakulate von jeweils 10 Nymphensittichmännchen einer kurzen, vorläufigen Qualitätsuntersuchung (s. Kap. 3.3.1) unterzogen. Proben, die bereits makroskopisch Verunreinigungen wie Harnsäure oder Kot enthielten, wurden nicht zur weiteren Analyse verwendet. Proben von zufriedenstellender Qualität (keine Verunreinigungen, geschätzte Spermiedichte in der Kapillare  $\geq 2$ ) wurden in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gepoolt. Jede gepoolte native Spermprobe wurde

bei Raumtemperatur in vier Aliquots geteilt und mit den drei verschiedenen Verdünnern (SV 1 - 3), entweder in 1:4 oder 1:8-Verdünnung, versetzt. Als Kontrolle wurde jeweils die 1%ige Glukoselösung (BEHNCKE, 2002; STELZER, 2004) in 1:5-Verdünnung eingesetzt (Abbildung 17). Hierzu wurde das Aliquot des nativen Spermias mit Hilfe einer Pipette (PIPETMAN Classic™ P200, Gilson Inc., Middleton, WI, USA) langsam mit dem ebenfalls auf Raumtemperatur temperierten Spermaverdünner versetzt, wobei eine Durchmischung der Probe durch dreimaliges, vorsichtiges Resuspendieren stattfand. Zu SV 2 wurde erst kurz vor der Mischung mit der Spermiaprobe 30 mM ATP hinzugegeben. Um jeweils zwei Verdünnungsstufen eines jeden Verdünners in acht Wiederholungen testen zu können, waren mindestens 16 Spermiapoolproben zur Aliquotierung notwendig. Die Anzahl der Messwiederholungen (8) wurde so gewählt, um Messungenauigkeiten auszugleichen und statistisch verwertbare Ergebnisse zu erhalten. Da eine Spermiapoolprobe ein nicht ausreichendes Volumen besaß, um genügend Aliquote ( $n = 4$ ) zu bilden, war die Evaluierung einer weiteren Spermiapoolprobe notwendig. Insgesamt ergab sich so die Untersuchung von 17 gepoolten Spermiaproben im Rahmen der Verdünnerevaluierung. Unmittelbar nach der Verdünnung des Spermias (Zeitpunkt 0) und am Ende des Beobachtungsintervalls (Zeitpunkt 120) wurden sowohl von der nativen Spermiaprobe, als auch von allen Verdünnungen Supravitalfärbungen in Form von Eosin B-Ausstrichen (s. Kap. 3.4.2.2.1) und Fluoreszenzfärbungen (s. Kap. 3.4.2.2.2) angefertigt. Zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Verdünnung fand eine Motilitätsanalyse (s. Kap. 3.4.2.1) der Verdünnungen statt. Aufgrund der hohen Spermiedichte der nativen Probe und der hieraus resultierenden Spermienaggregationen konnte eine Motilitätsanalyse hier nicht zufriedenstellend durchgeführt werden. Zwischen den Beobachtungszeitpunkten wurde die Spermiaprobe bei +4 °C im Kühlschrank gelagert. Die morphologische Differenzierung der Spermien fand nach Abschluss der Vitalitäts- und Beweglichkeitsanalyse zu den Untersuchungszeitpunkten 0 und 120 anhand der versiegelten Eosin B-Ausstriche statt. Im weiteren Verlauf der Entwicklung des Protokolls musste von einem fortschreitenden Spermienqualitätsverlust ausgegangen werden. Daher wurden an den Verdünner, der im Weiteren verwendet werden sollte, folgende Anforderung gestellt: die Vitalitätsrate sollte am Ende des Untersuchungszeitraumes (120 Minuten) mindestens 70 % betragen, was einer Differenz von ca. 15 % im Vergleich zu den Ausgangswerten entspräche. Unter den Verdünnern, die diese Prämisse erfüllten, wurde

derjenige Spermaverdünner in der Konzentration ausgewählt, der die höchste Vorwärtsbeweglichkeit zum letzten Untersuchungszeitpunkt aufwies.

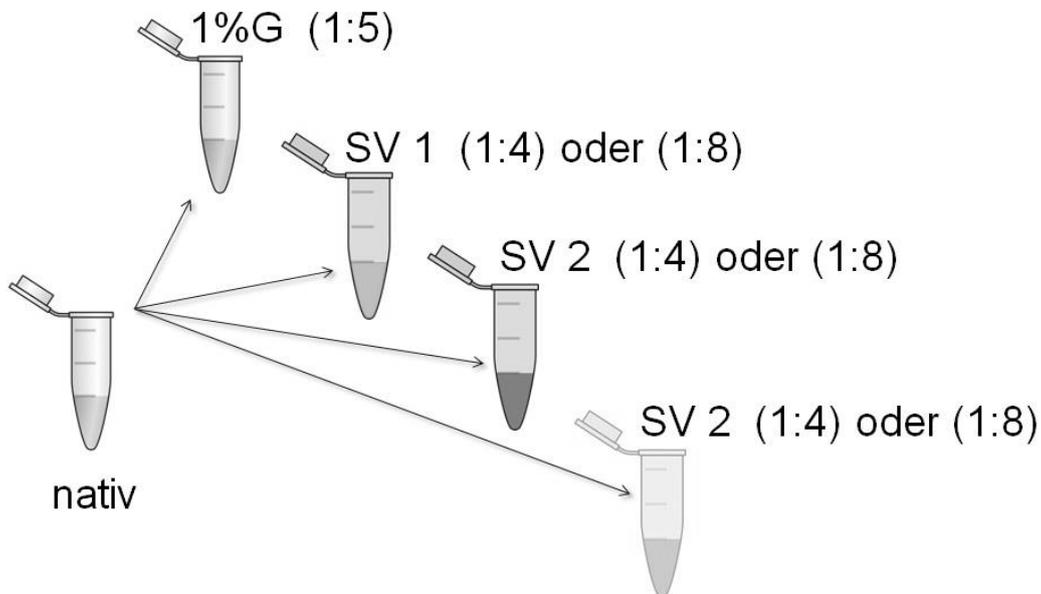


Abbildung 17: Aufteilung der nativen Spermapoolprobe im Zuge der Verdünnerevaluierung  
1%G, 1%ige Glukoselösung; SV, Spermaverdünner: Lake-Verdünner (1), Blanco-Verdünner (2), BPSE (3); in Klammern angegeben ist die Verdünnungsstufe

#### 3.4.4 Evaluierung der Kryoprotektiva

Es wurden drei zuvor ausgewählte Kryoprotektiva in jeweils drei Endkonzentrationen (4 %, 8 % und 12 %) evaluiert. Für die Untersuchung musste das gewonnene Spermata der Nymphensittichhähne zu einer Probe gepoolt werden, um eine einheitliche Ausgangsprobe zu erhalten. Hierzu wurden die gewonnenen Einzelejakulate von jeweils 10 Nymphensittichmännchen einer kurzen, vorläufigen Qualitätsuntersuchung (s. Kap. 3.3.1) unterzogen. Proben, die bereits makroskopisch Verunreinigungen wie Harnsäure oder Kot enthielten, wurden nicht zur weiteren Analyse verwendet. Proben von zufriedenstellender Qualität (keine Verunreinigungen, geschätzte Spermiedichte in der Kapillare  $\geq 2$ ) wurden in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gepoolt. Jede native Spermaprobe wurde den

Ergebnissen der Verdünnerevaluierung entsprechend (s. Kap. 4.2.2) bei Raumtemperatur zunächst mit dem besten Verdünner in der besten Verdünnungsstufe versetzt. Die verdünnte, gepoolte Spermaprobe wurde nachfolgend in vier Aliquots geteilt und in einer fünf-minütigen Äquilibrierungsphase wurde die Probe im Kühlschrank auf +4 °C gekühlt. Nachfolgend wurden drei Aliquots mit den kryoprotektiven Substanzen Glycerin, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Dimethylacetamid (DMA) in jeweils einer der verschiedenen Endkonzentrationen (4 %, 8 % und 12 %) versetzt (Abbildung 18). Die Berechnung der Endkonzentration wurde mit Hilfe der folgenden Formel durchgeführt (Abbildung 19). Um jeweils drei Konzentrationen (4 %, 8 % und 12 %) eines jeden Kryoprotektivums in acht Wiederholungen testen zu können, waren insgesamt 24 gepoolte Spermaproben notwendig. Die Anzahl der Messwiederholungen (8) wurde so gewählt, um Messungenauigkeiten auszugleichen und statistisch verwertbare Ergebnisse zu erhalten. Die Durchmischung der Proben fand wie bereits in Kapitel 3.4.3 beschrieben durch vorsichtige Resuspension statt, der wiederum eine fünf-minütigen Äquilibrierung bei +4 °C folgte. Unmittelbar nach der zweiten zehn-minütigen Äquilibrierungsphase (Zeitpunkt 0) wurden sowohl von der nativen Spermaprobe, als auch von allen weiterführend bearbeiteten Proben Supravitalfärbungen in Form von Eosin B-Ausstrichen (s. Kap. 3.4.2.2.1) und Fluoreszenzfärbungen (s. Kap. 3.4.2.2.2) angefertigt. Zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Verdünnung fand eine Motilitätsanalyse (s. Kap. 3.4.2.1) der Kontrollprobe (Verdünner) und den mit Kryoprotektiva versetzten Proben statt. Auch hier wurde wegen der hohen Spermiedichte der nativen Probe bei dieser auf eine Motilitätsanalyse verzichtet. Zwischen den Beobachtungszeitpunkten wurde die Spermaprobe bei +4 °C im Kühlschrank gelagert. Die morphologische Differenzierung der Spermien fand nach Abschluss der Vitalitäts- und Beweglichkeitsanalyse zu allen Untersuchungszeitpunkten anhand der versiegelten Eosin B-Ausstriche statt. Weiterhin musste auch hier von einem Qualitätsverlust der Spermien in der Weiterentwicklung des Protokolls ausgegangen werden. Daher sollte dasjenige Kryoprotektivum in der Konzentration weiter verwendet werden, das die geringsten Verluste hinsichtlich Spermienbeweglichkeit und –vitalität aufwies.

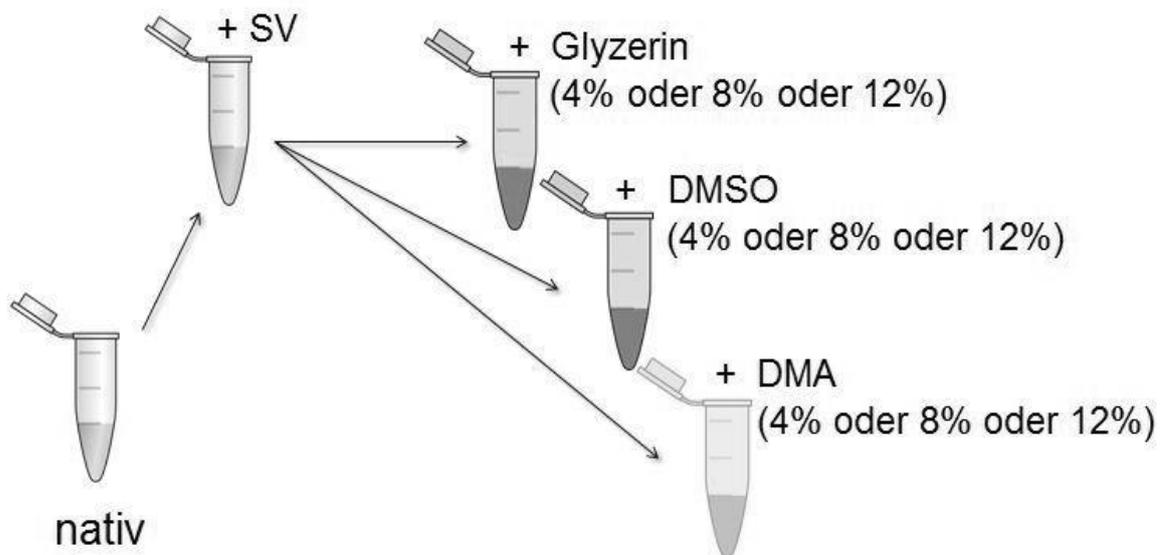


Abbildung 18: Aufteilung der nativen Spermapoolprobe im Zuge der Kryoprotektivaevaluierung  
 SV, Spermaverdüner (aus Kapitel 4.2.2); DMSO, Dimethylsulfoxid; DMA, Dimethylacetamid; in Klammern  
 angegeben ist die Endkonzentration

$$V_K = \frac{Ce/Ca \cdot V_{sp}}{1 - Ce/Ca}$$

Volumen Kryoprotektivum ( $V_K$ )  
 Endkonzentration Kryoprotektivum ( $Ce$ )  
 Anfangskonzentration Kryoprotektivum ( $Ca$ )  
 Volumen Sperma + Kryoprotektivum ( $V_{SP}$ )

Abbildung 19: Berechnung der Endkonzentration der Kryoprotektiva

### 3.4.5 Evaluierung der Kühlrate

Im Zuge der Kühlratenevaluierung wurden zwei verschiedene Methoden der schnellen Abkühlung und eine Methode der langsamen Abkühlung der Spermaproben miteinander verglichen. Hierzu war es wiederum notwendig, die Einzelejakulate von 10 Nymphensittichhähnen einer kurzen, vorläufigen Qualitätsuntersuchung (s. Kap. 3.3.1) zu

unterziehen, bevor sie zu einer Gesamtprobe gepoolt wurden. Einzelejakulate, die bereits makroskopisch Verunreinigungen wie Harnsäure oder Kot enthielten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Proben von zufriedenstellender Qualität (keine Verunreinigungen, geschätzte Spermiedichte in der Kapillare  $\geq 2$ ) wurden in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gepoolt. Die native Spermaprobe wurde den Ergebnissen der Verdünnerevaluierung entsprechend (s. Kap. 4.2.2) bei Raumtemperatur zunächst mit dem besten Verdünner in der besten Verdünnungsstufe versetzt. Den Verfahren entsprechend wurde das Einfrieren mit oder ohne Kryoprotektivum versucht, wobei das Kryoprotektivum in der zuvor evaluierten günstigen Konzentration eingesetzt wurde. Das weitere Vorgehen wird detailliert in den folgenden Abschnitten erläutert. Insgesamt wurden 35 Spermapoolproben der Kühlratenevaluierung unterzogen.

### **3.4.5.1 Schnelle Kühlrate**

#### **3.4.5.1.1 Vitrifikation**

Die Vitrifikation wurde entsprechend der Beschreibungen der zur Verfügung stehenden Literatur an Proben vorgenommen, denen kein Kryoprotektivum zugesetzt wurde (NAWROTH U. A., 2002; ISACHENKO U. A., 2003, 2004). Zur Vitrifikation diente eine kommerziell erhältliche Vitrifikationseinheit (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) (Abbildung 20). Gemäß Herstellerangaben wurde jede Edelstahlkammer vor jeder Benutzung gründlich mit einem alkoholischen Flächendesinfektionsmittel (AHK Spiritus, Walter Schmidt Chemie GmbH, Berlin, Deutschland) gesäubert, bevor die Kammern [Abbildung 20; (1-3)] bis zu den jeweiligen Markierungen mit flüssigem Stickstoff (LN<sub>2</sub>) befüllt wurden. Proben, die zur Vitrifikation vorgesehen waren, wurden folgendermaßen behandelt: Aus der mit Spermaverdünner versetzten Poolprobe wurden Aliquots zu jeweils 10 µl durch Kapillarkräfte in OPS Röhrchen (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) [Abbildung 21; (1)] gesaugt und unverzüglich durch schnelles Eintauchen der die Flüssigkeit enthaltenen Spitze des Röhrchens in Kammer 2 [Abbildung 20; (2)] vitrifiziert. Mit der größeren Edelstahlpinzette [Abbildung 20; (4)] wurde ein durch den aufsteigenden Dampf des flüssigen Stickstoffs in Kammer 1 befindlicher, vorgekühlter Aufbewahrungsbehälter [Abbildung 21; (2)] gegriffen und sogleich das OPS Röhrchen darin versenkt. Zwischen der

Spermalösung und der Wand des Ministraws bestand auf Grund des konkaven Flüssigkeitsmeniskus innerhalb des OPS Röhrchens kein Kontakt. Der Ministraw wurde durch die mit Hilfe eines Bunsenbrenners (LABOGAZ®, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) erhitzten Pinzettenschenkel hermetisch versiegelt. Der so verschlossene Straw wurde nun in einer vorgekühlten Flachkassette [Abbildung 21; (3)] aus Kammer 3 verstaut, die wiederum schnellstmöglich zurück in der mit LN2 gefüllten Kammer 3 versenkt wurde. Sobald alle aus der Poolprobe gewonnenen Einzelproben auf die beschriebene Weise vitrifiziert wurden, erfolgte die Überführung der Flachkassetten in den mit LN2 befüllten transportablen Stickstoffcontainer (TW CX 100, Taylor-Wharton Germany GmbH, Mildstedt, Deutschland). Insgesamt wurden vier Spermepoolproben auf diese Weise in sechzehn Einzelproben aliquotiert und vitrifiziert.



Abbildung 20: Vitrifikationsset der Firma Minitüb GmbH

Kammer zur Vorkühlung der OPS Behälter (1);  
 Vitrifikationskammer (2); Aufbewahrungskammer für  
 Flachkassetten (3); Edelstahlpinzetten (4);  
 Edelstahlblock zur Fixierung der OPS Behälter (5); OPS  
 Röhrchen & Behälter (6); Flachkassette zur  
 Aufbewahrung der Behälter (7)  
 (Quelle: [www.minitube.de](http://www.minitube.de))

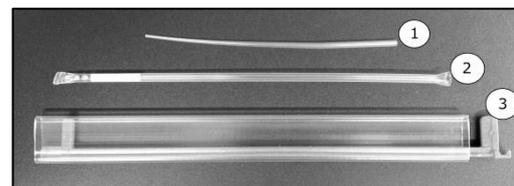


Abbildung 21: Vitrifikationszubehör der Firma Minitüb GmbH

OPS Röhrchen (1); Behälter zur Aufbewahrung  
 von OPS Röhrchen mit trichterförmiger Öffnung  
 (2); Flachkassette (3)

Zusätzlich wurden vier Spermapoolproben versuchsweise mit CryoSOfree™ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) vitrifiziert. Hierzu wurden die mit Spermaverdünner versetzten Poolproben mit CryoSOfree™ nach Herstellerangaben in 7,5%iger Endkonzentration versetzt. Aus jeder Poolprobe wurden vier Aliquots zu jeweils 10 µl durch Kapillarkräfte in OPS Röhrchen (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) gesaugt und nach der beschriebenen Methode vitrifiziert. Insgesamt ergaben sich so 16 Einzelproben zur Untersuchung. Anschließend wurden die Proben analog zu den Proben ohne Kryoprotektivum in Ministraws hermetisch versiegelt und in Flachkassetten bis zur weiteren Untersuchung im flüssigen Stickstoff gelagert.

#### **3.4.5.1.2 Direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff**

Die gepoolte Spermaprobe wurde zunächst mit dem besten Spermaverdünner in entsprechender Verdünnungsstufe versetzt. Nachfolgend wurde ein Kryoprotektivum zugesetzt, wie es in Kapitel 3.4.4 beschrieben ist. Im ursprünglichen Versuchsvorhaben war lediglich die Evaluierung des besten Kryoprotektivums vorgesehen. Jedoch ergab sich die Fragestellung, ob das schnelle Einfrieren die Toxizität der Kryoprotektiva möglicherweise abschwächen könnte. Daher wurde, abweichend vom ursprünglichen Versuchsplan, jedes der drei evaluierten Kryoprotektiva (DMA, DMSO, Glycerin) sowohl in 8%iger, als auch in 12%iger Konzentration untersucht. Aus insgesamt 12 Spermapoolproben wurden 24 Aliquots von jeweils 20 µl mit einer Pipette (PIPETMAN Classic™ P20, Gilson Inc., Middleton, WI, USA) in sterile Polytetrafluoroethylen (PTFE)-Schläuche (Innendurchmesser 0,5 mm, Außendurchmesser 1 mm, Bohlender GmbH, Grünsfeld, Deutschland) gegeben. Die Enden des PTFE Schlauchs wurden mittels Assistent® Wachs (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) luftdicht verschlossen. Jeweils ein befüllter PTFE-Schlauch wurde in einen Ministraw (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) gegeben, der wiederum mit Hilfe einer 2 ml-Einmalspritze (BD Discardit® Einmalspritzen, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit dem Kryo-Verdünner befüllt wurde. Der Ministraw wurde mit einer Metall-Verschlusskugel (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) verschlossen und sofort in eine mit LN2 befüllte Edelstahlwanne fallen gelassen. Mit Hilfe einer Edelstahlpinzette wurde der Ministraw dann in den transportablen Stickstoffcontainer

(TW CX 100, Taylor-Wharton Germany GmbH, Mildstedt, Deutschland) befördert und mindestens 24 Stunden gelagert.

### **3.4.5.2 Langsame Kühlrate**

#### **3.4.5.2.1 Kalibrierung des Einfrierautomats**

Zur kontrollierten Tiefgefrierung des Spermas wurde von der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen freundlicherweise der programmierbare Einfrierautomat IceCube 14S (SY-LAB Geräte GmbH, Neupurkersdorf, Österreich) mit dazugehöriger IceCube Freezersoftware zur Verfügung gestellt. Der Einfrierautomat wurde gemäß Herstellerangaben an eine mit LN<sub>2</sub> befüllte Stickstofftonne angeschlossen. Vor der Nutzung musste das Gerät jedoch zunächst auf den zu verwendenden Kryo-Verdüner kalibriert werden. Hierzu wurde ein Testprogramm erstellt, um die probenspezifische Kristallisationstemperatur zu evaluieren. Für jede andersartige Probe musste eine eigene Programmkurve gefunden werden. Wird das Einfrierbehältnis geändert (z.B. das Ampullenmaterial), so muss auch in diesem Fall die Einfrierkurve neu optimiert werden. Demzufolge wurde ein Ministraw mit dem vorgekühlten (+4 °C) Verdünner/Kryoprotektivum-Gemisch befüllt und auf dem Probengestell positioniert. Der Probentempersensor des Automaten wurde vollständig im Zentrum der Probe eingetaucht, während der Kammertempersensor in seiner Halterung an der Wand des Gerätes verblieb. In einem ersten Schritt wurde die Probe auf die Temperatur von 0 °C gebracht, welche für den Zeitraum von fünf Minuten gehalten wurde. Um den Kristallisationspunkt des flüssigen Probenmediums feststellen zu können, musste die Gefrierkammer langsam auf eine niedrige Temperatur gebracht werden, wozu eine Kühlrate von -3 °C/min. gewählt wurde. Der Kristallisationspunkt der Probe war an einem Anstieg der Probentemperatur ersichtlich, die sich aus der bei durch die Kristallisationsenergie frei werdene Wärme erklärt (Abbildung 22). Das Temperaturprofil musste nun insoweit optimiert werden, dass die Wärme schnellstmöglich abgeführt bzw. kompensiert werden konnte und der Temperaturanstieg der Probe so gering wie möglich ausfiel.



Abbildung 22: Kalibrierung des Einfrierautomaten:

Anstieg der Proben­temperatur (blau) im Vergleich zur Kam­mertemperatur (rot) am Kristallisationspunkt. Angestrebter Temperaturverlauf (grün)



Abbildung 23: Kalibrierung des Einfrierautomaten:

Ausgleich des Anstiegs der Proben­temperatur (blau) durch rasches Absenken der Kam­mertemperatur (rot) am Kristallisationspunkt. Angestrebter Temperaturverlauf (grün) „automatic seeding“

Da die Kristallisation bei einer Kammertemperatur von  $-12\text{ °C}$  selbstständig ausgelöst wurde, musste das Programm insofern geändert werden, dass die Kammertemperatur bereits vor Erreichen der  $-12\text{ °C}$  auf einen tieferen Wert gebracht wurde (Abbildung 23), um die Kristallisation schon vor der eigentlichen Selbstkristallisation auszulösen. Dieser Vorgang, der „automatic seeding“ genannt wird, war notwendig, um der Erwärmung der Probe entgegenzuwirken. Sobald ein zufriedenstellender Ausgleich des Temperaturanstiegs der Probe ( $\Delta \leq 3\text{ °C}$ ) erreicht war, wurde ein Testdurchlauf mit einer Spermaprobe unternommen. Ergaben sich im Verlauf der Einfrierkurve Abweichungen im Vergleich zum Testdurchlauf, so mussten die Optimierungsschritte erneut manuell angepasst und verifiziert werden.

#### **3.4.5.2.2 Computergestütztes kontrolliertes Einfrieren von Sperma**

Nach Erhalt eines zufriedenstellenden Einfrierprotokolls (s. Kap. 4.2.4.2.1) erfolgte nun das computergestützte kontrollierte Einfrieren von 15 gepoolten Spermaproben, die durch Aliquotierung in 30 Einzelproben geteilt wurden. Hierzu wurden die verdünnten, gepoolten Spermaproben den Ergebnissen der Kryoprotektivaevaluierung entsprechend (s. Kap. 4.2.3) mit dem Kryoprotektivum versetzt wie es in Kapitel 3.4.4 beschrieben ist. Aliquots von jeweils  $20\text{ }\mu\text{l}$  wurden mit einer Pipette (PIPETMAN Classic™ P20, Gilson Inc., Middleton, WI, USA) in sterile Polytetrafluoroethylen (PTFE)-Schläuche (Innendurchmesser  $0,5\text{ mm}$ , Außendurchmesser  $1\text{ mm}$ , Bohlender GmbH, Grünsfeld, Deutschland) gegeben. Die Enden des PTFE Schlauchs wurden mittels Assistent® Wachs (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) luftdicht verschlossen. Jeweils ein befüllter PTFE-Schlauch wurde in einen Ministraw (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) gegeben, der wiederum mit Hilfe einer  $2\text{ ml}$ -Einmalspritze (BD Discardit® Einmalspritzen, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit dem Kryo-Verdünner befüllt wurde. Der Ministraw wurde mit einer Metall-Verschlusskugel (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) verschlossen, in eine mit kaltem Wasser ( $+4\text{ °C}$ ) und Kühlakkus gefüllte Kühlbox verbracht. Der Transport zum Einfrierautomaten dauerte ca. fünf Minuten. Dort wurde der IceCube 14S gemäß Herstellerangaben an die LN<sub>2</sub>-Quelle angeschlossen und die IceCube Freezingsoftware gestartet. Die Proben wurden auf dem Probengestell platziert und eine Probe wurde mit dem Probentempersensoren bestückt, um den Temperaturverlauf kontrollieren zu

können (Abbildung 24). Das optimierte Programm wurde gestartet und nach Erreichen der Endtemperatur (ca.  $-145\text{ °C}$ ) erfolgte das Überführen der Proben in den transportablen Stickstoffcontainer (TW CX 100, Taylor-Wharton Germany GmbH, Mildstedt, Deutschland), wo sie für mindestens 24 Stunden gelagert wurden.



Abbildung 24: Kompletter Verlauf eines Einfriervorgangs einer Probe mit Hilfe des Einfrierautomaten. Angestrebter Temperaturverlauf (grün); Kammertemperatur (rot); Probestemperatur (blau)

### 3.4.6 Evaluierung verschiedener Auftau- bzw. Erwärmmethoden

Zunächst war vorgesehen, die kryokonservierten Spermaproben aus dem Stickstoffcontainer ausschließlich durch schnelles Überführen in ein  $+4\text{ °C}$  kaltes Eiswasserbad aufzutauen, da sich diese Methode als zuverlässig bei anderen Vogelspezies erwiesen hatte (BAKST UND SEXTON, 1979; BLANCO U. A., 2011; EHLING U. A., 2012). Alle Proben, die durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff und durch langsames, kontrolliertes Einfrieren gekühlt wurden, wurden ausschließlich durch die Kaltwasserbadmethode aufgetaut. An den vitrifizierten Proben wurden zusätzlich sechs weitere Erwärmmethoden vorgenommen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

### 3.4.6.1 Kaltwasserbad

Insgesamt wurden 54 Einzelproben, die durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff, bzw. mit Hilfe des Einfrierautomaten tiefgefroren wurden (direktes Eintauchen,  $n = 24$ ; IceCube,  $n = 30$ ), auf diese Weise evaluiert. Alle Proben wurden mindestens 24 Stunden in LN<sub>2</sub> gelagert, bevor sie aufgetaut und evaluiert wurden. Die Ministraws, die die tiefgefrorene Spermisuspension enthielten, wurden mit Hilfe einer Edelstahlpinzette aus dem transportablen Stickstoffcontainer in eine mit kaltem Wasser (+4 °C) und Kühlakkus gefüllten Kühlbox verbracht. Dort wurden sie für fünf Minuten waagrecht gelagert (EHLING U. A., 2012). Nach der Äquilibrierungszeit wurden die Ministraws dem Wasserbad mit einer Edelstahlpinzette entnommen und mittels Scherenschlag geöffnet. Der PTFE Schlauch wurde dem Ministraw mit einer Edelstahlpinzette entnommen und die Wachsversiegelung des Schlauches mittels Scherenschlag entfernt. Die im PTFE-Schlauch enthaltene Spermaprobe wurde nun in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 0,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Dieses wiederum wurde kurz (< 1 Minute) in ein warmes Wasserbad (+37 °C) gestellt und anschließend der Qualitätsuntersuchung zugeführt. Es wurde die Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit evaluiert, sowie eine Vitalitätsanalyse, nach den in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Methoden durchgeführt.

Zusätzlich wurden vier Einzelproben, die zuvor durch Vitrifikation eingefroren wurden, durch die Kaltwassermethode erwärmt. Hierzu wurde die Flachkassette mit den enthaltenen Ministraws nur so weit aus dem Stickstoffcontainer gehoben, dass die Spermisuspension in den OPS Röhrchen sich noch im flüssigen Stickstoff befand. Auf diese Weise fand kein unbeabsichtigtes Erwärmen statt. Nun wurde der Ministraw mit dem enthaltenen OPS Röhrchen mit einer Edelstahlpinzette gepackt und sehr zügig in das Kaltwasserbad überführt. Dort wurde die Probe auf einer waagrecht Edelstahlhaltervorrichtung [Abbildung 20 (5)] abgelegt, sodass kein Verkippen im Wasser möglich war. Nach einer Äquilibrierungszeit von unter einer Minute wurden die Ministraws mit einer Edelstahlpinzette fixiert und mittels Scherenschlag geöffnet. Das OPS Röhrchen wurde mit der Edelstahlpinzette entnommen und die Spermaprobe sofort in Reaktionsgefäße (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 0,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Hierzu wurde das OPS Röhrchen mit dem distalen, die

Spermiensuspension enthaltenen Teil, vertikal in das Reaktionsgefäß gestellt. Die Spermasuspension folgte nun der Schwerkraft und lief in das Eppendorfggefäß. Anschließend wurde die Probe einer Qualitätsuntersuchung (MOT, PMOT, Vitalität), nach den in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Methoden zugeführt. Im Rahmen der Spermivitrifikation ergab sich jedoch die Fragestellung, ob die schlechten Ergebnisse nach Erwärmen der Proben auf eine zu langsame Erwärmgeschwindigkeit zurückzuführen sein könnten. Daher wurden die verbliebenen vitrifizierten Spermproben zusätzlich zur Kaltwasserbadmethode vergleichend mit allen nachfolgend beschriebenen Methoden erwärmt.

#### **3.4.6.2 Warmwasserbad**

Vier weitere Einzelproben der Vitrifikation wurden durch Überführung in ein 37 °C-Warmwasserbad erwärmt. Der Ministraw mit dem enthaltenen OPS Röhrchen wurde dem Stickstoffcontainer nach der im vorigen Kapitel beschriebenen Weise entnommen. Der Ministraw wurde nun statt in das Kaltwasserbad in ein Warmwasserbad (Köttermann Wärmebad, Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland) (+37 °C) verbracht, wo er kurz (> 1 Minute) waagrecht gelagert wurde. Nach der Äquilibrierungszeit wurde der Ministraw mit einer Edelstahlpinzette fixiert und mittels Scherenschlag geöffnet. Das OPS Röhrchen wurde mit der Edelstahlpinzette entnommen und die Spermprobe sofort in Reaktionsgefäße (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 0,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Hierzu wurde das OPS Röhrchen mit dem distalen, die Spermiensuspension enthaltenen Teil, vertikal in das Reaktionsgefäß gestellt. Die Spermasuspension folgte nun der Schwerkraft und lief in das Eppendorfggefäß. Anschließend wurde die Probe einer Qualitätsuntersuchung (MOT, PMOT, Vitalität) nach den in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Methoden zugeführt.

#### **3.4.6.3 Kaltwasserbad und Raumtemperatur**

Das Erwärmen der vier Einzelproben erfolgte zunächst analog zu Kapitel 3.4.6.1. Bevor die Probe aber in das Warmwasserbad gestellt wurde, erfolgte eine zusätzliche Äquilibrierungszeit von zehn Minuten bei Raumtemperatur. Erst danach wurde die Probe kurz (< 1 Minute) angewärmt und danach der Qualitätsuntersuchung unterzogen.

#### **3.4.6.4 Kaltwasserbad und Warmwasserbad**

Das Erwärmen der vier Einzelproben erfolgte zunächst analog zu Kapitel 3.4.6.1, jedoch wurde vor dem Öffnen der Ministraws eine zweite Äquilibrierungsphase analog zu Kapitel 3.4.6.2 angeschlossen. Anschließend wurden die Proben hinsichtlich ihrer Qualität beurteilt.

#### **3.4.6.5 Raumtemperatur**

Weitere vier Einzelproben wurden erwärmt, indem das OPS Röhrchen sofort nach der Entnahme des Ministraws aus dem Stickstoffcontainer entfernt wurde und bei Raumtemperatur aufrecht in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 0,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gestellt wurde, worin sich bereits 20 µl modifizierter Lake-Verdünner befand. Die durch den Erwärmprozess wieder flüssig werdende Probe konnte so im Reaktionsgefäß aufgefangen und sofort einer Qualitätsuntersuchung unterzogen werden.

#### **3.4.6.6 Brutschrank**

Vier Einzelproben wurden zunächst analog dem Erwärmprozess im vorher beschriebenen Kapitel (3.4.6.5) behandelt, jedoch wurde das Reaktionsgefäß statt bei Raumtemperatur fünf Minuten lang im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt (Cellstar, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) aufbewahrt, bevor die Qualitätsuntersuchungen angeschlossen wurden.

#### **3.4.6.7 Kommerzielles Erwärmkit**

Vier vitrifizierte Einzelproben wurden mit Hilfe des kommerziellen Vitrifikations-Erwärmkits Vit Kit®-Thaw (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) nach Herstellerangaben erwärmt. Dazu wurde eine Petrischale (Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland) auf einer Heizmatte (Reptiland 8 W, Trixie Heimtierbedarf GmbH & Co. KG, Tarp, Deutschland) positioniert und auf ca. 37 °C erwärmt. In der Petrischale wurden jeweils ein Tropfen à 50 µl der Erwärmflüssigkeit [Thawing Solution (TS)] und der Verdünnerflüssigkeit [Dilution Solution (DS)], sowie zwei Tropfen à 50 µl der Waschflüssigkeit [Washing Solution (WS)]

aufgebracht (Abbildung 25). Die Flachkassette wurde geöffnet, der Ministraw nur so weit vorgelagert, dass sich die vitrifizierte Flüssigkeit im Inneren des OPS Röhrchens noch im LN2 befand und der Ministraw mit Hilfe einer Schere geöffnet. Das OPS Röhrchen wurde mit einer Edelstahlpinzette gegriffen und sofort mit dem schmalen Ende aufrecht in den Tropfen der TS getaucht, sodass sich das Spermium beim Auftauen, der Schwerkraft folgend, mit der TS vermischt. Nach einer Wartezeit von 1 Minute wurde der komplette Tropfen mit Hilfe einer Pipette (PIPETMAN Classic™ P200, Gilson Inc., Middleton, WI, USA) aufgesogen und in den Tropfen der DS überführt. Nach weiteren 4 Minuten Wartezeit wurde dieser Tropfen in den ersten Tropfen WS pipettiert, woraufhin ein zweiter Waschschritt nach 4 Minuten erfolgte (Abbildung 25). Hiernach wurde die gesamte Flüssigkeit in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 0,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verbracht und der Qualitätsuntersuchung unterzogen.

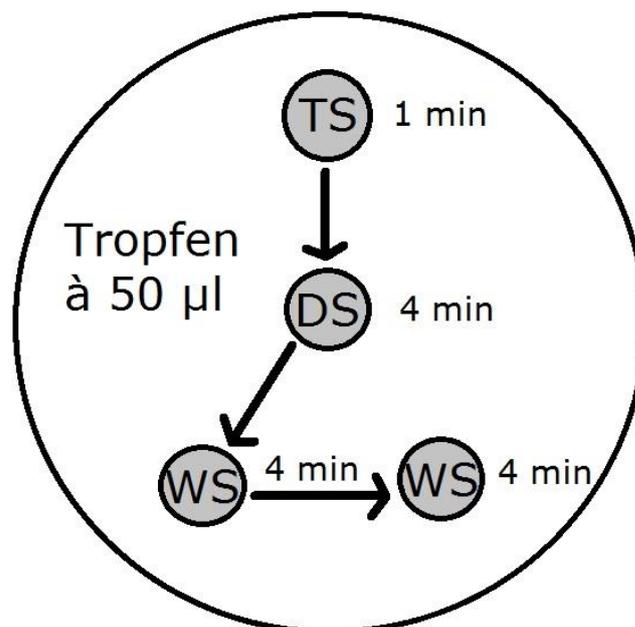


Abbildung 25: Vorgehen beim Erwärmen mit Hilfe des Vit Kit®-Thaw nach Herstellerangaben  
Erwärmflüssigkeit [Thawing Solution (TS)]; Verdünnerflüssigkeit [Dilution Solution (DS)]; Waschflüssigkeit [Washing Solution (WS)]

### 3.4.7 Transmissionselektronenmikroskopie

Zum Abschluss der Versuche wurde eine weitere Poolspermaprobe mit dem besten Verdünner/Kryoprotektivum-Gemisch gemäß den Methoden aus den Kapiteln 3.4.3 und 3.4.4 versetzt. Das Einfrieren der Probe erfolgte mit Hilfe des programmierbaren Einfrierautomaten gemäß der Methode aus Kapitel 3.4.5.2.2, während die Probe nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden bei +4 °C im Wasserbad (s. Kap.3.4.6.1) aufgetaut wurde. Die nachfolgende Behandlung zur Herstellung ultradünner Schnitte für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Spermienplasmamembran wurde bereits ausführlich in Kapitel 3.3.4 beschrieben. Es wurden insgesamt 100 Spermienabschnitte auf Plasmamembranschäden hin untersucht und mit den Ergebnissen der Fluoreszenzfärbung verglichen.

### 3.4.8 Fertilisationsversuch

Durch die schrittweise Evaluation der Spermazusätze (Verdünner, Kryoprotektiva), sowie des Einflusses der Einfrierrate konnte ein In-vitro-Protokoll zur Kryokonservierung von Nymphensittichspermien entwickelt werden. Um die tatsächliche Befruchtungsfähigkeit der kryokonservierten Spermien zu untersuchen, war nun das Tieffrieren weiterer Spermaproben anhand des entwickelten Protokolls notwendig. Diese Proben wurden nach dem Auftauen/Erwärmen vergleichend zu Frischspermaproben durch artifizielle Insemination auf ihre Befruchtungsfähigkeit evaluiert. In den zwei Gruppen, die jeweils aus zehn adulten Hennen bestanden, wurden jeweils zwei Inseminationsexperimente durchgeführt. Zur Anregung des normalen Reproduktionsverhaltens der Hennen war die Vergesellschaftung mit männlichen Partnertieren essentiell. Zum Ausschluss einer natürlichen Befruchtung war es demzufolge notwendig, die männlichen Partnertiere vor der Vergesellschaftung zu sterilisieren (SAMOUR, 2002; NEUMANN U. A., 2013) (s. Kap. 3.4.8.1). Zuerst wurden die weiblichen Tiere aus Gruppe 1 mit Frischspermaproben nach bekannten Methoden nach NEUMANN U. A. (2013) inseminiert (s. Kap. 3.4.8.2.1). Vergleichend erhielten die Weibchen der Gruppe 2 aufgetaute Spermaproben, die zuvor nach dem entwickelten Protokoll behandelt und kryokonserviert wurden (s. Kap. 3.4.8.2.2). Im zweiten Teil des Experimentes wurden die Gruppen getauscht, um individuelle Einflüsse der Hennen auszuschließen. Jedem Inseminationsexperiment folgte

eine Brutperiode, in der die gelegten Eier nummeriert und hinsichtlich Embryonalentwicklung untersucht wurden. Die Vorbereitung und detaillierte Durchführung der Fertilisationsversuche werden im Folgenden beschrieben.

### 3.4.8.1 Endoskopische Sterilisation von männlichen Nymphensittichen

#### 3.4.8.1.1 Technische Ausrüstung

Zwanzig adulte Nymphensittichhähne wurden nach den Methoden von LIERZ (2008) vasktomiert. Die Sterilisationen wurden endoskopisch mit der Videoeinheit Karl Storz (scb image 1 hub 222000 20) und der Kaltlichtquelle Karl Storz (xenon nova 201315 20 175), zusammen mit einem Telecam Ein-Chip-Kamerakopf und einem 170 cm langen Fiberglas Lichtkabel (Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) durchgeführt. Zur Fotodokumentation diente ein LCD-Monitor (Samsung Electronics GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland). Als weitere endoskopische Instrumente wurden eine starre Hopkins® Vorausblick-Optik 30° (Durchmesser 2,7 mm, Länge 18 cm) ein Vogel-Untersuchungsschaft (14,5 Charr., Nutzlänge 14 cm) mit Arbeitskanal (5 Charr.) und zwei Hähnen einschließlich stumpfem Obturator sowie eine flexible Biopsiezange (5 Charr., Länge 34 cm) und eine flexible Faszange (5 Charr., Länge 34 cm) (Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) (Abbildung 26) verwendet.

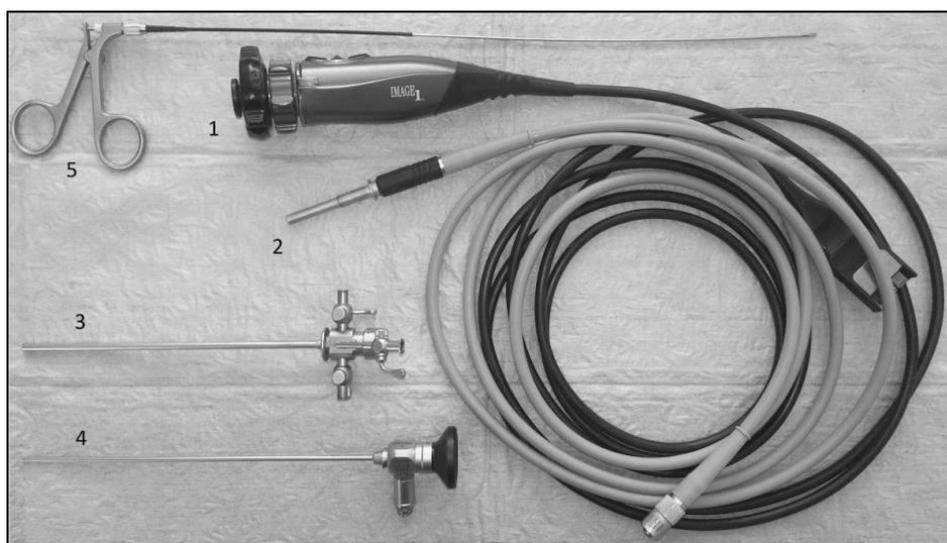


Abbildung 26: Technische Ausrüstung zur endoskopischen Sterilisation  
Kamerakopf (1); Lichtkabel (2); Vogel-Untersuchungsschaft (3); Vorausblick-Optik (4); flexible Biopsiezange (5)

### 3.4.8.1.2 Vorbereitung und Durchführung der endoskopischen Sterilisation

Die zur Vasektomie vorgesehenen Tiere wurden am Morgen des Eingriffes einer eingehenden klinischen Untersuchung unterzogen. Nur Tiere, deren allgemeiner Zustand als einwandfrei beurteilt wurde, kamen für die Vasektomie in Betracht. Den Vögeln wurde zwei Stunden vor Beginn des Eingriffes das Futter entzogen, um uneingeschränkte Sicht in der Zölohmöhle durch entleerte Darmschlingen zu gewährleisten und das Risiko einer Futteraspiration zu minimieren (LIERZ, 2011; TAYLOR, 1994). Die Einleitung der Allgemeinanästhesie erfolgte mit 5 Vol.-% Isofluran (Isosthesia® 1000 mg/g, Henry Schein VET GmbH, Hamburg, Deutschland) mit einem Sauerstoff-Flow von ca. 1 l/min über eine Kopfmaske. Nach Erreichen des Toleranzstadiums erfolgte die Narkoseerhaltung bei 0,8 – 2,5 Vol.-% Isofluran bei gleichbleibendem Flow. Während des endoskopischen Eingriffes wurde das Vorhandensein von Spontanatmung und Reflexen regelmäßig visuell kontrolliert (LIERZ UND KORBEL, 2012). Der Puls wurde dauerhaft mittels eines Dopplers an der oberflächlichen Flügelarterie (*A. ulnaris superficialis*) überwacht. Auf eine Überwachung des Blutdrucks wurde wegen der kurzen Operationsdauer verzichtet. An der Inzisionsstelle wurde Schmerzfreiheit durch die subkutane Applikation von 2 % Lidocainhydrochlorid (< 1 mg/kg KGW) (Lidocain-HCl, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zur Lokalanästhesie gewährleistet. Zur analgetischen Abdeckung wurde jedem Tier ein nicht-steroidales Antiphlogistikum (NSAID) (Meloxicam, 1 mg/kg KGW) (Meloxivet 1,5 mg/ml, Elanco Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) intragluvial appliziert (CARPENTER, 2012). Der endoskopische Eingriff erfolgte nach etablierten Methoden (LIERZ, 2008). Der Zugang zur Körperhöhle erfolgte in rechter Seitenlage mit nach dorsal ausgestreckten Flügeln zunächst von der linken Flanke. Hierzu wurde das Bein nach kranial gelagert und die Federn ventral des Synsacrum und hinter der letzten Rippe mithilfe eines alkoholischen Desinfektionsmittels (Kodan® Tinktur forte farblos, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) gescheitelt. Der Zugangspunkt, der sich durch den Schnittpunkt der achten Rippe mit dem *M. flexor cruris medialis* bestimmte, wurde zusätzlich mit einem jodhaltigen Hautdesinfektionsmittel (Braunol®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Dieser Zugang wurde gewählt, um eine größtmögliche Visualisierung der abdominalen Strukturen zu gewährleisten (TAYLOR, 1994). Ein kleiner Hautschnitt (ca. 2 mm) ermöglichte die Sicht auf die semimembranöse Faszie des *M. flexor cruris medialis*, die mit einer gebogenen

Arterienklemme nach Halsted-Mosquito stumpf von der Bauchwand abpräpariert wurde. Daraufhin wurde der Muskel nach dorsal angehoben und die Bauchwand unmittelbar hinter der letzten Rippe mit der Klemme stumpf durchstoßen. Die durch das entstandene ca. 4 x 4 mm große Loch eingeführte starre 30° Operationsoptik ermöglichte die Sicht in den kaudalen thorakalen Luftsack [Abbildung 27; (A)]. Zunächst erfolgte die Beurteilung von Lunge, Herz, Perikard, Luftsackmembranen und Leber hinsichtlich makroskopischer Veränderungen, bevor der Abdominal-Luftsack durch Durchstoßen der begrenzenden Luftsackmembran aufgesucht wurde. Auch hier erfolgte die Beurteilung der inneren Organe (Drüsenmagen, Darm, Milz, Niere, Nebenniere und Gonaden) [Abbildung 27; (B)]. Der Samenleiter (*Ductus deferens*) wurde nach kaudal bis zur Kloake hin verfolgt, um eine Stelle zu finden an der die Trennung des Samenleiters aus dem gemeinsamen Gekröse mit dem Harnleiter (*Ureter*) am risikoärmsten erschien [Abbildung 27; (C & D)]. Die Sterilisation erfolgte nach der von LIERZ (2008) beschriebenen Methode, indem eine flexible Biopsiezange durch den Arbeitskanal eingeführt wurde, mit der der Samenleiter erfasst [Abbildung 27; (E)] und durch leichten Zug vom parallel verlaufenden Harnleiter getrennt wurde [Abbildung 27; (F)]. Nach ausreichender Mobilisation des Samenleiters wurde durch stärkeren Zug und gleichzeitiges Zurückziehen des Endoskops ein ca. 1 cm großes Stück des Samenleiters entfernt, um ein Zusammenwachsen der getrennten Enden zu verhindern (LIERZ, 2008). Da bei männlichen Vögeln die Geschlechtsorgane bilateral vorhanden sind, erfolgte nach erfolgreicher partieller Vasektomie der linken Seite die analoge Durchführung auf der rechten Körperseite. Nach Entfernung des Endoskops wurden die Hautwunden mittels eines U-Heftes mit resorbierbarem, geflochtenen Polyglactin 910 (Ethicon® Vicryl Plus 4-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Deutschland) verschlossen. Nach Beendigung der Narkose verblieben die Tiere in der Hand des Untersuchers unter Beobachtung bis sie wieder vollständig ansprechbar waren. Postanästhetische Überwachungsmaßnahmen wurden noch fortgeführt bis die Vögel wieder in der Lage waren, wie gewohnt auf der Stange zu sitzen (LIERZ UND KORBEL, 2012).

Der Erfolg der Methode wurde durch vier komplett infertile Gelege pro Brutpaar verifiziert. Die Infertilität eines jeden gelegten Eis wurde durch mehrfaches Schieren und den Einsatz eines digitalen Eiermonitors (Buddy, Avitronics, Avian Biotech International, Tallahassee, FL, USA) überprüft.

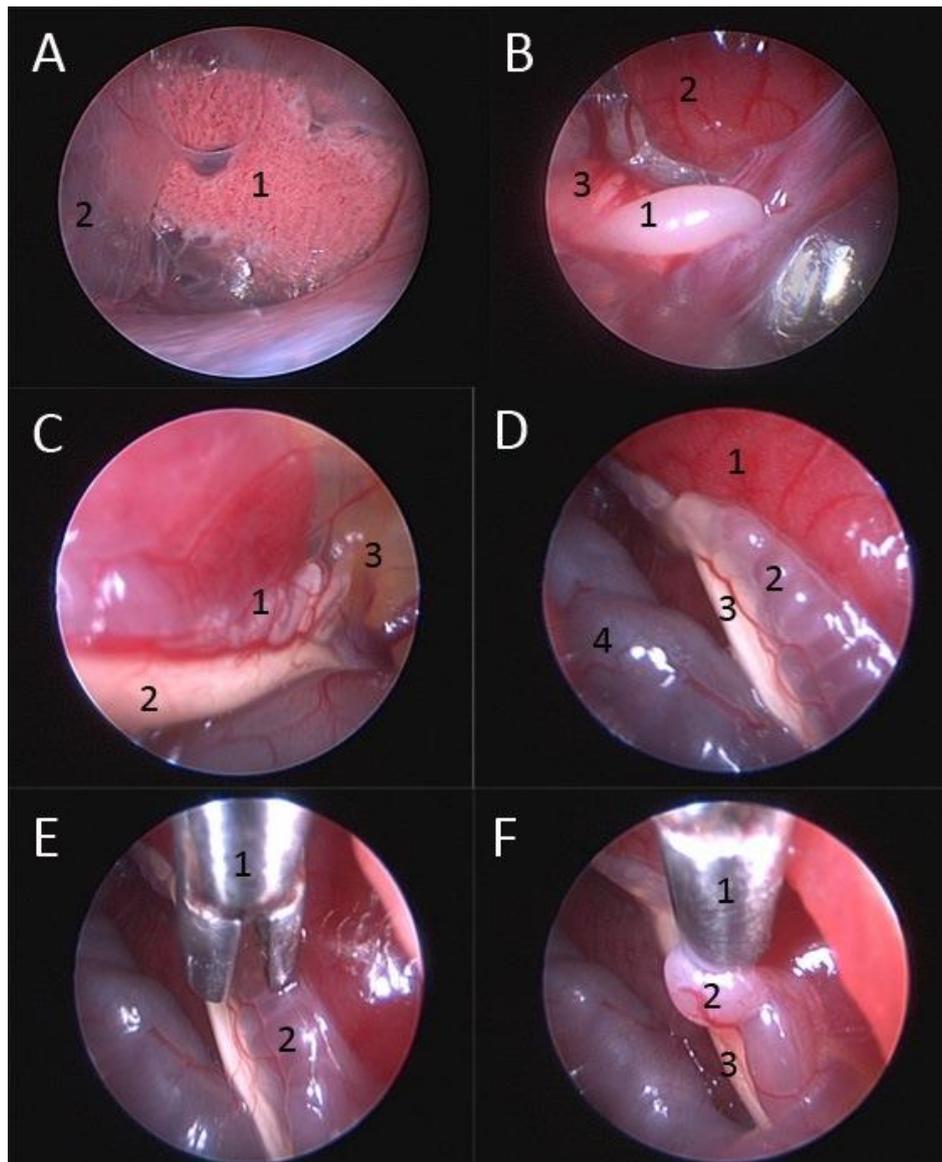


Abbildung 27: Endoskopische Sterilisation der männlichen Nymphensittiche (*Nymphicus hollandicus*) (A) linke Lunge (1), Luftsackgrenze zwischen kranialem und kaudalem thorakalen Luftsack (2); (B) linker Hoden (1), kranialer Nierenpol (2), linke Nebenniere (3); (C) Samenleiter (*Ductus deferens*) (1), Harnleiter (*Ureter*) (2), Kloake (3); (D) Niere (1), Samenleiter (2), Harnleiter (3), Darm (4); (E) mit der flexiblen Biopsiezange (1) wird der Samenleiter (2) gefasst; (F) durch leichten Zug mit Hilfe der flexiblen Biopsiezange (1) wird der Samenleiter (2) vom Harnleiter (3) gelöst

#### 3.4.8.2 Artificielle Insemination von weiblichen Nymphensittichen

Das Experiment wurde als Cross-over Versuch gestaltet, um individuelle Einflüsse der Hennen auf die Anzahl der gelegten Eier, die Toleranz der inseminierten Flüssigkeit oder den Befruchtungserfolg zu minimieren. Hierzu wurden die zwanzig Hennen zufällig in zwei Gruppen eingeteilt. Die zehn weiblichen Tiere aus Gruppe 1 wurden im ersten Teil des Experimentes ausschließlich mit Frischsperma inseminiert, während die zehn Hennen aus

Gruppe 2 Sperma erhielten, das mindestens 24 Stunden vor der Insemination mit den Methoden des entwickelten Protokolls tiefgefroren wurde. Im zweiten Teil des Experimentes verhielt es sich demzufolge umgekehrt und Hennen der Gruppe 1 erhielten TG-Sperma, während Gruppe 2 mit Frischsperma inseminiert wurde. Der Beginn des Inseminationsexperimentes wurde durch Beobachtung der Vögel und die Beurteilung ihres Verhaltens bestimmt. Ungefähr ein bis drei Tage vor der vermuteten Eiablage wurden mehrmals täglich Kopulationen der Paare, sowie regelmäßige Nistkasteninspektionen durch die Hennen beobachtet. Dies und die Ablage des ersten Eis des Geleges, wurde als Indikator für den Beginn der artifiziellen Inseminationen gesehen (NEUMANN U. A., 2013). Die AI-Techniken wurden bei allen Nymphensittichhennen drei Mal im Abstand von zwei Tagen durchgeführt, sofern die Legebereitschaft durch Palpation bestätigt wurde. Ungefähr eine Stunde vor der artifiziellen Insemination wurden die Tiere mit Hilfe eines Keschers aus der Gruppe herausgefangen und in einen kleineren Käfig (60 x 50 x 50 cm) in Hör- und Sichtweite zu ihren Partnern gesetzt, um einen Kot- und Urinabsatz vor der Insemination zu forcieren und somit das Risiko einer Kontamination des Eileiters mit Exkrementen zu minimieren. Das zu inseminierende Spermavolumen (Frischsperma oder TG-Sperma) wurde mit einer Pipette (PIPETMAN Classic™ P20, Gilson Inc., Middleton, WI, USA) in eine Pipettenspitze (20 µl, Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, Deutschland) aufgenommen. Pro Vogel wurde ein Volumen zwischen 8 und 15 µl mit einer Inseminationsdosis (Anzahl der Spermien/Inseminationsportion) von mindestens 250.000 Spermien inseminiert (Tabelle 4). Dies wurde von FISCHER U. A. (2014c) als die minimal notwendige Dosis zum Erreichen einer erfolgreichen Befruchtung angegeben. Auf die das Sperma enthaltende Pipettenspitze wurde eine Venenverweilkanüle (Vasofix® Braunüle® 24 G 0.7 x 19 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) aufgesetzt (Abbildung 28). Der Vogel wurde durch eine Hilfsperson in Rückenlage fixiert, wobei die Beine leicht zum Kopf des Tieres hin gezogen wurden, um das Sichtfeld des Untersuchers nicht einzuschränken (Abbildung 29). Die Kloake wurde mit angefeuchteten weichen Tüchern (Kleenex® Original, Kimberly-Clark GmbH, Koblenz, Deutschland) gereinigt und der Abstand zwischen den Legebeinen (*Ossa pubica*) wurde palpiert, um die Legebereitschaft zu bestätigen. Ein angewärmtes Nasenspekulum nach Hartmann-Halle (Schenkellänge 30 mm, 150 mm) (Henry Schein VET GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde in die Kloake eingeführt und vorsichtig gespreizt bis die Oviduktöffnung am linken

ventralen Bereich (rechts dorsal aus dem Blickwinkel des Untersuchers) des *Urodeums* sichtbar war. War die Oviduktöffnung nicht prominent erhaben und betrug der Abstand zwischen den Knochenenden weniger als 5 mm, wurde bei dem betreffenden Tier keine artifizielle Insemination durchgeführt. Gute Sicht wurde durch eine vom Untersucher getragene Stirnlampe (LED Lenser H7R.2, Zweibrüder Optoelectronics GmbH & Co. KG, Solingen, Germany) gewährleistet. Das weiche Ende der Venenverweilkanüle wurde 2 bis 4 mm tief intravaginal eingeführt (Abbildung 30) und der Stempel der Pipette zur vollständigen intravaginalen Instillation des Spermas bis zum Anschlag heruntergedrückt.



Abbildung 28: Vorbereitete Pipette zur artifiziellen Insemination von weiblichen Nymphensittichen Venenverweilkanüle (1), Pipettenspitze, das Sperma enthaltend (2), Pipette (3)

In Fällen, in denen keine intravaginale Insemination möglich war, weil die Tiere Abwehrbewegungen vollführten, wurde stattdessen eine intrakloakale Insemination in die Nähe der Oviduktöffnung durchgeführt. Nach der Insemination wurden die Tiere noch kurz in Rückenposition fixiert und der Schwanz wurde sanft von der rechten zur linken Seite bewegt, um den natürlichen Kopulationsakt zu imitieren. Nach erfolgreicher Insemination wurden die weiblichen Tiere sofort wieder zurück in ihre Voliere gesetzt und in den Tagen danach hinsichtlich ihres Allgemeinbefindens und Gesundheitszustandes kontrolliert. Alle Nester wurden täglich kontrolliert und die Eier markiert. Während der kompletten Brutperiode von ca. vier Wochen wurden die Eier alle zwei Tage mittels Schieren und des digitalen Eiermonitors auf Anzeichen von Embryonalwachstum kontrolliert. Infertile Eier wurden im Gelege belassen, während abgestorbene Eier aus hygienischen Gründen dem Gelege entnommen wurden.



Abbildung 29: Fixation eines weiblichen Nymphensittichs zur artifiziiellen Insemination

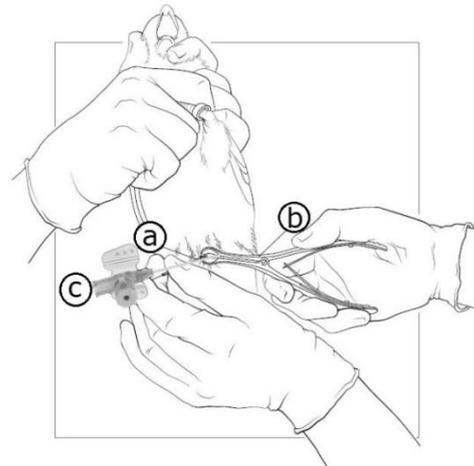


Abbildung 30: Digitale Illustration einer artifiziiellen Insemination beim Papagei  
Venenverweilkanüle (a) und Spekulum (b); (c) markiert die Adaptionstelle zum Aufsatz einer Pipette

#### 3.4.8.2.1 Artifiziielle Insemination mit Frischsperma

Vor der artifiziiellen Insemination wurden frische Spermaproben von den fertilen Nymphensittichhähnen gewonnen, bis ein Gesamtvolumen von mindestens 30  $\mu\text{l}$  vorlag. Die Proben wurden einer verkürzten Qualitätsuntersuchung (Volumen, Kontamination, geschätzte Spermiedichte in der Kapillare) unterzogen. Proben, die bereits makroskopisch Verunreinigungen wie Harnsäure oder Kot enthielten, wurden nicht weiter verwendet. Proben von zufriedenstellender Qualität (keine Verunreinigungen, geschätzte Spermiedichte in der Kapillare  $\geq 2$ ) wurden in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gepoolt. Von der Spermapoolprobe wurde die Spermiedichte und die Spermiesamtzahl nach den Methoden aus Kapitel 3.3.3.2 ermittelt, um die Inseminationsdosis berechnen zu können (Tabelle 4). Die Spermapoolprobe wurde nachfolgend mit dem besten Spermaverdünner in entsprechender Dosierung versetzt und bis zur Insemination in einer mit kaltem Wasser und Kühllakus gefüllten Kühlbox bei +4 °C gelagert. Der Inseminationsvorgang wurde innerhalb weniger Minuten nach der Spermaverdünnung begonnen und dauerte für die

gesamten Tiere der Gruppe in der Regel weniger als 60 Minuten. Selbst bei der letzten Inseminationsportion wurde daher eine ausreichende Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien von über 60 % angenommen. Die Techniken der artifiziellen Insemination wurden im obigen Kapitel ausführlich beschrieben.

#### 3.4.8.2.2 Artifielle Insemination mit kryokonserviertem Sperma

Vor der artifiziellen Insemination wurden die anhand des entwickelten Protokolls kryokonservierten Spermaproben im Kaltwasserbad nach den Methoden aus Kapitel 3.4.6.1 erwärmt. Die Aliquots wurden in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gepoolt bis ein Volumen von mindestens 100 µl vorhanden war. Von der Spermapoolprobe wurde die Spermiedichte und die Spermigesamtzahl nach den Methoden aus Kapitel 3.3.3.2 ermittelt, um die Inseminationsdosis berechnen zu können (Tabelle 4). Die Spermapoolprobe wurde nachfolgend bis zur Insemination in einer mit kaltem Wasser und Kühlakkus gefüllten Kühlbox bei +4 °C gelagert. Die Techniken der artifiziellen Insemination wurden im obigen Kapitel ausführlich beschrieben.

Tabelle 4: Detaillierte Darstellung der in den Inseminationsversuchen verwandten Spermienkonzentrationen, Inseminationsvolumina und entsprechenden Inseminationsdosen (n = 12)

Experiment 1						
Variable	Insemination 1		Insemination 2		Insemination 3	
	Frischsperma	TG-Sperma	Frischsperma	TG-Sperma	Frischsperma	TG-Sperma
Csp [n/µl]	325.000	740.000	637.500	610.000	212.500	1.034.000
Vi [µl]	15	10	12	10	12	12
Inseminationsdosis [n]	1.218.000	1.850.000	1.912.500	1.525.000	637.500	3.102.000
Experiment 2						
Variable	Insemination 1		Insemination 2		Insemination 3	
	Frischsperma	TG-Sperma	Frischsperma	TG-Sperma	Frischsperma	TG-Sperma
Csp [n/µl]	455.000	1.541.000	242.500	712.000	865.000	1.380.000
Vi [µl]	8	10	12	10	12	12
Inseminationsdosis [n]	910.000	3.852.500	727.500	1.780.000	2.595.000	4.140.000

Spermienkonzentration ( $C_{Sp}$ ); Inseminationsvolumen ( $V_i$ )

### 3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Für die Auswertungen wurde das Statistikprogrammpaket BDMP/Dynamic Release 8.1 (DIXON, 1993). Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programms Excel® 2010 (Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA). Für den weiteren Versuchsverlauf relevante Signifikanzen wurden innerhalb der graphischen Darstellungen entsprechend ihrer Werte [ $p \leq 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,0001$  (\*\*\*)] gekennzeichnet.

#### 3.5.1 Vorversuch

Zur Beschreibung der Daten wurden für die männlichen Tiere bei quantitativen, annähernd normalverteilten Merkmalen arithmetische Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichungen (SD), Minima ( $x_{\min}$ ), Maxima ( $x_{\max}$ ), Mediane ( $\tilde{x}$ ), und der Quartile (Q1; Q3) für die untersuchten Spermaparameter berechnet. Jede Spermaprobe der 30 männlichen Tiere galt als statistische Einheit.

#### 3.5.2 Hauptversuch

Zur Beschreibung der Daten wurden bei quantitativen Merkmalen arithmetische Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichungen (SD), Mediane ( $\tilde{x}$ ), Quartile (Q1, Q3), sowie Minima ( $x_{\min}$ ) und Maxima ( $x_{\max}$ ) der Stichprobenumfänge (n) berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Die Datenbeschreibung der Spermienmorphologie erfolgte durch die Berechnung der arithmetischen Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD), die in tabellarischer Form dargestellt sind. Bei der grafischen Darstellung der quantitativen Variablen wurden aus Gründen der Übersicht nur die Mittelwerte eingetragen. Die Fehlerbalken in den grafischen Darstellungen der Spermiovitalität entsprechen den Standardabweichungen. Die Datenerfassung zum Zeitpunkt 0 bezieht sich jeweils auf den schnellstmöglichen Zeitpunkt nach Beifügen der Spermazusätze (Verdünner, Kryoprotektiva). Die einzelnen morphologischen Ausprägungen wurden in Summen ihrer Kategorien ausgewertet. Eine ausführliche Ergebnisbeschreibung findet sich in den Tabelle 28 bis 29.

### 3.5.2.1 Evaluierung der Verdünner

In Übereinstimmung mit dem Studiendesign diente jede gepoolte Spermaprobe als statistische Einheit bei der Auswertung der Ergebnisse. Statistisch signifikante Unterschiede der Mittel der Spermaparameter Gesamtmotilität (MOT), Vorwärtsmotilität (PMOT), Spermiviabilität und Spermienmorphologie bei dem Einsatz unterschiedlicher Verdünner wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Verdünnungsstufe und Zeit mit Hilfe des Programms BMDP2V aus dem Softwarepaket getestet. Um eine annähernde Normalverteilung der analysierten Variablen zu erhalten, wurde vor der Auswertung der Spermienmorphologie eine Arcus-Sinus-Transformation der Daten vorgenommen. Der globale Vergleich der Spermaverdünner wurde durch eine dreifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Verdünner, Verdünnungsstufe und Zeit vorgenommen. Korrelationen wurden durch den Pearson Korrelationskoeffizienten (R) beurteilt. Im Allgemeinen wurde ein Signifikanzlevel von  $\alpha = 0,05$  angenommen, sodass p-Werte kleiner oder gleich 0,05 statistisch signifikante Effekte signalisierten.

### 3.5.2.2 Evaluierung der Kryoprotektiva

In Übereinstimmung mit dem Studiendesign diente jede gepoolte Spermaprobe als statistische Einheit bei der Auswertung der Ergebnisse. Statistisch signifikante Unterschiede der Mittel der Spermaparameter Gesamtmotilität (MOT), Vorwärtsmotilität (PMOT), Spermiviabilität und Spermienmorphologie bei dem Einsatz unterschiedlicher Kryoprotektiva wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Konzentration und Zeit und zusätzlichem Wald-Test evaluiert. Um eine annähernde Normalverteilung der analysierten Variablen zu erhalten, wurde vor der Auswertung der Spermienmorphologie eine Arcus-Sinus-Transformation der Daten vorgenommen. Der globale Vergleich der unterschiedlichen Kryoprotektiva wurde mit Hilfe einer dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Kryoprotektivum, Konzentration und Zeit und zusätzlichem Wald-Test vorgenommen. Im Allgemeinen wurde ein Signifikanzlevel von  $\alpha = 0,05$  angenommen, sodass p-Werte kleiner oder gleich 0,05 statistisch signifikante Effekte signalisierten. Die zusätzliche

Evaluierung von CryoSOfree™ erfolgte aufgrund des limitierten Stichprobenumfangs und der Eindeutigkeit der Ergebnisse lediglich deskriptiv.

### **3.5.2.3 Evaluierung der Kühlrate**

Bei der Auswertung verschiedener Kühlraten diene jede Spermaprobe als statistische Einheit. Statistisch signifikante Unterschiede der Mittel der Spermaparameter Gesamtmotilität (MOT), Vorwärtsmotilität (PMOT), Spermienviabilität und Spermienmorphologie wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse ermittelt. Um eine annähernde Normalverteilung der analysierten Variablen zu erhalten, wurde vor der Auswertung der Spermienmorphologie eine Arcus-Sinus-Transformation der Daten vorgenommen. Auch hier galt ein Signifikanzlevel von  $\alpha = 0,05$ , sodass p-Werte kleiner oder gleich 0,05 statistisch signifikante Effekte signalisierten.

Die zusätzliche Evaluierung der schnellen Kühlrate („direct plunging“) mit Hilfe von DMA 12 %, DMSO 8 % & 12 %, sowie Glycerin 8 % & 12 % erfolgte aufgrund des limitierten Stichprobenumfangs und der Homogenität der Ergebniswerte lediglich deskriptiv.

### **3.5.2.4 Evaluierung verschiedener Erwärmmethoden**

Bei der Auswertung verschiedener Erwärmmethoden nach Vitrifikation diene jede Spermaprobe als statistische Einheit. Aufgrund der Homogenität der Ergebnisse konnten keine statistisch signifikanten Effekte berechnet werden. Stattdessen erfolgt eine ausführliche Ergebnisbeschreibung in Tabelle 31.

### **3.5.2.5 Evaluierung des Fertilisationsversuches**

Zur Auswertung des Cross-over-Fertilisationsversuches wurden multiple logistische Regressionen mit ausgezählten Häufigkeiten bezüglich der Befruchtungs- und Absterberaten mit dem Programm BMDPLR erzeugt und nach der log-likelihood-Funktion auf signifikante Unterschiede geprüft.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Vorversuch

#### 4.1.1 Makroskopische Spermauntersuchung

Insgesamt wurden im Untersuchungszeitraum von 12 Wochen 411 Spermaentnahmeversuche durch die Massagemethode durchgeführt. Hiervon waren 262 Versuche erfolgreich (63,8 %). In den ersten zwei Wochen des Vorversuches wurde bei allen 30 männlichen Nymphensittichen zweimal wöchentlich die Spermaentnahme versucht. Dabei stellte sich heraus, dass dieses Absamungsintervall zu kurz für die Nymphensittichhähne war. Die Kloakenschleimhaut reagierte schon bei leichtem Druck mit Blutungen, sodass es zu Kontaminationen des Ejakulates kam. Aus diesem und Gründen des Tierschutzes wurde das Absamungsintervall auf einmal wöchentlich reduziert. In den folgenden zehn Wochen des Vorversuches wurde die Technik der Massagemethode verfeinert, sodass möglichst kontaminationsfreie Ejakulate hohen Volumens gewonnen werden konnten. Die Zeitspanne zwischen dem Beginn der Spermaentnahme und dem Beginn der Qualitätsanalyse überschritt in keinem Fall 50 Minuten.

##### 4.1.1.1 Volumen

Die Volumenbestimmung wurde anhand aller gewonnenen Spermaproben ( $n = 262$ ) vorgenommen. Das Ejakulatvolumen reichte von 0,1 bis 19,4  $\mu\text{l}$ . Durchschnittlich betrug das gewonnene Spermavolumen pro Nymphensittichhahn  $3,2 \pm 3,1 \mu\text{l}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) (Tabelle 5).

##### 4.1.1.2 Konsistenz und Farbe

Die Farbe des Ejakulates lag in 100/262 Fällen (38,2 %) zwischen gräulich und weißlich. Zweiundachtzig von 262 Proben (31,3 %) wiesen eine klare Farbe auf. Zweiundfünfzig Proben (19,9 %) waren von oranger bis rötlicher Farbe und 24 Proben (9,2 %) wiesen ein

Farbspektrum zwischen elfenbeinfarben und gelblich auf. Die restlichen 4 Proben (1,5 %) waren bräunlich gefärbt. Siebenunddreißig Ejakulate (14,1 %) waren von wässriger Konsistenz, 23 Ejakulate (8,8 %) milchig, der größte Anteil der Proben (n = 189; 72,1 %) war von molkiger Konsistenz. Lediglich sieben (2,7 %), beziehungsweise sechs (2,3 %) Ejakulate waren von sahniger bis rahmiger Konsistenz. In 35,5 % der Proben (93/262) war makroskopisch eine Verunreinigung zu sehen, wobei es sich um Harnsäure (22/93; 23,7 %), um Erythrozyten (66/93; 71 %), um Kot (2/93, 2,2 %) und um eine gemischte Kontamination (3/93; 3,2 %) handelte.

#### **4.1.1.3 Geschätzte Spermiedichte und -beweglichkeit**

Jeder der 262 Einzelspermaproben wurde einer vorläufigen mikroskopischen Untersuchung in der Mikrokapillare unterzogen (s. Kap. 3.3.1.3). Hierbei betrug die durchschnittliche, geschätzte Spermiedichte innerhalb der Mikrokapillare  $3,3 \pm 1,2$  ( $\bar{x} \pm SD$ ), die geschätzte mittlere Motilität lag bei  $2,4 \pm 1,2$  ( $\bar{x} \pm SD$ ).

#### **4.1.2 Chemisch-physikalische Spermauntersuchung**

##### **4.1.2.1 pH-Wert**

Bei 70 zufällig ausgewählten Einzelejakulaten, die in ausreichendem Volumen ( $> 6 \mu\text{l}$ ) vorlagen und keine Kontaminationen aufwiesen, wurde eine pH-Wert Messung nach der Methode aus Kapitel 3.3.2.1 durchgeführt. Hierbei wurden Werte zwischen 6,4 und 8,5 ermittelt. Der Mittelwert lag bei  $7,4 \pm 0,4$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) (Tabelle 5).

##### **4.1.2.2 Osmolalität**

Es wurden neun gepoolte, unverdünnte Spermaproben gemessen. Jede Poolprobe bestand aus den Einzelejakulaten von jeweils 30 Nymphensittichen. Die anhand dieser neun Poolspermaproben gemessenen Osmolalitätswerte lagen zwischen 290 und 320 mOsm/kg (Abbildung 31). Das arithmetische Mittel betrug  $297,7 \pm 9,4$  ( $\bar{x} \pm SD$ ).

### 4.1.3 Mikroskopische Spermauntersuchung

#### 4.1.3.1 Eosin B-Färbung

Dieselben 70 Proben, die einer pH-Wert-Messung unterzogen wurden, dienten ebenfalls zur Bestimmung der Lebend/Tot-Rate der Einzelejakulate nach der Methode aus Kapitel 3.3.3.1.1. Der geringste Anteil an lebenden Spermien betrug 65,5 %, der höchste Anteil 97 %. Insgesamt ergab sich so eine mittlere Vitalitätsrate von  $85,4 \pm 6,7$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ).

#### 4.1.3.2 Spermienkonzentration und Spermiengesamtzahl

Anhand von 51 zufällig ausgewählten Einzelejakulaten wurden sowohl die Spermienkonzentration, als auch die Spermiengesamtzahl, nach den Methoden aus Kapitel 3.3.3.2 ermittelt. Die Spermienkonzentration lag hierbei zwischen 30.000 und 5.950.000 Spermien/ $\mu$ l. Aus dieser Zahl und dem jeweiligen Ejakulatvolumen ergab sich die Spermiengesamtzahl. Diese lag zwischen 45.000 und 175.525.000 Spermien im Gesamtejakulat pro Spermaprobe (Tabelle 5).

#### 4.1.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Insgesamt wurden pro Spermienregion (Akrosom, Kopf, Mittelstück, Geißel) jeweils 25 Membranabschnitte eingehend betrachtet. Bei der Beurteilung der Plasmamembranen wurde im Bereich des Akrosoms in 16 % der untersuchten Abschnitte ein Integritätsverlust verzeichnet. Im Bereich des Spermienkopfes waren 24 % der Abschnitte verändert. Das Mittelstück zeigte sich hingegen nur in 12 %, die Geißel sogar nur in 8 % der untersuchten Membranabschnitte irregulär (Tabelle 32). Soweit erkennbar, waren alle im Inneren liegenden Strukturen (Akrosomvesikel, Perforatorium, proximales und distales Zentriol, Zellkern, Mitochondrien) intakt (Abbildung 32). Im *Pars principalis* war die für den Achsenfaden typische  $9 \times 2 + 2$  Mikrotubulstruktur in allen Querschnitten nachvollziehbar (Abbildung 33).

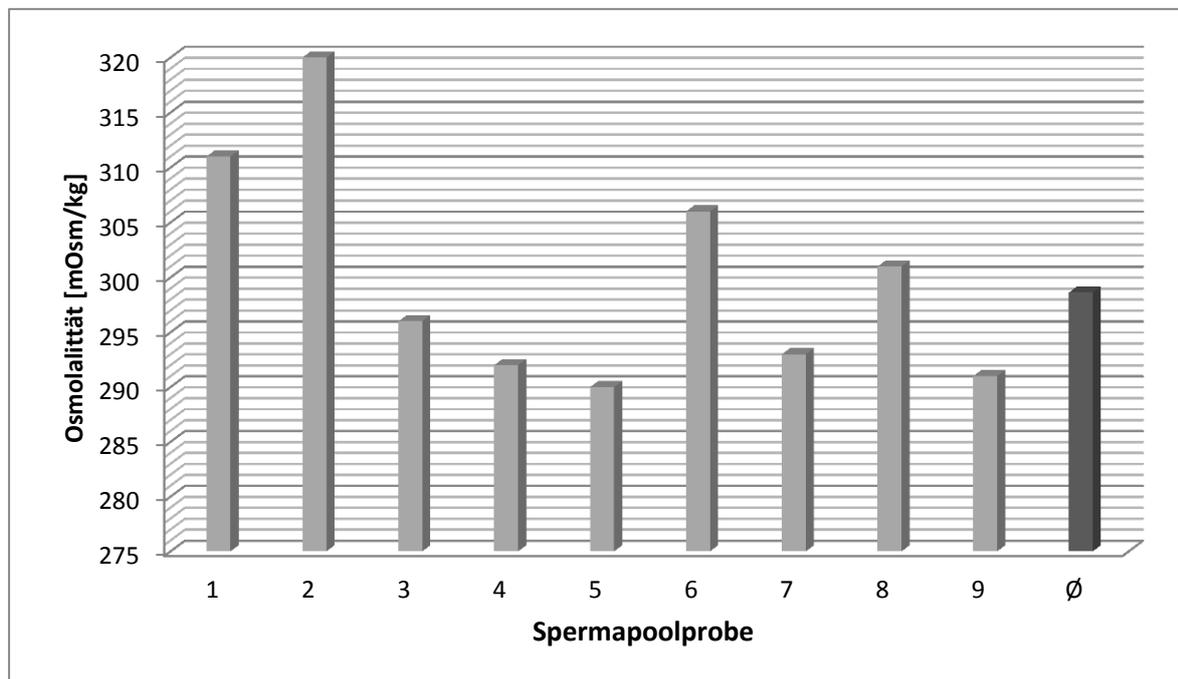


Abbildung 31: Einzelmesswerte und berechneter Mittelwert ( $\emptyset$ ) der Osmolalität von Spermapoolproben (n=9)

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der Spermaparameter (Volumen, Dichte, Beweglichkeit, pH-Wert, Osmolalität, Vitalität, Konzentration und Gesamtzahl) der Qualitätsuntersuchung im Vorversuch

Variable	Volumen [ $\mu$ l]	geschätzte Spermien-dichte	geschätzte Spermien-beweglich-keit	pH	Osmo-lalität [mOsm /kg]	Spermien-vitalität [%]	Spermien-konzentra-tion [n/ $\mu$ l]	Spermien-gesamtzahl [n]
$\bar{x} \pm SD$	3,2 $\pm$ 3,1	3,3 $\pm$ 1,2	2,4 $\pm$ 1,2	7,4 $\pm$ 0,4	298,6 $\pm$ 9,6	85,4 $\pm$ 6,7	836.571,4 $\pm$ 1.282.003,9	2.638.712,3 $\pm$ 3.937.999,9
$\tilde{x}$	2,2	3,5	2,6	7,5	293	87	350.000	1.016.400
Q1	1	2,5	1,4	7,2	291	82	121.500	310.200
Q3	4,1	4	3,5	7,7	301	90	740.000	2.927.900
$x_{\min}$	0,1	0	0	6,4	290	65,5	30.000	45.000
$x_{\max}$	19,4	4	4	8,5	320	97	5.950.000	175.525.000
n	262	262	262	70	9	70	51	51

Mittelwert und Standardabweichung ( $\bar{x} \pm SD$ ); Median ( $\tilde{x}$ ); Quartile (Q1 und Q3); Minimalwert ( $x_{\min}$ ); Maximalwert ( $x_{\max}$ ); Anzahl (n)

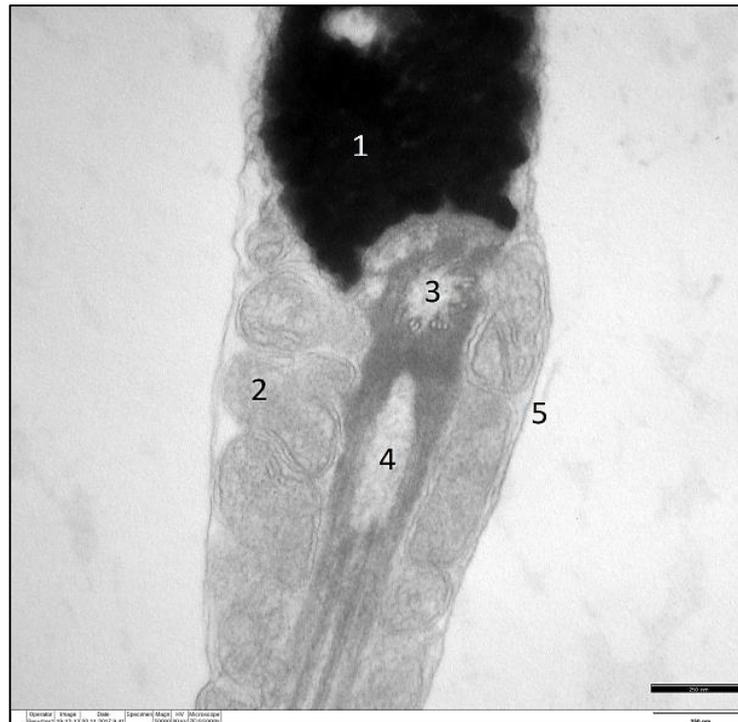


Abbildung 32: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (Längsschnitt): Intaktes Mittelstück eines Nymphenstichspermiums; Nucleus (1), Mitochondrium (2), proximales Zentriol (3), distales Zentriol (4), intakte Membran (5)

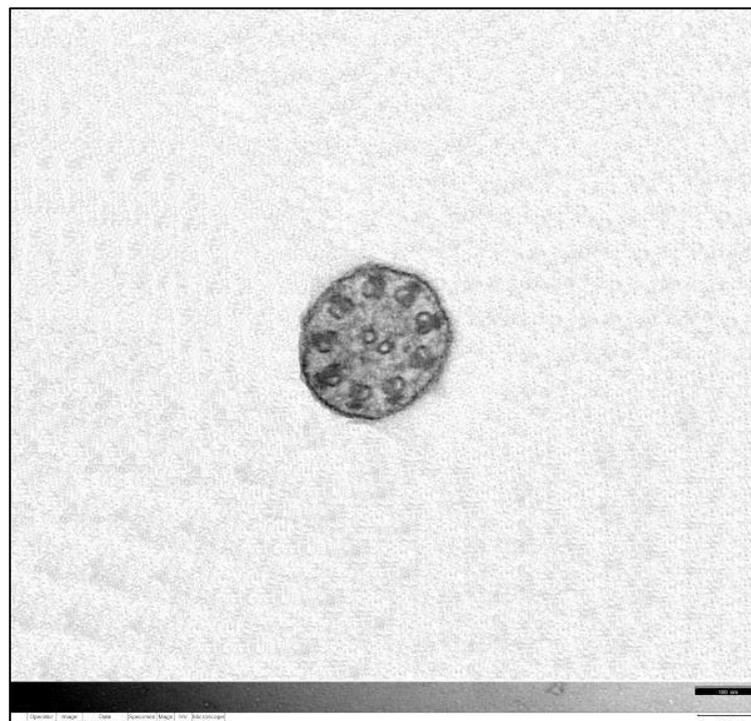


Abbildung 33: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (Querschnitt): *Pars principalis* eines Nymphenstichspermiums mit typischer 9x2+2 Mikrotubulstruktur

## 4.2 Hauptversuch

### 4.2.1 Herstellung der Verdünner

Die drei aus der Literatur ausgewählten Spermaverdünner (LAKE UND STEWART (1978), BLANCO U. A. (2008), (SEXTON, 1977) wurden gemäß Literaturangaben und den Methoden aus Kapitel 3.4.1 hergestellt. Durch die Ergebnisse der Vorstudie erfolgte die Einstellung der drei Verdünner (SV 1 – 3) auf den mittleren pH-Wert von Nymphensittichsperma ( $\bar{x} = 7,4$ ). Bezugnehmend auf den mittleren Osmolalitätswert der Spermepoolproben ( $\bar{x} \pm SD = 297,7 \pm 9,4$ ) wurde jeder der drei Spermaverdünner nachfolgend auf eine Osmolalität von ca. 300 mOsm/kg (+/- 3 mOsm/kg) eingestellt. Vergleichend dazu lagen der ermittelte pH-Wert der 1%igen Glukoselösung zwischen 4,9 und 6,1 ( $n = 9$ ;  $\bar{x} \pm SD = 5,6 \pm 0,4$ ) und der gemessene Osmolalitätswert zwischen 275 und 280 mOsm/kg ( $n = 9$ ;  $\bar{x} \pm SD = 277,7 \pm 1,3$ ).

### 4.2.2 Evaluierung der Verdünner

Um jeweils zwei Verdünnungsstufen (1:4 und 1:8) eines jeden Verdünners in acht Wiederholungen testen zu können, waren mindestens 16 Spermepoolproben zur Aliquotierung notwendig. Die Anzahl der Messwiederholungen (8) wurde so gewählt, um Messungenauigkeiten auszugleichen und statistisch verwertbare Ergebnisse zu erhalten. Jede native Spermeprobe wurde bei Raumtemperatur in vier Aliquots geteilt und mit den drei verschiedenen Verdünnern (SE 1 -3), sowie der 1%igen Glukoselösung als Kontrolle versetzt. Dieses Verfahren konnte bei 15 Spermepoolproben problemlos durchgeführt werden. So ergaben sich aus 15 Poolproben 60 Einzelproben zur Untersuchung:

$$15 \text{ Poolproben} \times 4 \text{ Aliquots} = 60 \text{ Einzelproben}$$

Eine Poolprobe konnte jedoch aufgrund des geringen Spermavolumens nur in zwei Verdünneraliquots aufgeteilt werden, sodass die Untersuchung und Aufteilung einer weiteren Spermepoolprobe notwendig war, was insgesamt in 17 Poolproben resultierte:

$$2 \text{ Poolproben} \times 2 \text{ Aliquots} = 4 \text{ Einzelproben} + 60 \text{ Einzelproben} = 64 \text{ Einzelproben}$$

Diese 64 Einzelproben wurden hinsichtlich Motilität, Viabilität und Morphologie zu fünf unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten (s. Kap. 3.4.3) untersucht. Im Folgenden wird näher auf die Ergebnisse der Spermaqualitätsuntersuchungen eingegangen. Die detaillierten Untersuchungsergebnisse des Verdünnervergleiches sind in Tabelle 28 dargestellt.

#### 4.2.2.1 Motilitätsanalyse

Über den gesamten Untersuchungszeitraum von 120 Minuten war ein Abfall der Gesamt (MOT)- und Vorwärtsmotilität (PMOT) sowohl in den Kontrollproben, als auch in allen mit Spermaverdünnern versetzten Proben in jeglicher Verdünnungsstufe zu verzeichnen. Die höchste Reduktion der Gesamt- ( $\Delta \sim 20\%$ ) und Vorwärtsmotilität ( $\Delta \sim 24\%$ ) trat bei der Verwendung des modifizierten Beltsville-Poultry-Semen-Extenders (SV 3; 1:4) auf. Der geringste Abfall der Gesamt- ( $\Delta \sim 11\%$ ) und Vorwärtsmotilität ( $\Delta \sim 14\%$ ) ließ sich bei dem modifizierten Lake-Verdüner in 1:8 Verdünnungsstufe verzeichnen. Der modifizierte Lake-Verdüner (SV 1) in 1:4 Verdünnung startete jedoch, verglichen mit der Kontrolle und allen anderen Spermaverdünnern in beiden Verdünnungsstufen (Abbildung 34 und Tabelle 13), initial mit einer höheren ( $p < 0,05$ ) Gesamtmotilität ( $\bar{x} \pm SD = 77,3 \pm 7,0\%$ ). Ähnliche Ergebnisse wurden in der initialen Vorwärtsbeweglichkeit beobachtet ( $\bar{x} \pm SD = 70,7 \pm 7,8\%$ ) (Abbildung 35 und Tabelle 14). Der globale Vergleich identifizierte signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Spermaverdünnern und zwischen den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten ( $p < 0,0001$ ), während die Unterschiede zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen (1:4 und 1:8) knapp nicht signifikant waren ( $p = 0,08$ ). Beim paarweisen Vergleich der verschiedenen Spermaverdüner mit 1%iger Glukoselösung erzielte der modifizierte Lake-Verdüner in 1:4-Verdünnung die besten Ergebnisse hinsichtlich der Erhaltung der Gesamt- und Vorwärtsmotilität ( $p < 0,01$ ) (Tabelle 10). Obwohl die 1:8-Verdünnungsstufe des SV 1 eine geringere Reduktion der Vorwärtsbeweglichkeit von ca. 14 % im Vergleich zur 1:4-Verdünnungsstufe ( $\Delta \sim 23\%$ ) vorwies, garantierte die 1:4-Verdünnungsstufe nach 120 Minuten Beobachtungszeit die signifikant höhere Vorwärtsbeweglichkeit ( $p < 0,05$ ). Der Vergleich der beiden

Konzentrationsstufen ergab in der Gesamtbeweglichkeit keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

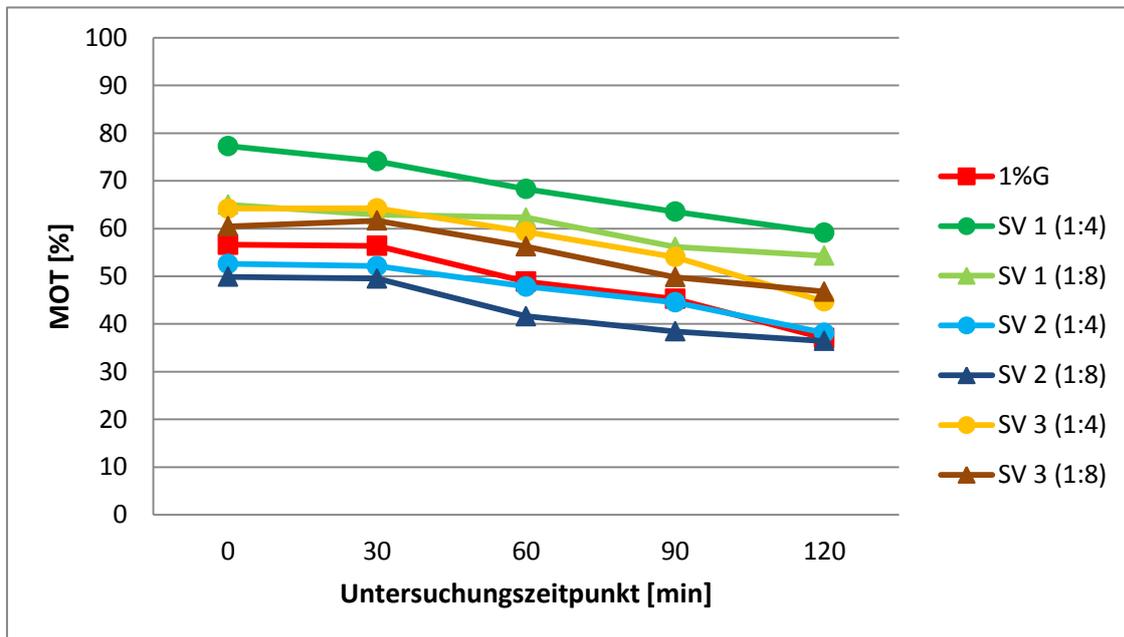


Abbildung 34: Mittelwerte aus 8 Messungen in Prozent der Spermigesamtmotilität beim Vergleich der verschiedenen Spermaverdüner in unterschiedlichen Konzentrationen ( $n = 64$ )  
1%ige Glukoselösung (1%G); Spermaverdüner (SV)

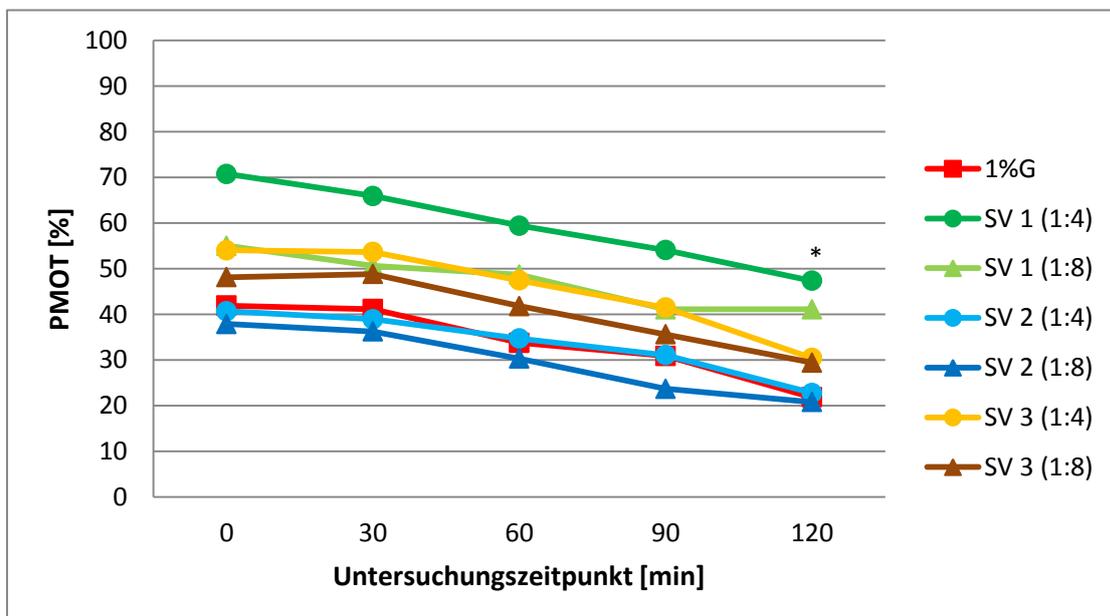


Abbildung 35: Mittelwerte aus 8 Messungen in Prozent der Spermiovorwärtsmotilität beim Vergleich der verschiedenen Spermaverdüner in unterschiedlichen Konzentrationen ( $n = 64$ )  
1%ige Glukoselösung (1%G); Spermaverdüner (SV);  $p \leq 0,05$  (\*)

#### 4.2.2.2 Viabilitätsanalyse

Die Gesamtheit der zu evaluierenden Proben ( $n = 150$ ) lässt sich anhand der nachstehenden Auflistung nachvollziehen. Von allen Verdünnern, in jeder Verdünnungsstufe wurde zu zwei Zeitpunkten (0 und 120 Minuten) eine Viabilitätsanalyse durchgeführt. Zu beiden Zeitpunkten wurde vergleichend die Kontrollverdünnung evaluiert. Sofern ein ausreichendes Probenvolumen vorhanden war, wurde zudem zu beiden Zeitpunkten eine native Spermaprobe vergleichend evaluiert.

3 Verdüner x 2 Verdünnungsstufen x 2 Untersuchungszeitpunkte x 8 Wiederholungen  
= 96 Einzelproben

1 Kontrolle x 1 Verdünnungsstufe x 2 Untersuchungszeitpunkte x 17 Wiederholungen  
= 34 Einzelproben

1 native Spermaprobe x 2 Untersuchungszeitpunkte x 10 Wiederholungen  
= 20 Einzelproben

Zu Anfang der Verdünnerevaluation wurde die Vitalitätsanalyse zu den Zeitpunkten 0 und 120 Minuten daher parallel durch zwei Supravitalfärbungen (s. Kap. 3.4.2.2) durchgeführt. Jedoch musste im weiteren Verlauf des Versuchs auf eine Supravitalfärbung verzichtet werden, da das geringe Spermavolumen nicht für alle Untersuchungen ausreichte. Aus dem Vergleich des prozentualen Anteils der lebenden Spermien der bereits angefertigten 46 Eosin B-Ausstrichen und 46 Fluoreszenzanalysen ergab sich eine starke positive Korrelation der beiden Evaluationsmethoden ( $n = 46$ ;  $r = 0,893$ ;  $p < 0,001$ ). Dies und die Tatsache, dass die Eosin B-Ausstriche im weiteren Verlauf noch für die Auswertung der Morphologie benötigt wurden, führte zu dem Entschluss, dass im weiteren Verlauf des Versuchs auf die Anfertigung von Fluoreszenzausstrichen im Rahmen der Verdünnerevaluierung verzichtet wurde. Die Evaluation der verbleibenden Spermaproben erfolgte hiernach alleinig durch Eosin B.

Im Laufe des Untersuchungszeitraums von 120 Minuten war eine Reduktion Spermivitalität in allen mit Spermaverdünnern und der Kontrolle versetzten Proben in jeglicher Verdünnungsstufe zu verzeichnen. Auch die nativen Proben resultierten in einem

Abfall der Rate der lebenden Spermien. Die höchste Reduktionsdifferenz ( $\Delta \sim 10\%$ ) trat bei der Verwendung des modifizierten Beltsville-Poultry-Semen-Extenders (SV 3; 1:4) auf. Der geringste Abfall ( $\Delta \sim 5\%$ ) ließ sich bei dem modifizierten Blanco Verdünner (SV 2) in 1:8-Verdünnungsstufe verzeichnen. Alle anderen eingesetzten Verdünner und Verdünnungsstufen ergaben eine Reduktion der Spermivitalität von ca. 6%. Der Interaktionseffekt aus verwendetem Verdünner und Untersuchungszeitpunkt resultierte daher in keinem signifikanten Unterschied ( $p = 0,4005$ ). Abgesehen von der nativen Spermaprobe waren die höchsten Ausgangswerte jedoch bei dem modifizierten Lake-Verdünner (SV 1) in beiden Verdünnungsstufen zu verzeichnen (Abbildung 36, Tabelle 15).

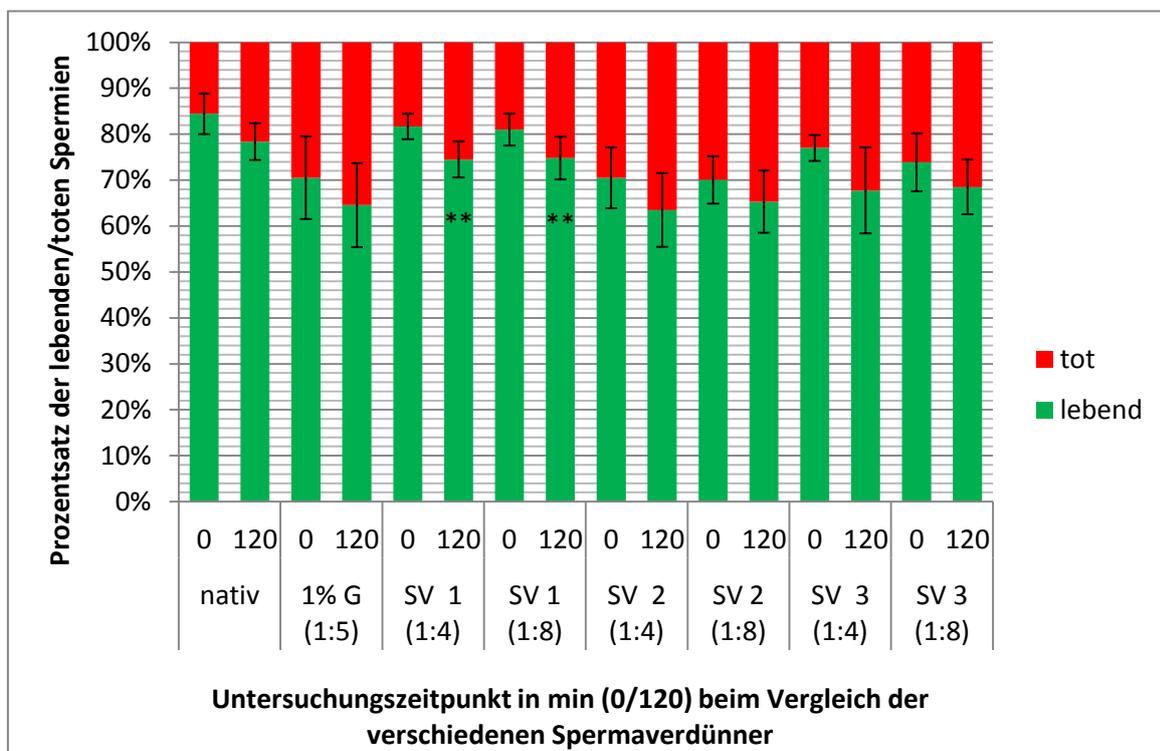


Abbildung 36: Mittelwerte und Standardabweichungen in Prozent der Spermivitalität in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der nativen Spermaproben mit verschiedenen Spermaverdünnern in unterschiedlichen Konzentrationen ( $n = 150$ )

1%ige Glukoselösung (1%G); Spermaverdünner (SV);  $p < 0,01$  (\*\*)

Im Vergleich der verschiedenen Spermazusätze und der unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte ließ sich feststellen, dass die Spermivitalität signifikant vom eingesetzten Verdünner ( $p = 0,0005$ ) und dem Untersuchungszeitpunkt ( $p < 0,0001$ ) abhing. Alleinig der modifizierte Verdünner nach LAKE UND STEWART (1978) war in der Lage

die Eingangsforderung nach einer Vitalitätsrate von über 70 % zum Zeitpunkt 120 Minuten zu erfüllen (Abbildung 36 und Tabelle 15). Auch im paarweisen Vergleich der verschiedenen Spermaverdünner mit 1%iger Glukoselösung war einzig der modifizierte Lake-Verdünner in der Lage, signifikant höhere Vitalitätsraten als die Kontrollverdünnung zu erzielen. Die 1:4-Verdünnungsstufe erwies sich hierbei im Vergleich zur Glukose als geringfügig besser ( $p = 0,0028$ ) als die 1:8-Verdünnungsstufe ( $p = 0,0045$ ) (Tabelle 10). Der Vergleich der beiden Verdünnungsstufen (1:4 und 1:8) untereinander ergab keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.2.3 Morphologische Analyse

Die morphologische Analyse erfolgte an denselben Eosin B Ausstrichen, an denen zuvor die Viabilitätsanalyse vorgenommen wurde. Daher wurden auch hier 150 einzelne Ausstriche ausgewertet. In jedem Ausstriche wurden jeweils 200 Spermien genau betrachtet und nach den Methoden in Kapitel 3.4.2.3 morphologisch kategorisiert. Die morphologische Analyse ergab, übergreifend betrachtet, multiple Veränderungen der Nymphensittichspermien (Abbildung 37 und Tabelle 16). Die meisten Schäden betrafen die Schwanzregion (34,8 %), gefolgt von Veränderungen des Kopfes (21,3 %), des Akrosoms (2 %) und des Mittelstücks (1,6 %). In 9,8 % der Fälle traten multiple Veränderungen innerhalb einer Spermienzelle auf. Nichtsdestotrotz wurde eine große Spanne (10 - 61 %,  $\bar{x} \pm SD = 30,4 \pm 13,1$  %) an morphologisch unveränderten (normalen) Spermien pro Ausstrich festgestellt. Bei der Auswertung lag die Gewichtung der WHO (2010) zugrunde, die Kopfveränderungen als die schwerwiegendste Abnormität einschätzen. Der Schwerpunkt der morphologischen Auswertung wurde daher auf die Vorkommenshäufigkeit von Kopfveränderungen und normalen Spermien gelegt. Der höchste Anteil normaler Spermien ([0]  $\bar{x} = 47,2$  %; [120]  $\bar{x} = 39,6$  %) fand sich in den nativen, unverdünnten Spermaproben (Tabelle 16). Der Anteil von Kopfveränderungen wurde des Weiteren signifikant vom Einsatz der verschiedenen Spermaverdünner ( $p = 0,0017$ ) und den Untersuchungszeitpunkten ( $p = 0,0216$ ) beeinflusst, ebenso wie der Prozentsatz normaler Spermien (Verdünner:  $p < 0,0001$ ), (Untersuchungszeitpunkt:  $p = 0,0003$ ) (Tabelle 7 und Tabelle 9). Im Vergleich der Verdünner untereinander resultierte der Einsatz des modifizierten Lake-Verdünners in beiden untersuchten Verdünnungsstufen

in einer niedrigeren Rate an Kopfveränderungen, bei gleichzeitig höherer Rate an morphologisch unveränderten Spermien (Abbildung 38, Tabelle 16).

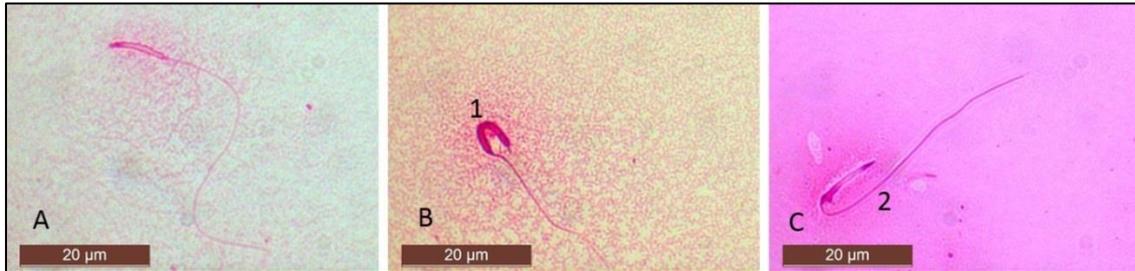


Abbildung 37: Morphologie von Nymphensittichspermien in Eosin B-Ausstrichen (A) normales Spermium; (B) Spermium mit Kopfveränderung, gebogener Kopf (1); (C) Spermium mit Schwanzveränderung, Retroversion der Geißel (2)

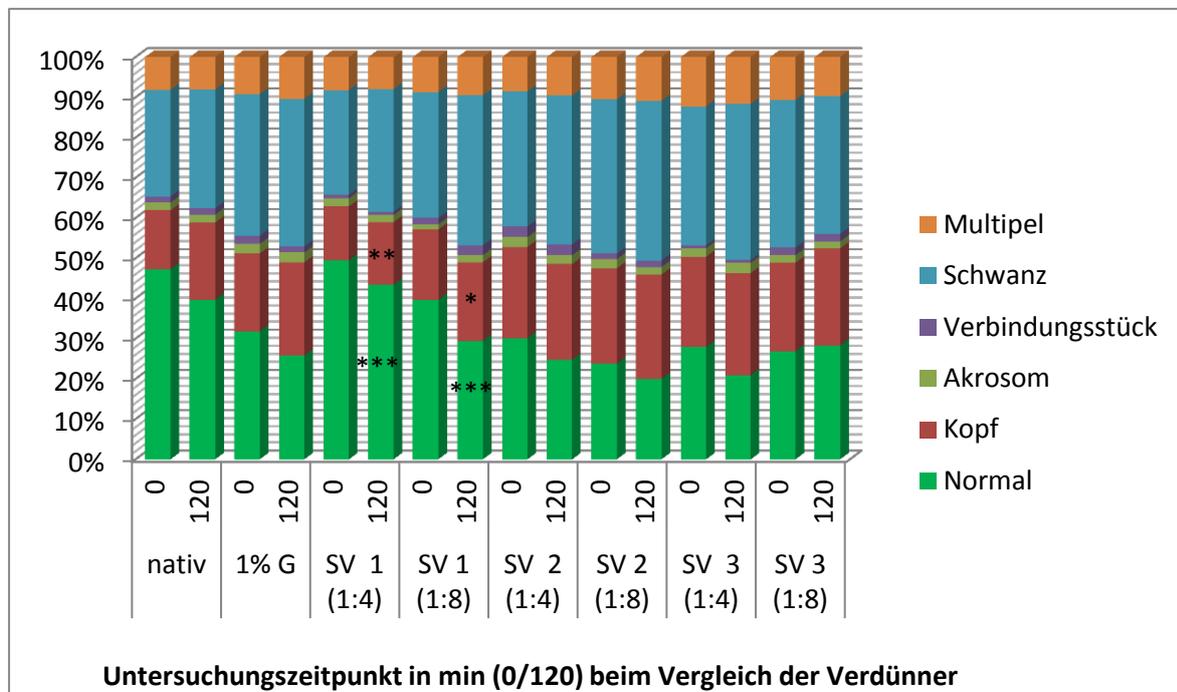


Abbildung 38: Mittelwerte in Prozent der morphologischen Spermienveränderungen in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der unterschiedlichen Spermaverdüner (n = 150)

1%ige Glukoselösung (1%G); Spermaverdüner (SV),  $p < 0,0001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*);  $p \leq 0,05$  (\*)

Der geringste Anteil an Kopfveränderungen zu beiden Zeitpunkten und gleichzeitig auch die geringste Zunahme deren Anteils war dabei in 1:4-Verdünnungsstufe zu verzeichnen ([0]  $\bar{x}$  = 13,4 %; [120]  $\bar{x}$  = 15,6 %). Der Anteil der Schwanzveränderungen wurde nicht von den Spermaverdünnern, jedoch vom Untersuchungszeitpunkt beeinflusst ( $p > 0,05$ ) (Tabelle 7 und Tabelle 9), wobei der höhere Prozentsatz zum späteren

Untersuchungszeitpunkt auftrat. Akrosom-, Mittelstück- und multiple Veränderungen waren weder vom Spermaverdünner, noch von der Zeit abhängig ( $p \leq 0,05$ ) (Tabelle 7 und Tabelle 9). Keine der morphologischen Ausprägungen wurde von Wechselwirkungen zwischen den Untersuchungsgruppen (Verdünner, Verdünnungsstufe, Zeit) beeinflusst ( $p > 0,05$ ) (Tabelle 7 und Tabelle 9). Eingehend auf alle Ergebnisse der Motilitäts-, Viabilitäts- und Morphologieanalyse stellte sich der modifizierte Verdünner nach LAKE UND STEWART (1978) in der 1:4-Verdünnungsstufe als am besten geeignet zur Kurzzeitkonservierung von Nymphensittichspermien heraus. Er wurde daher zur weiteren Entwicklung des Protokolls verwendet.

#### **4.2.3 Evaluierung der Kryoprotektiva**

Um jeweils drei Endkonzentrationen (4 %, 8 %, 12 %) eines jeden Kryoprotektivums in acht Wiederholungen testen zu können, waren mindestens 24 Spermapoolproben zur Aliquotierung notwendig. Jede native Spermprobe wurde den Ergebnissen der Verdünnerevaluierung entsprechend bei Raumtemperatur 1:4 mit dem modifizierten Lake-Verdünner versetzt. Diese wurde nachfolgend in vier Aliquots geteilt. Drei dieser Aliquots wurden mit den drei verschiedenen Kryoprotektiva (K 1 -3) in jeweils einer Endkonzentration versetzt. Das vierte Aliquot diente als Kontrollprobe. Dieses Verfahren konnte bei allen 24 Poolproben angewendet werden. So ergaben sich aus 24 Poolproben 96 Einzelproben zur Untersuchung:

$$24 \text{ Poolproben} \times 4 \text{ Aliquots} = 96 \text{ Einzelproben}$$

Alle 96 Einzelproben wurden hinsichtlich Motilität, Viabilität und Morphologie zu fünf unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten (s. Kap. 3.4.3) untersucht. Im Folgenden wird näher auf die Ergebnisse der Spermaqualitätsuntersuchungen eingegangen. Die detaillierten Untersuchungsergebnisse des Vergleiches der Kryoprotektiva sind in Tabelle 29 dargestellt.

##### **4.2.3.1 Motilitätsanalyse**

Während der Untersuchung und bis zu deren Ende war ein Abfall der Gesamt (MOT)- und Vorwärtsmotilität (PMOT) in allen mit Kryoprotektiva versetzten Proben jeglicher

Konzentration zu verzeichnen (Abbildung 39 und Abbildung 40 sowie Tabelle 17 und Tabelle 18). Auch die Kontrollprobe (mit Lake-Verdüner versetzte Spermaprobe) büßte innerhalb des Untersuchungszeitraumes an Beweglichkeit ein. Jedoch begann diese Kontrollproben initial mit den höchsten Werte der MOT ( $\bar{x} \pm SD = 76,3 \pm 5,8$ ) und PMOT ( $\bar{x} \pm SD = 68,1 \pm 9,1$ ). Bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes reduzierte sich die MOT um 14 %, während die PMOT um 18 % sank. Vergleichend dazu lagen die Ausgangswerte von DMA und DMSO in jeweils 8%iger Endkonzentration zwar deutlich tiefer (MOT, DMA ca. 68 %; MOT, DMSO ca. 65 %; PMOT, DMA ca. 55 %; PMOT, DMSO ca. 50 %), garantierten aber im Vergleich mit den anderen eingesetzten Konzentrationen, bzw. mit Glycerin in allen untersuchten Konzentrationen die höchsten Ausgangswerte (Tabelle 17 und Tabelle 18). Die geringste Differenz der MOT zwischen den Untersuchungszeitpunkten (0 und 120 Minuten) bei den mit Kryoprotektiva versetzten Proben trat bei DMA 8 % auf ( $\Delta \sim 14$  %). Bei DMSO 8% betrug die Differenz nur wenig mehr (ca. 15 %) (Abbildung 39). Bei der PMOT verhielt es sich mit jeweils 15 % (DMA 8 %) und 17 % (DMSO 8 %) Differenz ähnlich. Der drastischste Abfall beider Beweglichkeitsraten war bei Glycerin zu beobachten, wobei der Effekt hier konzentrationsabhängig war. Schon zum ersten Untersuchungszeitpunkt, unmittelbar nach dem Zusatz der Kryoprotektiva, betrug die Gesamtmotilität (MOT) bei Glycerin 4 % lediglich ca. 18 %, die bis zum Ende des Untersuchungszeitpunktes auf unter 6 % abfiel. Bei der Verwendung von Glycerin 8 % startete die MOT bei einem Wert von nur 7,5 % und sank auf ca. 2 % ab. Die schlechtesten Ergebnisse lieferte Glycerin in 12%iger Konzentration. Hier betrug die MOT zum Zeitpunkt 0 lediglich 2,9 % und fiel bis zum Ende auf unter 1 % ab. Ein ähnlicher Verlauf ließ sich unter Verwendung von Glycerin bei der Vorwärtsmotilität (PMOT) verzeichnen. Der höchste PMOT-Wert innerhalb der Glycerinverdünnung konnte bei der geringsten Konzentration (4 %) zum Zeitpunkt 0 gemessen werden (ca. 8 %), wobei die PMOT der höchsten Konzentration (12 %) zu diesem Zeitpunkt bereits nur 1,8 % betrug und bis zum Ende hin auf 0,1 % absank.

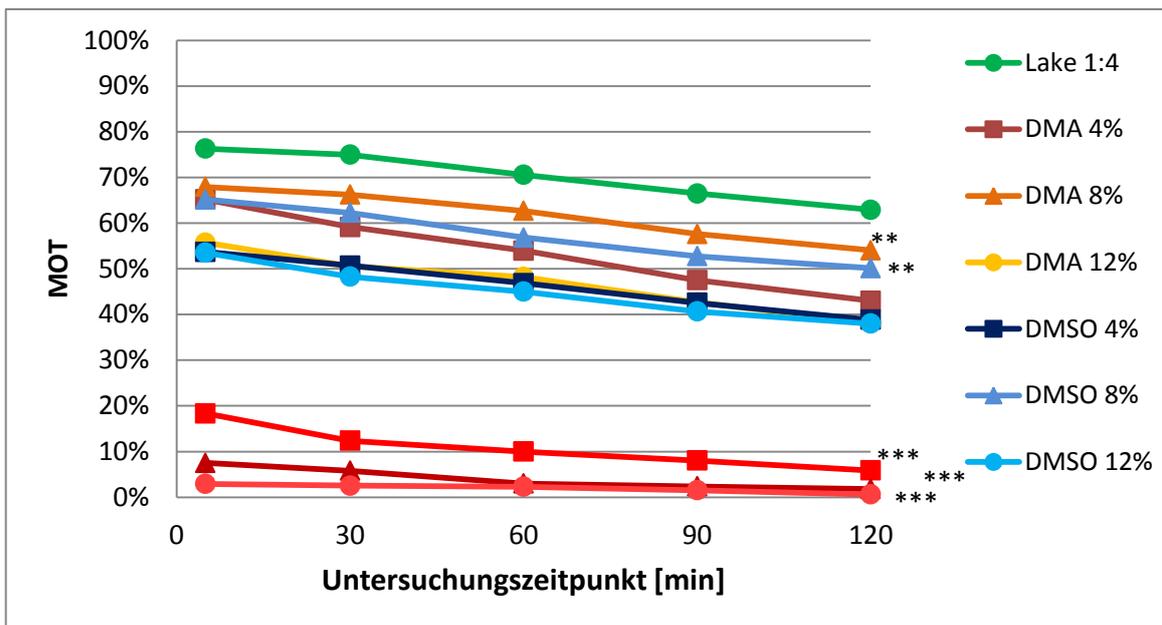


Abbildung 39: Mittelwerte in Prozent der Spermienesamtmotilität beim Vergleich der verschiedenen Kryoprotektiva in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 96)  
 Dimethylacetamid (DMA); Dimethylsulfoxid (DMSO); p < 0,0001 (\*\*\*) ; p < 0,01 (\*\*)

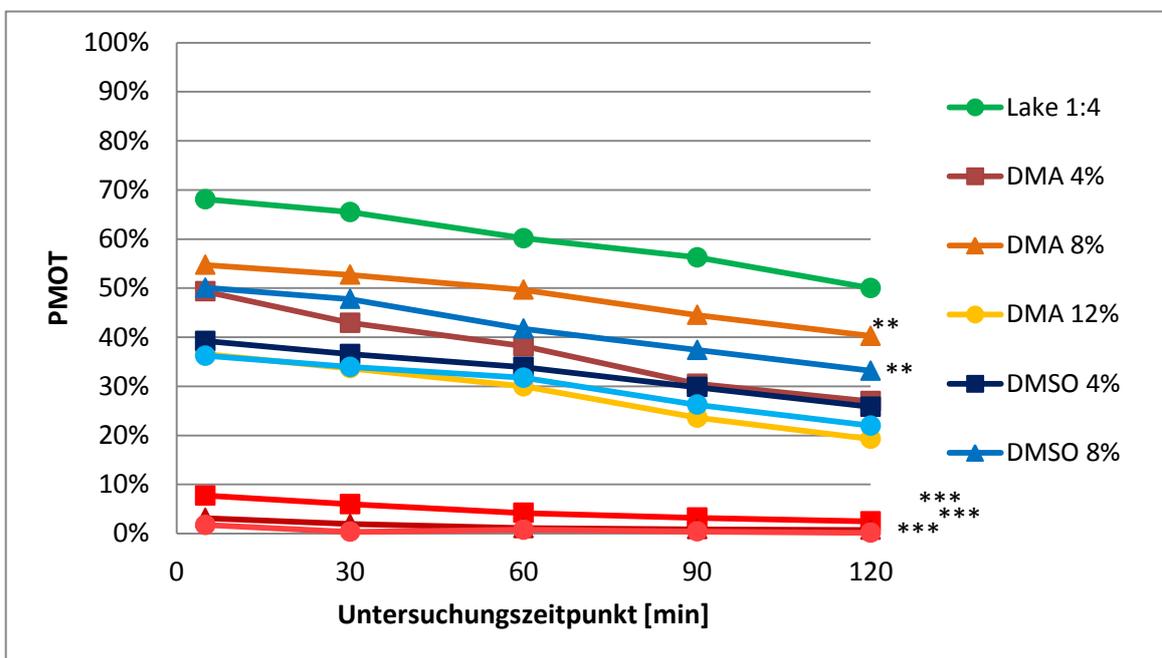


Abbildung 40: Mittelwerte in Prozent der Spermienvorwärtsmotilität beim Vergleich der verschiedenen Kryoprotektiva in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 96)  
 Dimethylacetamid (DMA); Dimethylsulfoxid (DMSO); p < 0,0001 (\*\*\*) ; p < 0,01 (\*\*)

Die statistische Auswertung der Ergebnisse identifizierte hochsignifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Kryoprotektiva ( $p < 0,0001$ ), wobei Glycerin deutlich am schlechtesten abschnitt. Die Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit betreffend traten hochsignifikante Unterschiede zwischen den Untersuchungszeitpunkten auf ( $p < 0,0001$ ), denn mit zunehmender Zeit verschlechterten sich die beiden Beweglichkeitsraten merklich. Auch die Endkonzentration der eingesetzten Kryoprotektiva hatte einen signifikanten Einfluss auf die Gesamt- ( $p = 0,0020$ ) und Vorwärtsbeweglichkeit ( $p = 0,0009$ ) (Tabelle 11). Bei Glycerin nahm der schädliche Einfluss hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ) mit steigender Konzentration zu (Tabelle 11), während ein signifikanter Unterschied zwischen DMA und DMSO in 8%iger Konzentration nicht zu verzeichnen war.

#### 4.2.3.2 Viabilitätsanalyse

Die Gesamtheit der zu evaluierenden Proben ( $n = 240$ ) ergab sich aus der Anzahl der untersuchten Kryoprotektiva (3), die in jeder Endkonzentration (3) zu zwei Zeitpunkten (0 und 120 Minuten) einer Viabilitätsanalyse unterlagen. Analog zur Motilitätsanalyse wurde jedes Kryoprotektivum in jeder Konzentration in acht Wiederholungen evaluiert. Zu beiden Zeitpunkten wurden vergleichend die Kontrollverdünnung, sowie native Spermaproben evaluiert.

3 Kryoprotektiva x 3 Konzentrationen x 2 Untersuchungszeitpunkte x 8 Wiederholungen  
= 144 Einzelproben

1 Kontrolle x 1 Verdünnungsstufe x 2 Untersuchungszeitpunkte x 24 Wiederholungen  
= 48 Einzelproben

1 native Spermaprobe x 2 Untersuchungszeitpunkte x 24 Wiederholungen  
= 48 Einzelproben

Im Zuge der Viabilitätsanalyse stellte sich sofort zu Beginn der Probenevaluation die Differenzierung der lebenden von toten Spermien bei der Verwendung von Eosin B als äußerst schwierig heraus. Der Grund war, dass in nahezu allen angefertigten Ausstrichen Färbeartefakte auftraten (Abbildung 41). Aus diesem Grund erfolgte die Vitalitätsbeurteilung bei der Evaluation der Kryoprotektiva ausschließlich über die

Fluoreszenzfärbung SYBR-14/PI nach den Methoden aus Kapitel 3.4.2.2, wohingegen die Eosin B-Ausstriche weiterhin zur morphologischen Differenzierung angefertigt und genutzt wurden.

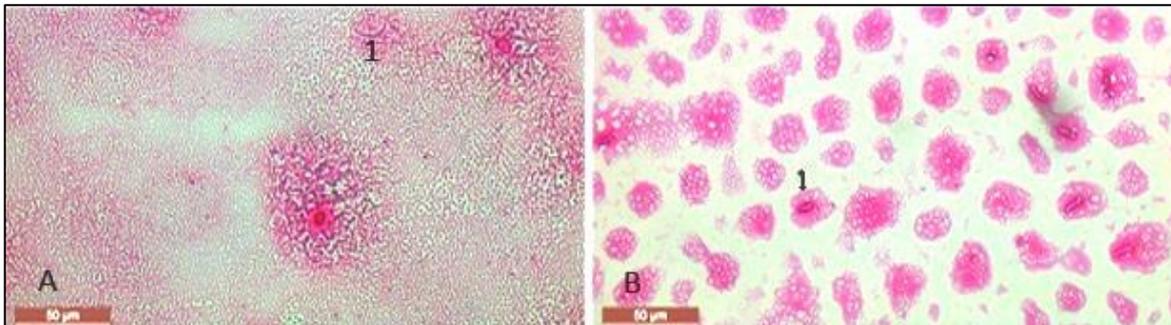


Abbildung 41: Färbeartefakte in Eosin B-Ausstrichen  
Eosin B-Ausstriche nach Zusatz von DMSO (A) und DMA (B) mit einzelnen Spermien (1), die von konzentrierten Arealen der Färbelösung umgeben sind

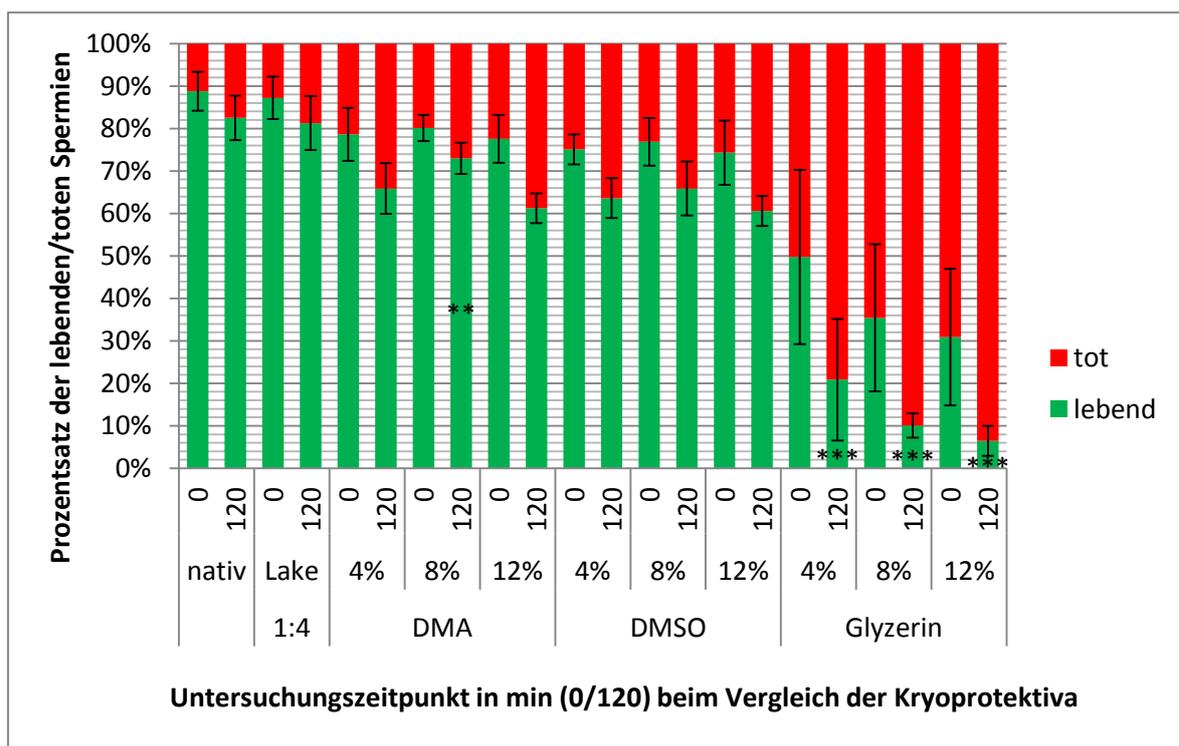


Abbildung 42: Mittelwerte und Standardabweichungen in Prozent der Spermiviabilität in Eosin B- und SYBR-14/PI-Ausstrichen beim Vergleich der nativen Spermproben mit verschiedenen Kryoprotektiva in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 240)

Dimethylacetamid (DMA); Dimethylsulfoxid (DMSO); p < 0,0001 (\*\*\*) ; p < 0,01 (\*\*)

Nach 120 Minuten lag ein deutlich reduzierter Lebendanteil der Spermien in allen Proben vor (Abbildung 42 und Tabelle 19). Die geringsten Reduktionen der Lebendraten traten bei den nativen Vergleichsproben und den verdünnten Spermaproben auf ( $\Delta \sim 6\%$ ). Der höchste Abfall der Spermiovitalität trat bei allen Proben auf, denen Glyzerin als Kryoprotektivum zugesetzt war ( $\Delta$  zwischen 25 und 29 %). Nach 120 Minuten waren bei 4%igem Glyzerin nur 20,9 %, bei 8%igem Glyzerin nur 10,1 % und bei 12%igem Glyzerin lediglich 6,4 % der Spermien vital (Abbildung 42 und Tabelle 19). Bei DMA in 8%iger Konzentration trat der geringste Abfall der Lebendrate innerhalb des Untersuchungszeitraumes auf ( $\Delta = 7,1\%$ ), sodass am Ende der Beobachtungszeit noch  $73 \pm 3,7\%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) vital waren. Alle anderen eingesetzten Kryoprotektiva und Endkonzentrationen ergaben eine Reduktion der Spermiovitalität zwischen 11 und 16 % (Abbildung 42 und Tabelle 19). Bei der statistischen Auswertung zeigte sich, dass die Vitalität signifikant vom Einsatz der verschiedenen Kryoprotektiva ( $p < 0,0001$ ) abhing. Vergleichend zur Motilität, hatte auch hier Glyzerin den schädlichsten Einfluss auf die Spermien. Bei allen eingesetzten Kryoprotektiva hatte der Untersuchungszeitpunkt einen hochsignifikanten Einfluss auf die Viabilität der Spermien ( $p < 0,0001$ ) (Tabelle 11), der durch die deutliche Reduktion der Vitalitätsrate nach 120 Minuten ersichtlich wurde. Übergreifend betrachtet hatte die eingesetzte Endkonzentration einen signifikanten Einfluss ( $p = 0,0034$ ), die im Einzelnen jedoch nur bei DMA und Glyzerin nachvollziehbar war. Im Fall von Glyzerin ließ sich ein signifikant negativer Einfluss ( $p = 0,0050$ ) der Konzentration auf die Spermiovitalität bestätigen. Hingegen hatte der Einsatz von DMA in 8%iger Konzentration im Vergleich zu allen anderen Kryoprotektiva und Konzentrationen den signifikant geringsten negativen Einfluss ( $p = 0,0025$ ) auf die Spermiovitalität. Bei der Verwendung von DMSO schien die eingesetzte Endkonzentration keinen Einfluss auf das Überleben der Spermien zu haben ( $p = 0,2236$ ) (Tabelle 8).

#### 4.2.3.3 Morphologische Analyse

Die morphologische Analyse erfolgte an den zuvor angefertigten Eosin B Ausstrichen. Insgesamt wurden 240 einzelne Ausstriche ausgewertet, in denen jeweils 200 Spermien analysiert und deren Morphologie nach den Methoden in Kapitel 3.4.2.3 kategorisiert

wurden. Die Kopfregion (31,5 %) war am häufigsten von Veränderungen betroffen, gefolgt multiplen Veränderungen innerhalb eines Spermiums (18,7 %), sowie von Anomalien der Geißel (17,5 %). Veränderungen des Akrosoms (1,5 %) und des Mittelstücks (0,9 %) traten in geringerer Häufigkeit auf. Im Mittel wurden 29,1 % morphologisch unveränderte Spermien pro Ausstrich ausgewertet. Analog zur spermienmorphologischen Verdünnerevaluierung lag auch hier die Gewichtung bei den Raten der normalen und kopfveränderten Spermien. In den nativen, unverdünnten Spermaproben trat der höchste Anteil normaler Spermien ([0]  $\bar{x}$  = 47,7 %; [120]  $\bar{x}$  = 42,3 %), bei gleichzeitig niedrigster Rate an Kopfveränderung, ([0]  $\bar{x}$  = 14 %; [120]  $\bar{x}$  = 16,5 %) auf (Tabelle 20). Im Vergleich der Kryoprotektiva ergab der Einsatz von DMA die niedrigste Rate von Kopfveränderungen, bei gleichzeitig höchstem Anteil morphologisch unveränderter Spermien (Abbildung 43, Tabelle 20). Der geringste Anteil an Kopfveränderungen zu beiden Zeitpunkten, und gleichzeitig auch die geringste Zunahme deren Anteils, wurde dabei in 8%iger Endkonzentration beobachtet ([0]  $\bar{x}$  = 17,1 %; [120]  $\bar{x}$  = 18,9 %). Auch bei dem Anteil normaler, unveränderter Spermien erzielte DMA 8 % die besten Ergebnisse. Hier lag die Abnahme mit 6,8 % vergleichbar zu der Kontrollverdünnung ( $\Delta$  = 5,5 %), während die höchste Abnahme dieser Kategorie von Glycerin in 8%iger Konzentration ( $\Delta$  = 13,7 %) zu verzeichnen war. Den geringsten Wert der normalen Spermien, der am Ende des Untersuchungszeitraumes zu verzeichnen war, wies Glycerin 12 % ([120]  $\bar{x}$  = 8,3 %) auf. Gleichzeitig fand sich hier auch der höchste Wert an Kopfveränderungen ([120]  $\bar{x}$  = 47 %) (Tabelle 20).

Übergreifend betrachtet, ließen sich signifikante Einflüsse der eingesetzten Kryoprotektiva ( $p < 0,0001$ ) auf den Anteil von Spermien mit Kopfveränderungen (Tabelle 8) feststellen. Allen Kryoprotektiva gemeinsam war ein signifikant höheres Aufkommen der erwähnten Kopfdeformationen ( $p < 0,0001$ ) bei verlängerter Lagerungszeit (120 min). Auch bei den eingesetzten Konzentrationen ließ sich ein signifikanter Einfluss auf das Auftreten von Kopfmalformationen ( $p < 0,0001$ ) erkennen. Speziell beim Einsatz von Glycerin kam es mit steigender Konzentration zu einem signifikant höheren Auftreten von Kopfdeformationen ( $p = 0,0144$ ) (Abbildung 43 und Tabelle 20). Bei DMA und DMSO in jeweils 8%iger Endkonzentration ließ im Vergleich zu den anderen untersuchten Konzentrationen (4 % und 12 %) und zu Glycerin in allen untersuchten Konzentrationen eine signifikant

niedrigerer Anteil an Kopfdeformationen ( $p < 0,0001$ ) verzeichnen. Ein Unterschied zwischen DMA und DMSO war nicht erkennbar. Bei allen eingesetzten Kryoprotektiva hatte der Untersuchungszeitpunkt auch einen hochsignifikanten Einfluss auf den Anteil normaler Spermien, der mit verlängerter Untersuchungszeit (120 Minuten) drastisch abnahm ( $p < 0,0001$ ) (Tabelle 11). Unter dem Einsatz von Glycerin trat zusätzlich ein konzentrationsabhängiger Effekt auf, sodass sowohl bei steigender Konzentration, als auch bei verlängerter Untersuchungszeit eine signifikant niedrigere ( $p < 0,0001$ ) Anzahl normaler Spermien vorlag. Lediglich bei der Verwendung von DMSO schien die eingesetzte Endkonzentration keinen Einfluss auf den Anteil normaler Spermien zu haben ( $p = 0,1465$ ). Bei DMA fand sich in 8%iger Endkonzentration ein signifikant höherer Anteil normaler Spermien ( $p = 0,0023$ ) als bei den Vergleichsproben. Der Anteil der Schwanzveränderungen war ebenfalls signifikant abhängig vom Kryoprotektivum ( $p < 0,0001$ ), wobei hier der höchste Anteil bei DMA in 8%iger Konzentration auftrat ( $p = 0,0002$ ). Bei allen Kryoprotektiva in allen untersuchten Konzentrationen kam es zu einem vermehrten Auftreten von Schwanzdeformationen nach 120 Minuten, sodass hier ein hochsignifikant zeitabhängiger Effekt ( $p < 0,0001$ ) zu sehen war. Der Anteil von multiplen Veränderungen war nur von den eingesetzten Kryoprotektiva und dem Untersuchungszeitpunkt abhängig ( $p < 0,0001$ ), jedoch nicht von deren Konzentration ( $p = 0,0665$ ). Der höchste Anteil multipler Spermienveränderungen, die auch Veränderungen des Kopfes beinhalteten, trat bei Glycerin auf ( $p = 0,0333$ ). Einzig bei der Verwendung von DMSO als Kryoprotektivum trat bei längerer Lagerungszeit ein höherer Anteil von Verbindungsstückveränderungen ( $p = 0,0119$ ) auf, während diese Veränderungen durch DMA und Glycerin nicht signifikant beeinflusst wurden. Ein vermehrtes Auftreten von Akrosomveränderungen wurde bei DMA unter längerer Lagerungszeit beobachtet (Tabelle 11). Insgesamt stellten sich DMA und DMSO als ähnlich geeignete Kryoprotektiva dar, im weiteren Verlauf wurde jedoch bevorzugt DMA 8 % eingesetzt, da es geringfügig höhere Motilitäts- und Viabilitätsraten am Ende des Beobachtungszeitraumes aufwies als DMSO. Zusätzlich erreichte DMA, vor allem in 8%iger Konzentration, eine höhere Anzahl morphologisch unveränderter Spermien, bei gleichzeitig geringerem Vorkommen von Kopfveränderungen als DMSO.

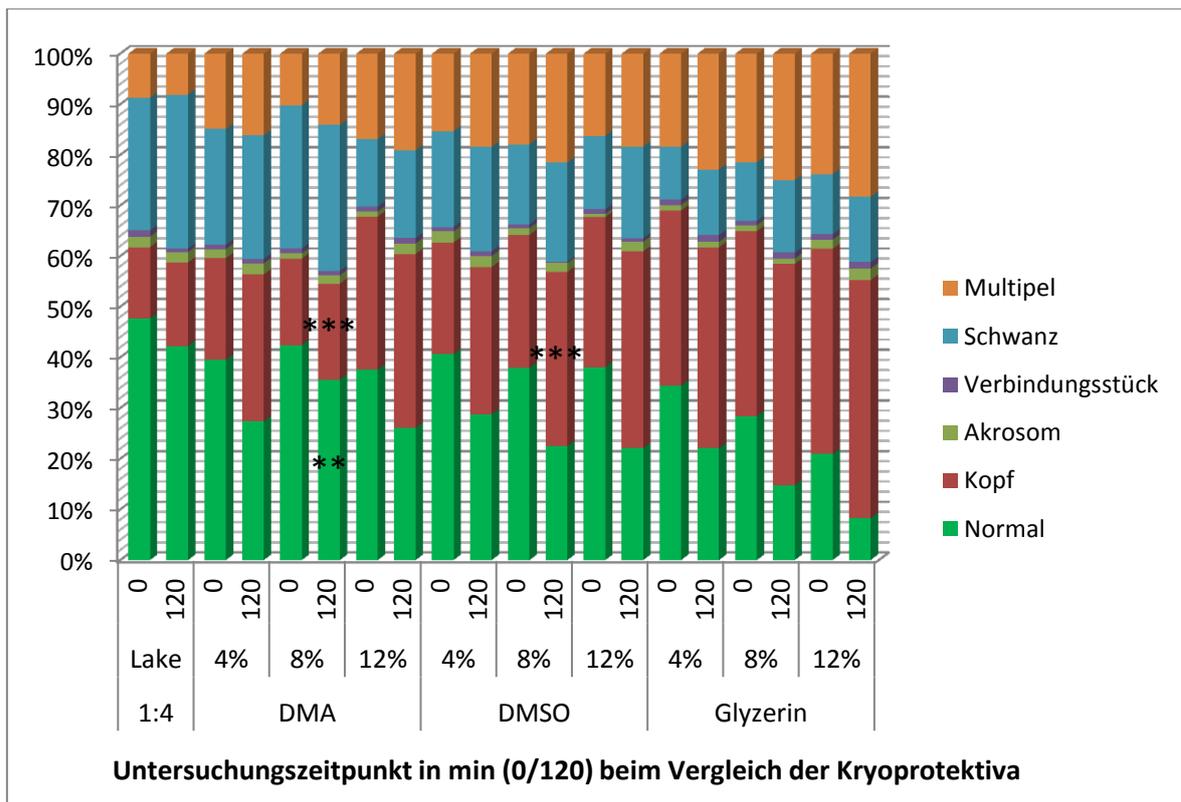


Abbildung 43: Mittelwerte in Prozent der morphologischen Spermienveränderungen in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der verdünnten Spermaproben mit verschiedenen Kryoprotektiva in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 240) Dimethylacetamid (DMA); Dimethylsulfoxid (DMSO); p < 0,0001 (\*\*\*) ; p < 0,01 (\*\*)

#### 4.2.4 Evaluierung der Kühlrate

Insgesamt wurden 35 Spermapoolproben [Vitrifikation (n = 8); IceCube (n = 15); direktes Eintauchen (n = 12)] der Kühlratenevaluierung unterzogen. Durch Aliquotierung ergaben sich insgesamt 86 Einzelproben, die nach den Methoden aus Kapitel 3.4.5 eingefroren wurden. Das Auftauen bzw. Erwärmen erfolgte durch die Überführung der gefrorenen Spermaproben in ein Eiswasserbad (s. Kap. 3.4.6.1). Allen Einfriermethoden gemeinsam war die drastische Reduktion sowohl der Spermiengesamt- und Vorwärtsmotilität, als auch der Viabilität nach Auftauen bzw. Erwärmen der Proben. Die besten Ergebnisse ließen sich durch langsames, kontrolliertes Einfrieren mit Hilfe des IceCube erzielen. Hier lag der Anteil lebender Spermien bei ca. 30 %, von denen ca. 22 % gesambeweglich waren, und sich ca. 10 % vorwärts bewegten. Auch in der statistischen Auswertung ließ sich bestätigen, dass die Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit, sowie die Viabilitätsrate der Spermien hochsignifikant (p < 0,001) von der Einfriermethode und den

Untersuchungszeitpunkten abhing (Tabelle 12). Ebenso verhielt es sich mit dem Anteil der morphologisch normalen Spermien, sowie den Anteilen der Kopf- und multiplen Veränderungen, die allesamt bei der langsamen Einfrieremethode bessere Ergebnisse erzielten. Die detaillierten Ergebnisse aus den Teilversuchen werden im Folgenden näher beschrieben.

#### **4.2.4.1 Schnelle Kühlrate**

##### **4.2.4.1.1 Vitrifikation**

Insgesamt ergaben sich aus acht Poolproben, die jeweils in vier Aliquots aufgeteilt wurden, 32 Einzelproben zur Untersuchung der ultraschnellen Kühlrate. Die Methode der Vitrifikation führte zu einem starken Abfall der Motilitäts (MOT & PMOT)- und Viabilitätsraten nach dem Erwärmen der Spermeproben auf Werte nahe 0 %, in beiden Vitrifikationsmethoden (ohne Kryoprotektivum, bzw. mit CryoSOfree™) (Abbildung 44, Tabelle 21 und Tabelle 22). Die Analyse der Morphologie ergab einen höheren Anteil an Kopfveränderungen ( $\bar{x} \pm SD = 44,4 \pm 1,9$  %) nach dem Auftauen, verglichen mit dem Ausgangswert vor dem Einfrieren ( $\bar{x} \pm SD = 17,3 \pm 2,1$  %), wohingegen sich der Anteil der normalen Spermien entsprechend verringerte ( $\Delta = 37,6$  %) (Abbildung 47 und Tabelle 24). Die anderen Regionen der Spermienzelle (Akrosom, Verbindungsstück, Schwanz) blieben in ihrem Anteil der Veränderungen weitestgehend unverändert. Lediglich der Anteil der Mehrfachveränderungen stieg von  $12,8 \pm 1,6$  % auf  $22 \pm 1,5$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) durch das erhöhte Vorkommen von Kopfveränderungen (Abbildung 47 und Tabelle 24). Insgesamt stellten sich die durch Vitrifikation erzielten Ergebnisse als nicht zielführend dar.

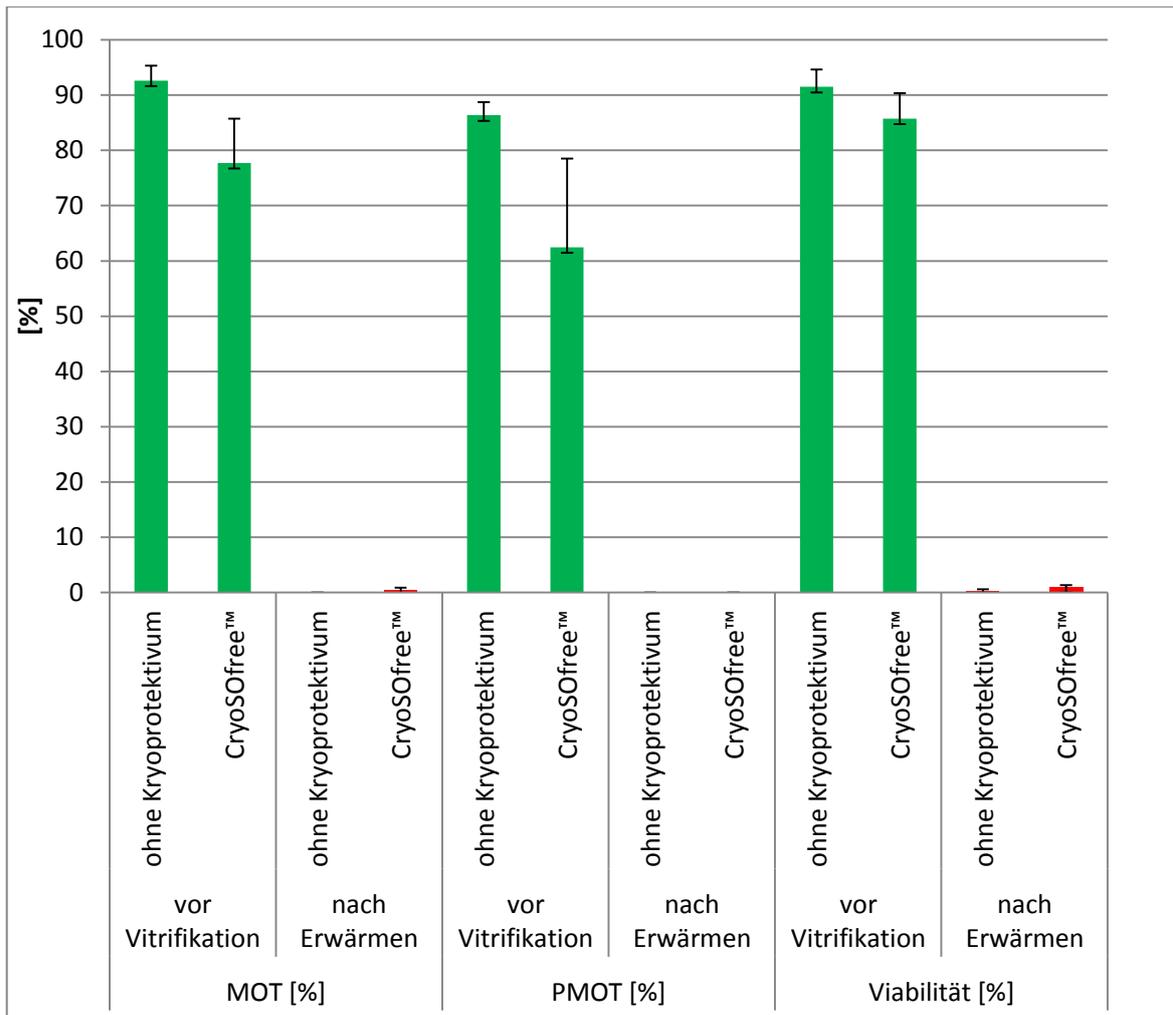


Abbildung 44: Mittelwerte und Standardabweichungen in Prozent der Spermienmotilität (MOT und PMOT) und –viabilität beim Vergleich der Vitrifikationsmethoden (n =8)  
 Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT)

**4.2.4.1.2 Direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff**

Aus den 12 Poolproben ergaben sich durch Aliquotierung 24 Einzelproben zur Untersuchung der schnellen Kühlrate durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff. Diese Methode der schnellen Tiefgefrierung resultierte ebenfalls in einer starken Reduktion der Gesamt- und Vorwärtsmotilität, sowie der Lebend/Tot-Rate (Abbildung 46 und Tabelle 21). Die im ursprünglichen Versuch vorgesehene Evaluierung von DMA in 8%iger Endkonzentration führte insgesamt zu einem Abfall der Gesamtmotilität von  $78,2 \pm 0,4 \%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) auf  $0,8 \pm 0,2 \%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ), die Vorwärtsmotilität fiel von  $57,3 \pm 0,8 \%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) auf  $0 \pm 0 \%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ). Auch die Spermienvitalität sank von  $69,5 \%$  auf  $1,5 \%$  ( $\Delta = 68 \%$ ). Der Anteil der morphologischen Veränderungen stieg was Kopfveränderungen betraf von  $18,5 \pm 2,1 \%$  auf  $30,5 \pm 3,2 \%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ), wohingegen der Anteil normaler Spermien entsprechend

sank ( $\Delta = 18\%$ ). Der Anteil der multiplen Veränderungen innerhalb eines Spermiums stieg von  $17,5 \pm 1,1\%$  auf  $25,3 \pm 1,9\%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ). Akrosom-, Verbindungsstück- und Schwanzveränderungen wurden nicht merklich durch die Methode des schnellen Einfrierens beeinflusst. Die zusätzliche, außerhalb des ursprünglich geplanten Versuches, durchgeführte Evaluation von DMA 12 %, DMSO 8 % & 12 %, sowie Glycerin 8 % & 12 % führte jedoch auch nicht zu besseren Ergebnissen. Das vergleichsweise beste Resultat dieser zusätzlichen Evaluation wurde beim Einsatz von DMSO (12 %) erzielt, bei dem nach Auftauen eine Gesamtmotilität von  $5,5 \pm 1,0\%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) bei einer Vorwärtsmotilität von  $1,9 \pm 0,3\%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) und einer Viabilität von  $12,5 \pm 2,5\%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) (Abbildung 45 und Tabelle 23).

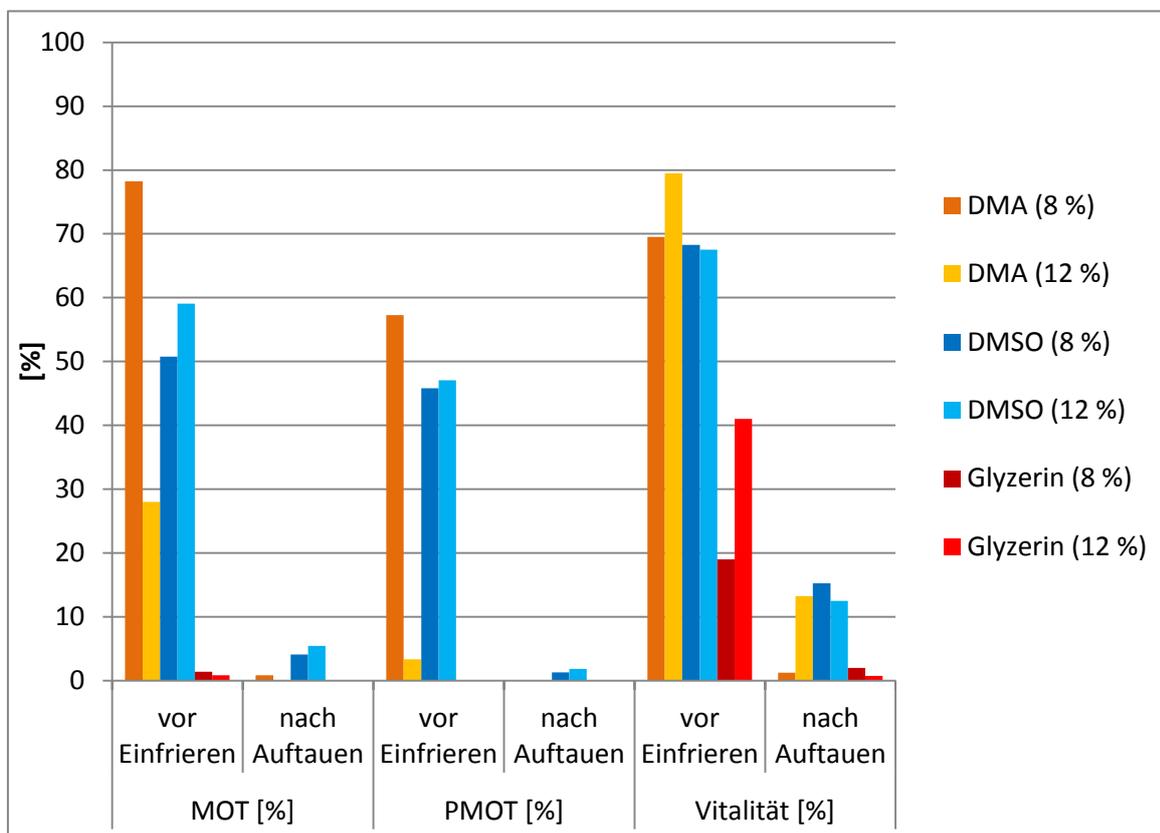


Abbildung 45: Mittelwerte in Prozent der Spermiengesamt- und vorwärtsmotilität, sowie der -viabilität beim Vergleich der verschiedenen Kryoprotektiva und Konzentrationen beim direkten Eintauchen in flüssigen Stickstoff (n = 24)

Gesamtmotilität (MOT), Vorwärtsmotilität (PMOT)

#### 4.2.4.2 Langsame Kühlrate

##### 4.2.4.2.1 Kalibrierung des Einfrierautomatens

Die Einstellung des Einfrierprotokolls mit optimalem „seeding“-Verlauf erfolgte für DMA in 8%iger Endkonzentration durch experimentelles Anpassen der einzelnen Kühlungsschritte. Letztendlich ergab sich das folgende Einfrierprotokoll, welches für alle nachfolgenden Spermaproben Anwendung fand. Die Starttemperatur wurde auf +4 °C festgelegt, da die Proben sich während des Transportes bereits in +4 °C kaltem Wasser befanden. Diese Temperatur wurde für drei Minuten gehalten, bevor ein langsamer Kammertemperaturabfall von 3 °C/min bis auf ca. -35 °C über ca. 13 Minuten angestrebt wurde (Tabelle 6). Innerhalb dieser Temperaturabsenkung lag aber der Kristallisationspunkt der Proben, bei dem es zu einer Freisetzung von Energie in Form von Wärme kommt. Dieser unerwünschten Temperaturerhöhung musste durch eine rasche Absenkung der Kammertemperatur auf -42 °C entgegengewirkt werden (Tabelle 6, Schritt 4). Um jedoch nicht zu einem zu raschen Absinken der Proben temperatur zu führen, erfolgte nun, innerhalb knapp einer Minute, die Erwärmung der Kammer auf -17 °C (Tabelle 6, Schritt 5) und von dort aus die erneute Absenkung auf -35 °C über einen Zeitraum von ca. 6 Minuten (Tabelle 6, Schritt 6). Von -35 °C bis -140 °C sollte dann die Temperatur innerhalb von ca. 3 Minuten abfallen, was eine schnellere Kühlrate von ca. -50 °C/min erforderte (Tabelle 6, Schritt 7). Da nun der kritische Punkt überwunden war, konnte die konstante rasche Absenkung auf -140 °C erfolgen. Der letzte Schritt bestand in einer langsamen Absenkung der Kammertemperatur auf -150 °C innerhalb von 3 Minuten. Anschließend wurden die Proben bei dieser Temperatur für 15 Minuten gehalten und mussten innerhalb dieser Zeit in den flüssigen Stickstoff überführt werden.

**Tabelle 6:** Verlauf der Kammertemperatur (Temp.) zu verschiedenen Zeitpunkten beim computerkontrollierten Einfrieren 8%iger DMA Proben mit Hilfe des IceCube 14S

Schritt	Zeit [min]	Zeit-Δ [min]	Temp. [°C]	Temp.-Δ [°C]	Slope [°C/min]
1	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0
2	3,0	3,0	4,0	0,0	0,0
3	6,5	3,5	-8,0	-12,0	-3,4
4	7,0	0,5	-42,0	-34,0	-68
5	8,0	1,0	-17,0	+25,0	+25
6	13,8	5,8	-35,0	-18,0	-3,1
7	15,8	2,0	-140,0	-105,0	-52,5
8	16,8	1,0	-150,0	-10,0	-10,0
9	31,8	15	-150,0	0,0	0,0

Verlauf der Kammertemperatur (Temp), Differenz (Δ), Temperaturdifferenz/min (Slope)

#### 4.2.4.2.2 Computergestütztes kontrolliertes Einfrieren von Sperma

Insgesamt 15 Spermapoolproben wurden langsam computergestützt und kontrolliert eingefroren. Durch Aliquotierung entstanden 30 Spermaproben, die vor dem Einfrierprozess eine mittlere Gesamtmotilitätsrate von  $71,3 \pm 12,4$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) aufwiesen. Nach dem Auftauen durch Überführen in ein Kaltwasserbad (s. Kap. 3.4.6.1) lag die Gesamtbeweglichkeit bei  $22,2 \pm 11,3$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ), was einen signifikanten ( $p < 0,0001$ ) Unterschied zu den Ergebnissen der Vitrifikation (s. Kap. 4.2.4.1.1) und des direkten Eintauchens in flüssigen Stickstoff (s. Kap. 4.2.4.1.2) bedeutete. Ähnlich signifikante Ergebnisse ( $p = 0,0027$ ) traten beim Vergleich initialer ( $\bar{x} \pm SD = 51,6 \pm 20,7$  %) und nach dem Auftauen erreichter Vorwärtsmotilitätsraten ( $\bar{x} \pm SD = 10,7 \pm 7,9$  %) auf (Abbildung 46 und Tabelle 21). Auch die nach dem Auftauen erreichte Viabilitätsrate war bei langsam eingefrorenen Spermaproben hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ) höher ( $\bar{x} \pm SD = 29,8 \pm 14,6$  %) als bei den anderen Einfriermethoden (Abbildung 46 und Tabelle 21). Bei der morphologischen Analyse stieg der Anteil der Kopfveränderungen von  $16,4 \pm 0,4$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) auf  $23,4 \pm 0,4$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ), wohingegen die normalen Spermien von  $40,4 \pm 0,4$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) auf  $29,7 \pm 0,4$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) fielen (Abbildung 47 und Tabelle 24). Die restlichen Kategorien blieben in ihren Anteilen im Wesentlichen stabil.

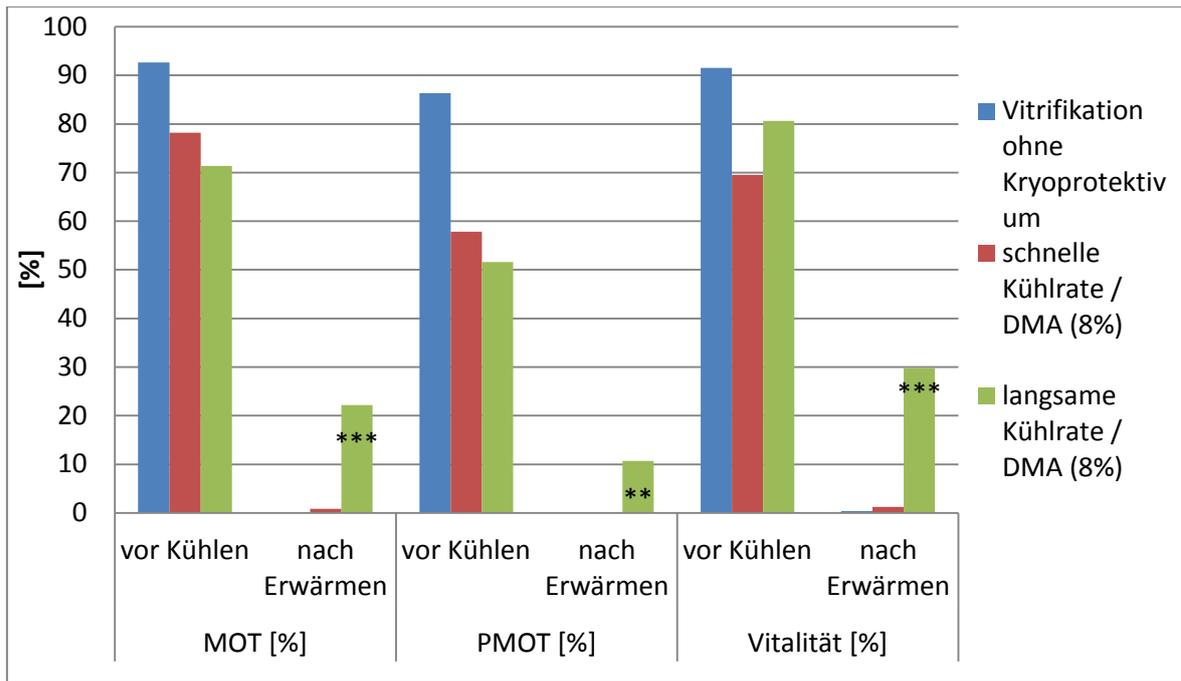


Abbildung 46: Mittelwerte in Prozent der Spermiengesamt- und vorwärtsmotilität, sowie der -viabilität beim Vergleich der verschiedenen Einfrieremethoden (n = 62)

Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT); p < 0,0001 (\*\*\*) ; p < 0,01 (\*\*)

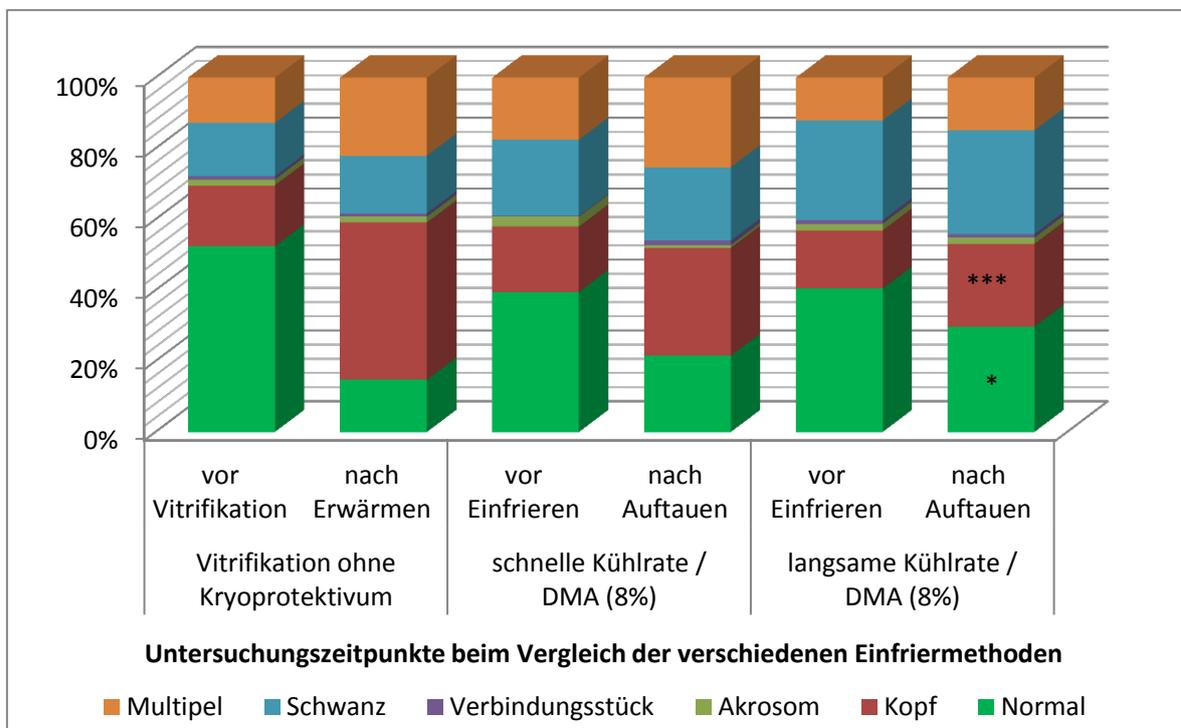


Abbildung 47: Mittelwerte in Prozent der morphologischen Spermienveränderungen in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der verschiedenen Einfrieremethoden (n = 62)

Dimethylacetamid (DMA); Dimethylsulfoxid (DMSO); p < 0,0001 (\*\*\*) ; p ≤ 0,05 (\*)

Im Vergleich der verschiedenen Kühlraten und Einfriermethoden stellte sich insgesamt die Methode des langsamen Einfrierens als die am besten geeignete Methode zur Tiefgefrierung von Nymphensittichspermien dar, da auf diese Weise die höchsten Motilitäts- (MOT und PMOT) und Vitalitätsraten, sowie der höchste Anteil morphologisch normaler Spermien ( $p = 0,001$ ), bei gleichzeitig signifikant niedrigerem Aufkommen von Kopfveränderungen ( $p < 0,0001$ ) erzielt wurden (Abbildung 47 und Tabelle 12).

#### **4.2.5 Evaluierung verschiedener Auftau- bzw. Erwärmmethoden**

##### **4.2.5.1 Kaltwasserbad**

Zunächst war vorgesehen alle kryokonservierten Spermaproben aus dem Stickstoffcontainer ausschließlich durch schnelles Überführen in ein +4 °C kaltes Eiswasserbad aufzutauen. Dieses Verfahren wurde an allen 54 Einzelproben angewendet, die durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff, bzw. mit Hilfe des Einfrierautomaten für eine Dauer von mindestens 24 Stunden tiefgefroren wurden (direktes Eintauchen,  $n = 24$ ; IceCube,  $n = 30$ ). Proben, die durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff gefroren wurden, wiesen nach dem Auftauprozess im Kaltwasserbad maximal einen Anteil lebender Spermien von 15 % ( $\bar{x} = 12,5$  %) bei einer mittleren Gesamtbeweglichkeit von 5,5 % und einer Vorwärtsbeweglichkeit von 1,9 %, auf. Die besten Ergebnisse ließen sich bei kontrolliert, langsam tiefgefrorenen Spermaproben erzielen, die mit Hilfe des Kaltwasserbades aufgetaut wurden. Hier lag der höchste Anteil lebender Spermien bei 48,5 % ( $\bar{x} = 29,8$  %), von denen maximal 39,4 % ( $\bar{x} = 22,2$  %) gesamtbeweglich und maximal 32,8 % ( $\bar{x} = 10,7$  %) vorwärtsbeweglich waren.

##### **4.2.5.2 Auftauen nach Vitrifikation**

Zusätzlich wurden die 32 vitrifizierten Einzelproben einer Evaluierung sieben verschiedener Erwärmmethoden unterzogen (s. Kap. 3.4.6). Allen Methoden gemeinsam war die drastische Reduktion der Gesamt- und Vorwärtsmotilität, sowie der Spermienviabilität nach dem Erwärmen im Vergleich zu den Ausgangsproben, egal welche Erwärmethode zu Grunde lag. Ausgehend von einer MOT von  $85,3 \pm 6,9$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) lag die höchste Gesamtbeweglichkeit bei 0,7 % nach kombinierter Auftaumethode

(4 °C + 37 °C Wasserbad). Auch bei der Vorwärtsmotilität ( $\bar{x} = 0,2 \%$ ) und der Viabilität ( $\bar{x} = 1,1 \%$ ) wurden die höchsten Anteile nach der kombinierten Wasserbadmethode erzielt, im Vergleich zu den Ausgangswerten (PMOT,  $\bar{x} \pm SD = 75 \pm 11,1 \%$ ; Viabilität,  $\bar{x} \pm SD = 89,3 \pm 3,2 \%$ ) wird der drastische Qualitätsverlust jedoch deutlich.

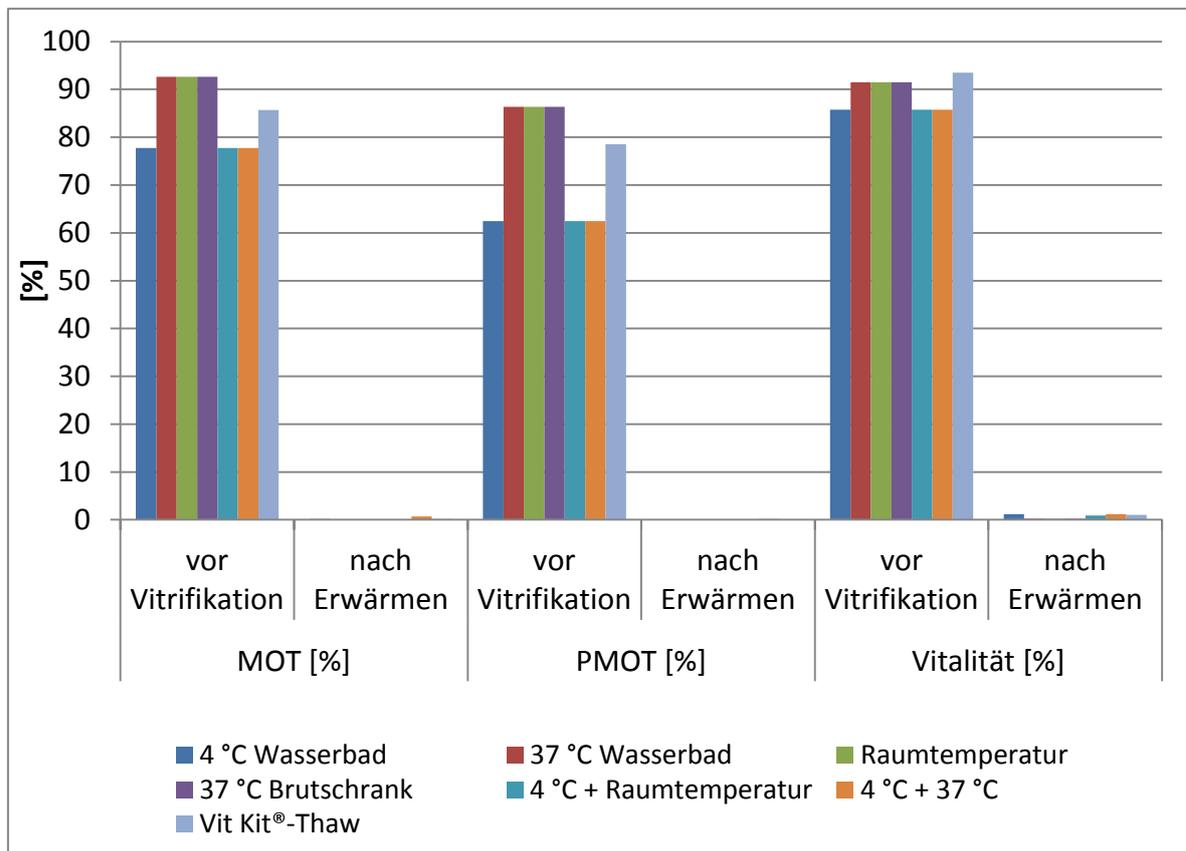


Abbildung 48: Mittelwerte in Prozent der Spermiengesamt- und vorwärtsmotilität, sowie der -viabilität beim Vergleich der verschiedenen Auftaumethoden (n = 56)  
Gesamtmotilität (MOT), Vorwärtsmotilität (PMOT)

Aufgrund der Homogenität der Ergebnisse der Evaluierung verschiedener Erwärmmethoden war es nicht möglich, einen statistisch signifikanten Unterschied zu ermitteln. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, werden im Folgenden nur die Ergebnisse der auf die gleiche Art und Weise, nämlich durch Vitrifikation, gekühlten Proben, zusammengefasst in Abbildung 48 und Tabelle 25 erläutert.

#### 4.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Insgesamt wurden pro Spermienregion (Akrosom, Kopf, Mittelstück, Schwanz) 25 Membranabschnitte im Elektronenmikroskop betrachtet. Bei der Beurteilung der Plasmamembranabschnitte wurde ein, im Vergleich zur Untersuchung von nativem Sperma, gesteigerter Integritätsverlust verzeichnet. Im Bereich des Akrosoms trat in 20 % der Fälle ein Integritätsverlust auf, im Bereich des Kopfes sogar in 48 % der Fälle (Abbildung 49 & Abbildung 50). Im Bereich des Mittelstücks waren 16 % der untersuchten Membranabschnitte verändert, wohingegen bei den untersuchten Schwanzabschnitten lediglich 8 % eine Irregularität aufwiesen (Tabelle 32). Soweit erkennbar, waren alle im Inneren liegenden Strukturen (Akrosomvesikel, Perforatorium, proximales und distales Zentriol, Zellkern, Mitochondrien) jedoch intakt.

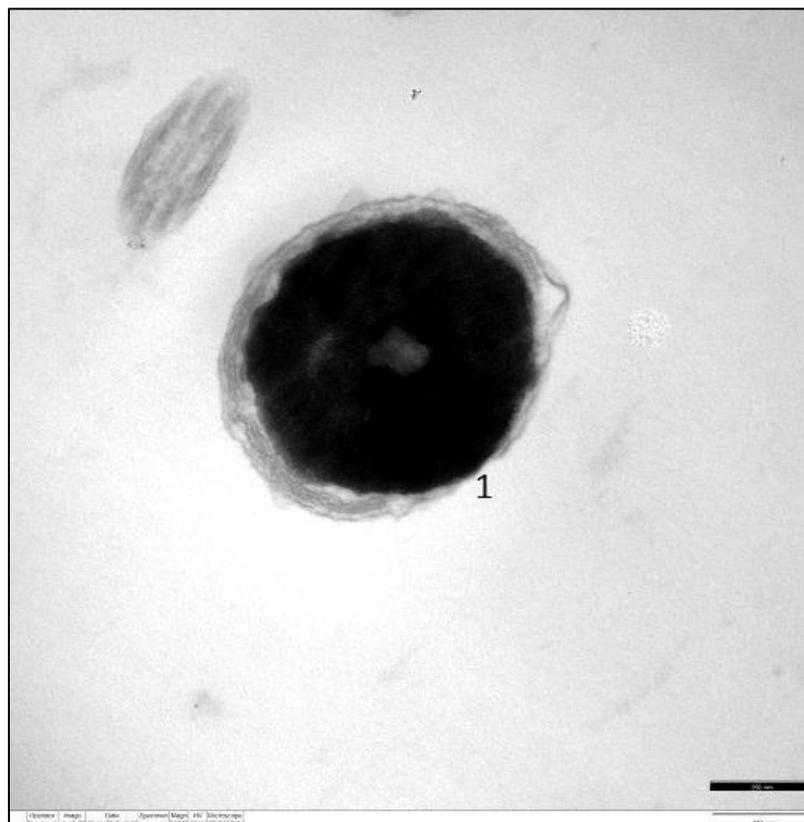


Abbildung 49: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (Querschnitt): Integritätsverlust der Spermienmembran im Kopfbereich eines Nymphensittichspermiums (1)

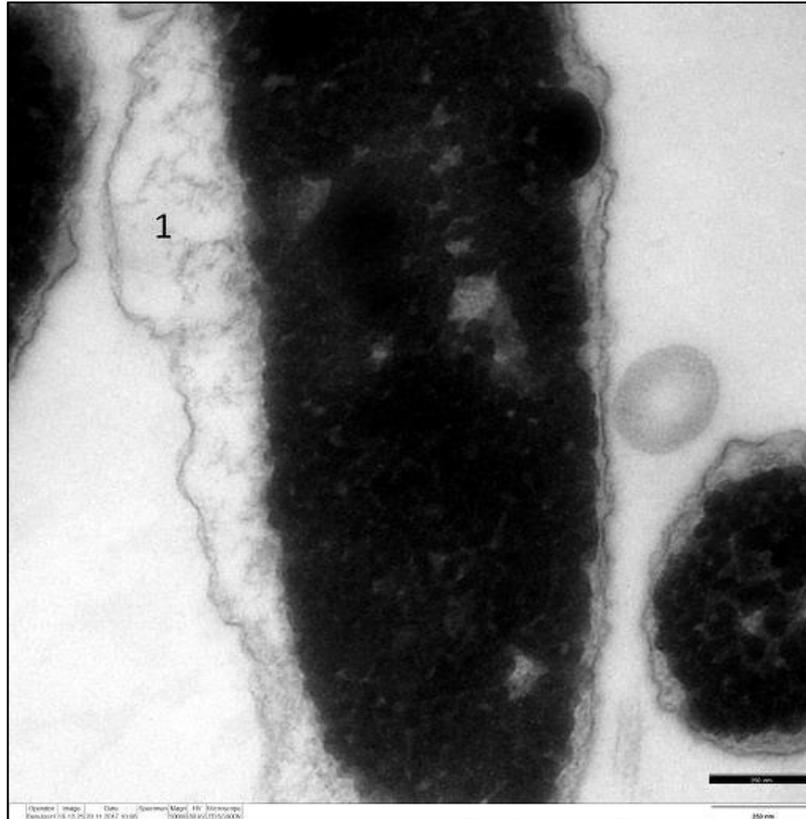


Abbildung 50: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (Längsschnitt): Ablösung der Spermienmembran im Kopfbereich eines Nymphentrichspermiums (1)

#### 4.2.7 Fertilisationsversuch

Durch die schrittweise Evaluation der Spermazusätze (Verdüner, Kryoprotektiva), sowie des Einflusses der Einfrierrate, konnte ein In-vitro-Protokoll zur Kryokonservierung von Nymphentrichspermien entwickelt werden. Das Protokoll wurde aus den Zusätzen und Methoden zusammengesetzt, die bei den Einzelevaluierungen die besten Ergebnisse hinsichtlich Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit, sowie Spermiovitalität und den Anteil normaler, morphologisch unveränderter Spermien erzielten. Um die tatsächliche Befruchtungsfähigkeit der kryokonservierten Spermien zu untersuchen, war nun das Tieffrieren weiterer Spermaproben anhand des entwickelten Protokolls notwendig. Dazu wurden die native Spermapoolprobe zuerst 1:4 mit dem modifizierten Lake-Verdüner versetzt, dann wurde das Kryoprotektivum DMA in 8%iger Endkonzentration zugefügt und die Proben wurden mit Hilfe des IceCube 14S kontrolliert langsam eingefroren. Zum

Auftauen wurden die Proben in ein Kaltwasserbad überführt und vergleichend zu Frischspermaproben durch artifizielle Insemination evaluiert.

#### **4.2.7.1 Endoskopische Sterilisation männlicher Nymphensittiche**

Bei der endoskopischen, partiellen Vasektomie der Hähne traten in drei Fällen während der Operation geringgradige Blutungen des Gekröses auf, die jedoch den Verlauf des Eingriffes nicht beeinträchtigten. In drei weiteren Fällen traten mittelgradige Blutungen auf, aufgrund derer die Eingriffe unterbrochen wurden und am nachfolgenden Tag fortgeführt wurden. Ein Hahn fiel am Morgen nach dem Eingriff mit hochgradiger Dyspnoe auf und musste am gleichen Morgen aufgrund einer persistierenden Lungenblutung euthanasiert werden. Fünfundneunzig Prozent der Tiere (19/20) erholten sich problemlos von dem Eingriff, sodass sie ca. 24 Stunden nach Vollendung des Eingriffes wieder in ihre Voliere entlassen werden konnten. Der fehlende Hahn wurde nicht ersetzt, da noch bevor der Befruchtungsversuch begann, auch ein Weibchen der Gruppe 1 aufgrund eines rezidivierenden, therapieresistenten Unterflügelkzems euthanasiert werden musste. Der Erfolg der Sterilisation wurde in beiden Gruppen durch eine 100%ige Rate der unbefruchteten Eier in vier aufeinander folgenden Gelegen verifiziert.

#### **4.2.7.2 Erstes Inseminationsexperiment**

Die Gruppe 1 der Hennen bestand aufgrund der Euthanasie einer Henne in der Folge nur noch aus 9 Tieren. Während des ersten Inseminations-Experimentes wurden 7/9 Weibchen drei Mal im Abstand von drei Tagen mit Frischsperma artifiziell inseminiert, nachdem das erste Ei der Gruppe gelegt worden war. Die restlichen zwei Weibchen zeigten zu keinem Zeitpunkt des ersten Experimentes Anzeichen sexueller Aktivität, zusätzlich zu eng stehenden Ossa pubica und eine nicht bis wenig prominente Oviduktöffnung und wurden daher nicht in den Versuch inkludiert. Zwölf der insgesamt 21 (57,1 %) artifiziellen Insemination wurden intrakloakal in die Nähe der Oviduktöffnung vorgenommen, da die Vögel Abwehrbewegungen vollführten. Neun der artifiziellen Inseminationen (42,9 %) wurden intravaginal vorgenommen. Im Durchschnitt wurde eine Spermienkonzentration  $391.677 \pm 179.795,4$  Spermien/ $\mu\text{l}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) pro

Inseminationsvorgang bei einem Inseminationsvolumen von im Mittel  $13 \pm 1,4 \mu\text{l}$  pro Henne genutzt (Abbildung 51, Tabelle 26 und Tabelle 4). Insgesamt wurden 27 Eier im Zeitraum des ersten Besamungsversuches gelegt, von denen sich bei 25 Eiern embryonales Wachstum erkennen ließ. Die Befruchtungsrate lag somit bei 92,6 % (Tabelle 33).

Vergleichend wurden 7/10 Hennen der Gruppe 2 artifiziell mit TG-Sperma inseminiert. Neun von insgesamt 21 Inseminationen (42,9 %) wurden 12 Inseminationen (57,1 %) intravaginal vorgenommen. Aufgrund von Abwehrbewegungen wurden die verbleibenden 9 Inseminationen (42,9 %) intrakloakal durchgeführt. Pro Insemination wurde eine mittlere Spermienkonzentration von  $794667 \pm 177.360,9$  Spermien/ $\mu\text{l}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) bei einem Volumen von  $11 \pm 0,9 \mu\text{l}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) und einer Inseminationsdosis von  $2.159.000 \pm 679.874$  Spermien ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) verwendet (Abbildung 51, Tabelle 26 und Tabelle 4). In 8 von 26 (30,8 %) gelegten Eiern wurde Embryonalwachstum detektiert (Tabelle 33).

#### 4.2.7.3 Zweites Inseminationsexperiment

Während des zweiten Inseminations-Experimentes wurden 8/9 Hennen der Gruppe 1 mit TG-Sperma besamt. Von insgesamt 24 Inseminationen konnten 14 (58,3 %) intravaginal vorgenommen werden, 10 Inseminationen (41,7 %) mussten jedoch intrakloakal erfolgen. Im Mittel betrug die Spermienkonzentration  $1.211.000 \pm 358.916$  Spermien/ $\mu\text{l}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) in einem Volumen von  $11 \pm 0,9 \mu\text{l}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) und ergab so eine Inseminationsdosis von  $3257500 \pm 1051322,6$  Spermien/Tier ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) (Abbildung 51, Tabelle 26 und Tabelle 4). Im Zeitraum des zweiten Inseminationsexperimentes wurden in dieser Gruppe insgesamt 50 Eier gelegt. Bei neun Eiern (18 %) wurde embryonales Wachstum nachgewiesen (Tabelle 33).

Vergleichend dazu wurden 7/10 Hennen der Gruppe 2 artifiziell mit Frischsperma inseminiert. Die verbliebenen Vögel zeigten keinerlei Anzeichen von sexueller Aktivität oder Legebereitschaft und wurden daher vom Experiment ausgeschlossen. Neun von 21 (42,9 %) der Inseminationen wurden intrakloakal vorgenommen, während 12/21 (57,1 %) intravaginal erfolgten. Die mittlere Spermienkonzentration betrug  $520833 \pm 258362,9$  Spermien/ $\mu\text{l}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ), was bei einem instillierten Volumen von  $11 \pm 1,9 \mu\text{l}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) in einer

Dosis von  $1.410.833 \pm 840.640,5$  Spermien/Tier/Insemination ( $\bar{x} \pm SD$ ) resultierte (Abbildung 51, Tabelle 26 und Tabelle 4). Insgesamt wurden 34 Eier nach artifizierlicher Insemination gelegt (Tabelle 4), von denen 23 (68,7 %) befruchtet waren.

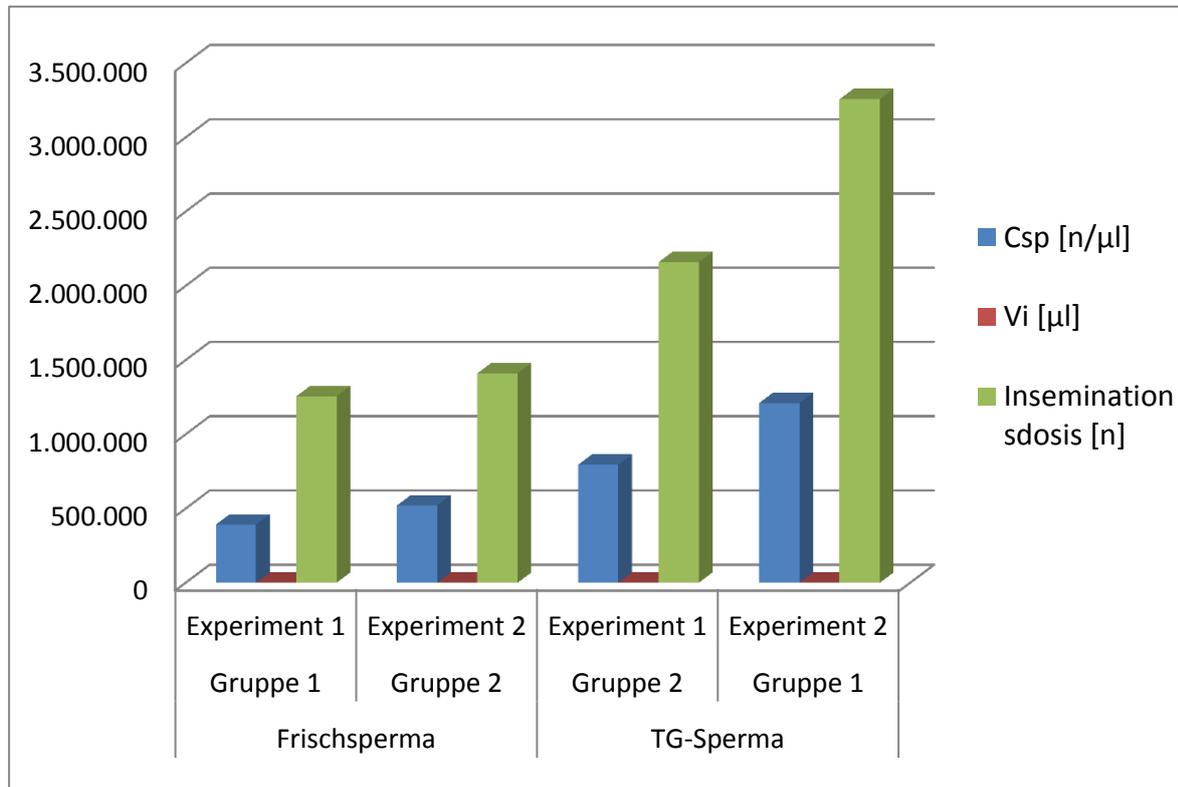


Abbildung 51: Spermavolumen und Spermiodosen zur artifizierlichen Insemination bei Nymphensittichen Mittelwerte der für Inseminationen genutzten Spermienkonzentration (Csp), des inseminierten Volumens (Vi), sowie der Inseminationssdosis pro artifizierlicher Insemination und Tier im Vergleich der Experimente und der Spermiprüfungen (n= 12)

Insgesamt schlüpften nach artifizierlicher Insemination mit TG-Sperma in zwei Inseminationsexperimenten 12 Nymphensittichküken, verglichen zu 21 Küken aus artifizierlicher Insemination mit Frischsperma. Die multiple logistische Regression der gewonnenen Daten ergab, dass die Anzahl der befruchteten Eier hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ) abhängig von der Beschaffenheit des Spermias (Frischsperma oder TG-Sperma) war, wobei der höhere Anteil der befruchteten Eier wie erwartet in den Gruppen der Frischspermainsemination auftrat. Umgekehrt betrachtet betrug die Chance mit TG-Sperma zu einer erfolgreichen Befruchtung zu führen nur ca. 7,5 % verglichen mit der

---

Chance bei der Verwendung von Frischsperma (Tabelle 27). Des Weiteren war die Befruchtungsrate in Experiment 1 in beiden Gruppen signifikant höher ( $p = 0,0151$ ) als im zweiten Experiment (Tabelle 27). Der Anteil der im Ei verstorbenen Embryonen und somit abgeleitet die Schlupfrate der Nestlinge wurde hingegen knapp nicht signifikant ( $p = 0,0787$ ) von der Spermabeschaffenheit und deutlich nicht signifikant ( $p = 0,4337$ ) vom Experimentdurchgang (1 oder 2) beeinflusst (Tabelle 27).

## 5. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, ein effektives Protokoll zur Kryokonservierung von Nymphensittichspermien zu entwickeln und dessen Anwendbarkeit mit Hilfe eines Fertilisationsversuches zu überprüfen. Dies sollte als potentielles Modell für die Kryokonservierung von Papageiensperma dienen. Der Versuch gliederte sich in einen Vor- und einen Hauptversuch. Der Vorversuch bestand aus einer detaillierten spermatologischen Untersuchung, die der Evaluierung von Basispermawerten von Nymphensittichen, diente. Auf diese Weise konnte im Hauptversuch schrittweise der Einfluss verschiedener Spermazusätze (Verdünner, Kryoprotektiva) und verschiedener Behandlungsmethoden (schnelle Kühlrate, langsame Kühlrate) auf die Spermienqualität evaluiert werden. Im Hauptversuch wurden zunächst drei Spermaverdünner auf den pH-Wert und die Osmolalitätsbedingungen von Nymphensittichsperma angepasst und evaluiert. Nachfolgend wurde der Einfluss verschiedener Kryoprotektiva, sowie unterschiedlicher Einfrier- und Auftauraten auf die Spermienqualität untersucht. Abschließend wurde die Wirksamkeit des Protokolls anhand eines Cross-over Besamungsversuches überprüft.

### 5.1 Spermagewinnung

Die Vorstudie wurde über einen Zeitraum von 12 Wochen durchgeführt. Während dieser Zeit wurde die Spermaentnahme durch die Massagemethode, die zuvor an Haushähnen erlernt wurde, an den Nymphensittichen angewandt und das Spermaentnahmeintervall festgelegt. Bei allen männlichen, intakten Nymphensittichen konnte mit Hilfe der Massagemethode nach (NEUMANN U. A., 2013) routinemäßig Sperma gewonnen werden. Insgesamt waren die Versuche der Spermaentnahme in 63,8 % (262/411) der Versuche erfolgreich. Dies war weitestgehend vergleichbar mit der Erfolgsrate von NEUMANN U. A. (2013) von 74,2 % (89/120), jedoch deutlich höher als die Erfolgsrate von STELZER (2004), die bei Nymphensittichen bei 43,5 % (n = 727) lag. Die Technik der Massage und die spezifische Positionierung der Finger scheinen also einen bedeutenden Einfluss auf den Erfolg der Methode zu haben. Manche Vögel reagierten nach sanften Massagebewegungen im Bereich der Kloake mit deutlichen Beinbewegungen, Vokalisation

und einer finalen Kloakenkontraktion während der aktiven Ejakulation. BEHNCKE (2002) gelang es auch bei völlig untrainierten Wellensittichen Sperma durch die Massagemethode Sperma zu gewinnen, während STELZER (2004) erst nach kurzer Trainingsphase bei einer Mehrzahl der Versuchstiere Sperma gewinnen konnte. SAMOUR (1986) gewann durch passives Ausmassieren der Seminalglomera Sperma von Wellensittichen, was jedoch zu einer erhöhten Rate an Verunreinigungen mit „transparent fluid“ und Uraten führte. In der vorliegenden Vorstudie kam es in 35,5 % der Spermaproben, die von untrainierten Nymphensittichhähnen gewonnen wurden, zu einer makroskopisch sichtbaren Kontamination mit Harnsäure. Wurden Spermaproben von trainierten Nymphensittichen gewonnen, traten in vergleichbaren Studien vergleichsweise niedrigere Kontaminationsraten auf. So betrug die makroskopisch sichtbare Kontamination mit Uraten bei NEUMANN U. A. (2013) 9,9 % und bei STELZER (2004) sogar lediglich 3,5 %. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass eine Kooperation des Vogels bei der Massagemethode zu einem selteneren Aufkommen von verunreinigtem Ejakulat führt.

Die Häufigkeit der Spermagewinnung wurde in dieser Studie auf einmal wöchentlich festgelegt, da beim Geflügel Absamintervalle von einmal je Woche empfohlen werden, um eine befriedigende Spermamenge und -qualität zu erhalten (SCHRAMM, 2005). Längere Pausen zwischen den Spermaabnahmen verringern hingegen die Reaktionsfähigkeit auf die Massage und es kann zu Degenerationen der Spermatozoen sowie des Keimepithels im Hoden kommen (SCHRAMM, 2005). BEHNCKE (2002) und STELZER (2004) beschrieben sowohl beim Wellensittich, als auch beim Nymphensittich eine gute Toleranz der zweimaligen Spermaentnahme pro Woche, allerdings zeigte sich bei den Tieren im Vorfeld dieser Studie eine Reizung und Rötung der Kloakenschleimhaut bei gesteigerter Absamfrequenz. Da dies zwangsläufig sowohl in einer erhöhten Kontaminationsrate der Spermaproben, als auch in einer Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Vögel resultieren würde, wurde in dieser Studie ein längeres Pausenintervall praktiziert.

Die Spermaphase wurde über 4 Jahre hinweg beobachtet. Zwischen Februar und November produzierten alle intakten männlichen Nymphensittiche der Gruppe Sperma. Ab November kam es bei allen Nymphensittichen zu einem starken Abfall der Spermienproduktion, der zeitweise in einer, vermutlich physiologischen Aspermie

resultierte. Dies deckt sich mit der Brutbiologie des Inkakakadus (*Cacatua leadbeateri*), für den ebenfalls eine begrenzte Brutzeit in Menschenobhut beobachtet wurde (REINSCHMIDT, 2007). Auf der anderen Seite konnten BUBLAT U. A. (2017) von der Gruppe der Kakadus über das gesamte Jahr hinweg Sperma gewinnen, wobei hier jedoch zu beachten ist, dass die Gruppe aus verschiedenen Kakaduspezies bestand. Beim Nymphensittich stehen einige Faktoren, wie z. B. die Tages- und Lichtlänge, der Kontakt zum Sozialpartner, sowie die Bereitstellung einer ausreichenden Anzahl von Nistmöglichkeiten im Zusammenhang mit einer erhöhten LH-Produktion (SHIELDS U. A., 1989). Es sollte also grundsätzlich möglich sein, durch entsprechende künstliche Lichtprogramme, die Bereitstellung eines passenden Sozialpartners, sowie permanentem Zugang zur Nisthöhle die Spermaproduktion auch im Herbst und Winter aufrecht zu erhalten (MILLAM U. A., 1988). In dieser Studie konnte jedoch, trotz der Verwirklichung all dieser Faktoren, im Winter bei keinem der männlichen Tiere Sperma gewonnen werden. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Nymphensittiche in der Lage waren, dem künstlichen Lichtprogramm zu entgehen, da dieses ausschließlich in den Innenräumen der Volieren angewendet wurde. Sobald die Tiere durch eine durchgängig offene Schleuse den Außenbereich der Voliere betraten, befanden sie sich den tatsächlichen Lichtbedingungen ausgesetzt. Um zu einer definitiven Aussage der Wirksamkeit solcher Lichtprogramme zu kommen, sollten die äußeren klimatischen Bedingungen ausgeschlossen werden. Eine alleinige Photostimulation ohne die Bereitstellung der anderen genannten Faktoren führte in der Studie von SHIELDS U. A. (1989) allerdings nicht zu signifikant erhöhten LH-Leveln und somit auch nicht zu einer gesteigerten Reproduktionsaktivität.

## 5.2 Vorstudie

Das gewonnene Spermavolumen, welches letztendlich in der Kapillare aufgefangen und abgelesen wurde, entsprach nicht in jedem Fall dem Volumen, was tatsächlich durch aktive Ejakulation oder passives Ausmassieren vom Vogel abgegeben wurde. Wenn ein Vogel unmittelbar nach der Ejakulation Abwehrbewegungen durchführte, war es möglich, dass Teile des im *Ventus* befindlichen Spermatropfens im Kloakengefieder verloren gingen. Bei einer Zuchttauglichkeitsuntersuchung sollte daher geeignete Vorbeugungsmaßnahmen getroffen, bzw. eine Relativierung der Ergebnisse oder eine

Wiederholung der Untersuchung durchgeführt werden. Der gemittelte Wert der Einzelejakulate lag bei  $3,2 \pm 3,1 \mu\text{l}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ). Verglichen mit den Ejakulatvolumina anderer Papageienarten (Tabelle 1) zeigt sich, dass das Volumen der Nymphensittiche im unteren, mittleren Bereich rangiert. Von den größeren Vertretern der Familie *Cacatuidae* konnten im Schnitt  $12,4 \mu\text{l}$ , also ein rund 4 Mal größeres Volumen gewonnen werden (LIERZ U. A., 2013). Dies mag nicht zuletzt auch an dem, im Vergleich zu Körpergröße und -gewicht, größeren Hodenvolumen und somit einer vermehrten Spermaproduktion liegen (BIRKHEAD, 1998). Die Farbe des Ejakulates lag in der Mehrheit der Fälle zwischen klar (31,3 %) und weißlich bis gräulich (38,2 %) und entsprach damit den Beobachtungen von FISCHER U. A. (2013), die 73 % der Ejakulate von Königsamazonen und 61,3 % der Proben von Spix-Aras zwischen farblos und gräulicher Farbgebung ansiedelten. Auch BUBLAT U. A. (2017) attestierten der Mehrzahl der Ejakulate von Vertretern verschiedener Papageienspezies eine gräuliche (47,2 %), bzw. farblose (37,9 %) Note. Laut BEHNCKE (2002) korreliert die Färbung und Konsistenz des Ejakulates mit der Spermiedichte, so kann bei weißlicher Farbe und milchiger Konsistenz mit einer höheren Spermienkonzentration gerechnet werden, was bereits eine makroskopische Einschätzung der Spermienqualität erlaubt. Die Überprüfung dieser Aussage war jedoch nicht Gegenstand dieser Studie.

Interessanterweise differierte der in dieser Studie gemessene pH-Wert von Nymphensittichsperma ( $\tilde{x} = 7,4$ ,  $x_{\min} - x_{\max} = 6,4 - 8,5$ ) von den Werten einer anderen Studie ( $\tilde{x} = 9,0$ ;  $x_{\min} - x_{\max} = 8,0 - 9,5$ ) (STELZER, 2004). Zuvor wurden alkalischere Werte angegeben, ähnlich den Werten von Wellensittichen ( $\bar{x} \pm \text{SD} = 8,4 \pm 0,2$ ;  $x_{\min} - x_{\max} = 8,1 - 9,0$ ) (BEHNCKE, 2002) und Mönchsittichen ( $x_{\min} - x_{\max} = 8,1 - 8,5$ ) (ANDERSON U. A., 2002). Jedoch liegen die in dieser Studie ermittelten pH-Werte nicht außerhalb des Bereiches anderer Papageienarten. Sperma von Spix-Aras ( $\tilde{x} = 7,0$ ;  $x_{\min} - x_{\max} = 6,4 - 8,0$ ) (FISCHER U. A., 2014a), Kakadus ( $\tilde{x} = 7,0$ ;  $x_{\min} - x_{\max} = 5,4 - 8,0$ ), Amazonen ( $\tilde{x} = 7,3$ ;  $x_{\min} - x_{\max} = 5,7 - 8,0$ ), weitere Ara-Arten ( $\tilde{x} = 6,8$ ;  $x_{\min} - x_{\max} = 5,4 - 7,8$ ) und Edelpapageien ( $\tilde{x} = 7,0$ ;  $x_{\min} - x_{\max} = 5,4 - 7,8$ ) rangierte ebenfalls im pH-neutralen, bzw. leicht alkalischen Bereich (BUBLAT U. A., 2017). Obwohl makroskopisch erkennbar kontaminierte Einzelejakulate nicht für weiterführende Untersuchungen genutzt wurden, kann eine Kontamination mit „transparent fluid“ (NISHIYAMA, 1951) nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Kontaminationen mit Blut, Kot und „transparent fluid“ führen zu einer Erhöhung des pH-

Wertes, während eine Kontamination mit Harnsäure zu einer Erniedrigung führt (BLANCO U. A., 2002a). Auch in anderen Studien kann das Auftreten kontaminierter Proben nicht ausgeschlossen werden, da eine Exklusion solcher Proben nicht erwähnt wird. Viel eher sollten die unterschiedlichen Methoden der pH-Wert-Messung, z. B. durch unterschiedliche Indikatorstreifen als Ursache der verschiedenen Werte in Betracht gezogen werden. So beträgt die Abstufung bei den von BEHNCKE (2002) und STELZER (2004) verwendeten Indikatorpapier zwischen 0,2 und 0,5 Einheiten, während das von FISCHER U. A. (2014a) verwendete Indikatorpapier maximal in 0,3er Einheiten abgestuft war. Das von BUBLAT U. A. (2017) und in dieser Studie verwendete Indikatorpapier weist eine Abstufung von maximal 0,2 Einheiten und ist dementsprechend sensitiver.

Die in dieser Studie evaluierte Osmolalität des Seminalplasmas ( $\bar{x} \pm SD = 298,6 \pm 9,6$  mOsm/kg) lässt sich in der Ordnung *Psittaciformes* lediglich mit dem Wert des Wellensittichs vergleichen, der von SAMOUR (1986) mit  $\bar{x} = 329,9$  mOsm/kg angegeben wird. Die in dieser Studie ermittelten Werte liegen zwischen denen von Emus ( $\bar{x} = 310$  mOsm/kg) (MALECKI UND MARTIN, 2000) und Spießenten ( $\bar{x} = 275$  mOsm/kg) (PENFOLD U. A., 2001), wobei diese Arten keine näheren Verwandtschaftsgrade aufweisen und daher nicht zu einem Vergleich herangezogen werden sollten. Insgesamt liegen in der derzeit zugänglichen Literatur nur wenige Angaben zur Osmolalität von Vogelsperma vor, was nahelegt, dass dieser Parameter nicht zum Standard in der spermatologischen Untersuchung gehört. Die Unterschiede in der Osmolalität des Seminalplasmas liegen womöglich in der Zusammensetzung des Seminalplasmas begründet, das von Kinozilien tragenden Zellen der samenableitenden Wege produziert wird (LAKE, 1957b; LAKE UND MCINDOE, 1959) und welches nicht ordnungs- oder familienspezifisch, wohl aber speziesspezifisch zu sein scheint. Eine jeweilige Bestimmung des Osmolalitätswertes für die untersuchte Spezies erscheint aus diesem Blickwinkel betrachtet, unumgänglich, sofern die Spermien einer Konservierung unterzogen werden sollen. Laut SIUDZINSKA UND LUKASZEWICZ (2008) ist die Einstellung des passenden pH-Wertes und osmotischen Drucks unbedingt notwendig, um die Spermiovitalität im Rahmen der Konservierung aufrechtzuerhalten. Der jeweilige Wert orientiert sich hierbei an den Werten des Seminalplasmas der Vogelspezies. Von Haushahnspermien ist bekannt, dass ihre Befruchtungsfähigkeit in Spermaverdünnern mit einer Osmolalität zwischen 250 und 460

mOsmol/kg erhalten bleibt, wobei der osmotische Druck idealerweise zwischen 325 und 350 mOsmol/kg liegen sollte (SEXTON UND FEWLASS, 1978). GIESEN UND SEXTON (1983) fanden heraus, dass Truthahnspermien in hyperosmotischem Medium *in vitro* eine längere Überlebenszeit hatten, während eine Reduktion des osmotischen Druckes unter 200 mOsm/kg zu einer irreversiblen Schädigung der Spermien führten. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Spermienmembran in einem leicht hyperosmotischen Spermaverdünner widerstandsfähiger gegenüber schädlichen Einflüssen, wie zum Beispiel dem Eindringen von Wasser in die Zelle, ist. Die in dieser Studie verwendeten Spermaverdünner wurden daher auf eine geringgradige Hyperosmolalität von 300 mOsm/kg eingestellt, während das Kontrollmedium eher im hypoosmotischen Bereich angesiedelt war ( $\bar{x} \pm SD = 277,7 \pm 1,3$ ).

Die in dieser Studie ermittelten Werte der Spermienkonzentration ( $\bar{x} \pm SD = 836.571,4 \pm 1.282.003,9$ ) und der daraus resultierenden Spermiengesamtzahl im Ejakulat ( $\bar{x} \pm SD = 2.638.712,3 \pm 3.937.999,9$ ) sind weit niedriger als die Spermienkonzentration von Wellensittichen ( $\bar{x} \pm SD = 3.723.300 \pm 92.900$ ) (GLORIA U. A., 2014) und Rosenköpfchen ( $\bar{x} \pm SD = 7.194.000 \pm 6.735.100$ ) (DOGLIERO, 2015), aber deutlich höher als die von Mönchsittichen ( $\bar{x} \pm SD = 346.600 \pm 64.600$ ), Spix-Aras ( $\bar{x} \pm SD = 24.857 \pm 23.509$ ) (FISCHER U. A., 2014a) oder Königsamazonen ( $\bar{x} = 21.252$ ) (FISCHER U. A., 2013a). Auch die in einer vorherigen Studie ermittelten Werte von Nymphensittichen ( $\bar{x} = 305.300$ ) (FISCHER U. A., 2014b) wurden übertroffen, lagen jedoch unter den von STELZER (2004) ermittelten Werten (Tabelle 1). LIERZ U. A. (2013) ermittelten in einer Studie an verschiedenen Gruppen von Großpapageien für die Gruppen "Kakadus" ( $\bar{x} = 427.704/\mu\text{l}$  [ $c_{sp}$ ];  $\bar{x} = 5.183.354$  [SGZ]), "Amazonen" ( $\bar{x} = 77.532/\mu\text{l}$  [ $c_{sp}$ ];  $\bar{x} = 675.050$  [SGZ]), "Aras" ( $\bar{x} = 70.068/\mu\text{l}$  [ $c_{sp}$ ];  $\bar{x} = 435.750$  [SGZ]), "*Electus ssp.*" ( $\bar{x} = 3.781.285/\mu\text{l}$  [ $c_{sp}$ ];  $\bar{x} = 35.828.804$  [SGZ]), „Loris“ ( $\bar{x} = 1.534.965/\mu\text{l}$  [ $c_{sp}$ ];  $\bar{x} = 9.806.674$  [SGZ]) und „Andere“ ( $\bar{x} = 1.317.526/\mu\text{l}$  [ $c_{sp}$ ];  $\bar{x} = 5.318.745$  [SGZ]) unterschiedliche Werte. In einer ähnlich konzipierten Studie zur Evaluation verschiedener Spermaparameter über den Jahresverlauf ermittelten BUBLAT U. A. (2017) geringfügig höhere Werte für die Gruppen "Kakadus" ( $\bar{x} = 536.200/\mu\text{l}$  [ $c_{sp}$ ];  $\bar{x} = 5.512.100$  [SGZ]), "Amazonen" ( $\bar{x} = 178.200/\mu\text{l}$  [ $c_{sp}$ ];  $\bar{x} = 1.266.800$  [SGZ]), sowie vergleichsweise niedrigere Werte für die Gruppen "Aras" ( $\bar{x} = 35.600/\mu\text{l}$  [ $c_{sp}$ ];  $\bar{x} = 366.500$  [SGZ]), "Edelpapageien" ( $\bar{x} = 2.668.900/\mu\text{l}$  [ $c_{sp}$ ];  $\bar{x} = 19.393.300$  [SGZ]). Hierbei muss beachtet werden, dass in polygamen Spezies Spermienkonkurrenz (im engeren Sinne: Konkurrenz

der Ejakulate verschiedener Männchen um die Befruchtung) ein bekanntes Phänomen ist (PARKER, 1970). Der Ausgang dieser Konkurrenzsituation wird zu einem Großteil von der Spermienkonzentration und der Qualität konkurrierender Spermien bestimmt (BIRKHEAD U. A., 1999; BILCIK U. A., 2005; BIRKHEAD, 1998). Werden die Spermienkonzentrationen polygamer Spezies (z. B. Edelpapageien) zu den Werten strikt monogamer Spezies (z. B. Aras) verglichen (Tabelle 1), fällt die Spannweite dieser Differenz auf. Eine weitere Adaption verschiedener Männchen an die Spermienkonkurrenz ist die Entwicklung größerer Hoden, um eine Verbesserung des Paarungserfolges zu erzielen (BIRKHEAD, 1998). Obwohl Nymphensittiche lange Zeit als monogame Spezies betrachtet wurden, ist mittlerweile bekannt, dass diese Lebensform nicht streng praktiziert, sondern eher flexibler gestaltet wird (SEIBERT UND CROWELL-DAVIS, 2001). Insofern muss in Betracht gezogen werden, dass Werte wie die Spermienkonzentration nicht unveränderlich sind, sondern sich viel eher an die Lebensumstände, dem Auftreten von Partner- und Spermienkonkurrenz, sowie an die Häufigkeit von Ejakulationen (SCHRAMM, 2005) anpassen. Womöglich lassen sich so die Unterschiede in den ermittelten Werten der Konzentration von Nymphensittichsperma aus dieser Studie ( $\bar{x} = 836.571 \text{ n}/\mu\text{l}$ ), sowie den Studien von STELZER (2004) ( $\bar{x} = 1.050.000 \text{ n}/\mu\text{l}$ ) und FISCHER U. A. (2014b) ( $\bar{x} = 305.300$ ) erklären.

## 5.3 Hauptstudie

### 5.3.1 Evaluierung der Verdünner

Die Auswahl der Verdünner erfolgte nach eingehender Literaturrecherche. Es wurden die Spermaverdünner ausgewählt, die schon bei mehreren Vogelarten eingesetzt wurden (LAKE UND STEWART, 1978; SEXTON, 1977; BROCK, 1991; BLANCO U. A., 2008, 2011) und mit denen teilweise schon Erfolge in der assistierten Reproduktion verzeichnen werden konnten. So wurde der Verdünner nach LAKE UND STEWART (1978) bereits bei der artifizienten Insemination von Blaukronenamazonen (BROCK, 1991) und Wellensittichen (SAMOUR U. A., 1988) verwendet. BLANCO U. A. (2011) evaluierten einen positiven Einfluss von ATP auf die Spermaqualität von Kanadakraanichen, weshalb dieses ebenfalls dem selbst hergestellten Verdünner nach BLANCO U. A. (2008) zugefügt wurde. Die Evaluierung erfolgte in nicht mehr

als drei Verdünnungsstufen, da das geringe Probenvolumen die Aufteilung limitierte. Im Allgemeinen erfolgt die Qualitätsuntersuchung von Spermaproben zwar individuell, um Wechselwirkungen der Spermien verschiedener Männchen auszuschließen (WHO, 2010), was jedoch in dieser Studie aufgrund des geringen Volumens der Einzelejakulate in diesem Umfang nicht möglich war. Stattdessen waren detaillierte Untersuchungen zur Entwicklung der Spermienqualität unter dem Einfluss verschiedener Verdüner nur durch das Poolen von Spermaproben möglich. Eine mögliche Beeinträchtigung der Spermaqualität als Folge von Spermienkompetition kann daher nicht mit vollständiger Sicherheit ausgeschlossen werden. SEXTON (1977) verwendete jedoch zur Entwicklung des Beltsville-Poultry-Semen-Extenders ebenfalls gepoolte Spermaproben von Legehybriden. Zudem beobachteten DONOGHUE U. A. (2003) keinen negativen Effekt bei der artifiziiellen Insemination von Putenhennen mithilfe gepoolter Spermaproben. Der Vorgang des Poolens wird außerdem in zahlreichen weiteren Studien an Vogelsperma vorgenommen, wenn das Volumen des Einzelejakulats nicht ausreichend für die Untersuchungen ist (DONOGHUE UND DONOGHUE, 1997; FUNGFUANG U. A., 2009; KOTLOWSKA U. A., 2007; ABOUELEZZ U. A., 2015b), weshalb auch in dieser Studie von einem vernachlässigbaren Effekt ausgegangen wurde. Die Verdünnungsstufen 1:4 und 1:8 wurden gewählt, da sie bereits von LAKE U. A. (1985) als zur artifiziiellen Insemination geeignet angenommen wurden und aus statistischer Sicht eventuell auftretende Unterschiede zwischen den Konzentrationen detektiert werden konnten, ohne dass der Verdünnungseffekt zu groß gewählt wurde (SEXTON, 1977; SIUDZINSKA UND LUKASZEWICZ, 2008). Die 1%ige Ringer®-Glukose-Mischung wurde als Kontrollverdünnung in 1:5 gewählt, da diese in den Untersuchungen von BEHNCKE (2002) und STELZER (2004) die besten Ergebnisse in der Kurzzeitkonservierung von Wellensittich- und Nymphensittichsperma garantiert hatte. Kritisch muss betrachtet werden, dass die Motilitätswerte in den vorherigen Studien lediglich geschätzt und in grobe Gruppen (BEHNCKE, 2002) oder in dekadische Prozentbereiche (STELZER, 2004) eingeteilt wurden, was keine reproduzierbare Methode darstellt und zudem höchst subjektiv ist. Die Motilitätswerte in dieser Studie wurden hingegen durch Zählung evaluiert, was eine detailliertere Beschreibung und ein gewisses Maß an Objektivität ermöglicht (FISCHER U. A., 2014b). Nichtsdestotrotz erweisen sich beide Methoden als Untersucher-abhängig und benötigen daher Expertenerfahrung (VERSTEGEN U. A., 2002). Optimal wäre eine objektive Motilitätsanalyse im Zuge der computergestützten

Spermienanalyse (CASA), die eine Untersucher-unabhängige Auswertung möglich macht. FISCHER U. A. (2014b) nutzten dies zum Vergleich der konventionellen mit der computergestützten Analyse von Nymphensittichsperma und bestätigten so eine hohe Korrelation für MOT und PMOT-Werte. Für die vorliegende Studie wurde daher eine konventionelle Motilitätsanalyse trotz der Untersucher-Abhängigkeit als zielführend betrachtet. Es gab zudem keinen Inter-Untersucher-Effekt, da nur ein Untersucher alle Proben evaluierte und daher, falls vorhanden, immer der gleiche Fehlereffekt vorlag und somit vernachlässigbar ist. Zukünftige Studien sollten jedoch möglichst auf eine objektive Evaluierung der Motilität zurückgreifen, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erzielen und eine bessere Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu garantieren. Die Spermienmotilität wird als prognostisch wichtiger Faktor für die Befruchtungsfähigkeit in der Spermatologie betrachtet, da MOT und PMOT positiv mit dem Befruchtungserfolg korrelieren (BIRKHEAD U. A., 1999; FROMAN U. A., 1999; BLESBOIS U. A., 2008). Als Supravitalfärbung wurde Eosin B 2 % ausgewählt, das sich bereits in den Untersuchungen von FISCHER U. A. (2013b) als am besten geeignet zur Evaluierung von Falkensperma gezeigt hatte. Des Weiteren wurde es bereits von zahlreichen Autoren bei vielen weiteren Papageienspezies als Färbemittel eingesetzt (BEHNCKE, 2002; STELZER, 2004; FISCHER U. A., 2014b; LIERZ U. A., 2013), weshalb von seiner guten Eignung ausgegangen wurde. Zusätzlich wurde eine Fluoreszenzfärbung angefertigt, da durch die duale Färbung mittels SYBR-14 und Propidiumjodid (PI) die Spermienfraktionen fehlerfrei unterschieden werden können. Dies ist auch der Grund weshalb sie zunehmend im Geflügelbereich eingesetzt wird (BISHOP UND SMILES, 1957; BAYYARI U. A., 1990; BILGILI UND RENDEN, 1984; GARNER UND JOHNSON, 1995) und von CHALAH UND BRILLARD (1998) als die sensitivere Färbemethode beschrieben wurde. FISCHER U. A. (2014b) ermittelten zwar einen signifikanten Unterschied der Färbemethoden Eosin B und SYBR Green anhand von Nymphensittichsperma, stuften diesen aber als klinisch irrelevant ein. Die Auswertung der Spermienmorphologie erfolgte anhand der Eosin B-Ausstriche, was den gängigen Methoden der WHO (2010) entspricht und im Vogelbereich bereits von vielen Autoren entsprechend angewendet wurde (BEHNCKE, 2002; STELZER, 2004; FISCHER U. A., 2014a, 2015; LIERZ U. A., 2013). Bei der morphologischen Analyse lag die Gewichtung der WHO (2010) zugrunde, die Kopfveränderungen als die schwerwiegendste Abnormität einschätzen. Die genaue Einteilung wurde anhand eines geringfügig modifizierten Schemas vorgenommen,

welches ursprünglich von MARVAN U. A. (1981) anhand von Ganterspermien entwickelt wurde. Dieses Schema wurde deshalb genutzt, da es die vogeltypische Spermienmorphologie berücksichtigt, die unterschiedlich zur Struktur der Säugerspermien ist (LONG, 2006) und daher eine detaillierte Einteilung möglich war. Zudem wurde es bereits von BEHNCKE (2002) und STELZER (2004) bei der Differenzierung von Spermien verschiedener Papageienarten angewendet und wurde daher als etabliert betrachtet. Der Schwerpunkt der morphologischen Auswertung wurde auf den Anteil von Kopfveränderungen und normaler Spermien gelegt, da beim Haushuhn belegt wurde, dass der Anteil der lebenden, morphologisch unveränderten Spermien einen maßgeblichen Einfluss auf den Befruchtungserfolg hat (BLESBOIS U. A., 2008) und ein entsprechender Zusammenhang auch bei Sperlingsvögeln bekannt ist (LÜPOLD U. A., 2009).

Kritisch muss gesehen werden, dass die Mehrzahl der zum Vergleich herangezogenen Studien an Sperma verschiedener Papageienspezies durchgeführt wurden. Aufgrund speziesspezifischer Unterschiede im Spermienmetabolismus (LONG, 2006) sollten Vergleiche idealerweise innerhalb der gleichen Spezies vorgenommen werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser und vorheriger Studien können daher verschiedene Gründe, wie z. B. individuelle Unterschiede der in die Studie inkludierten Tiere, unterschiedliche Methoden der Spermagewinnung, unterschiedliche Weisen der Spermabehandlung oder variable Zeitintervalle zwischen der Spermagewinnung und dem Untersuchungsbeginn, einschließen und lassen sich daher nicht alleinig auf den Einfluss des Spermaverdünners zurückführen.

#### **5.3.1.1 Motilitäts- und Viabilitätsanalyse**

Eingehend auf alle Ergebnisse der Spermaqualitätsanalyse stellte sich der modifizierte Verdünner nach LAKE UND STEWART (1978) in der 1:4-Verdünnungsstufe als am besten geeignet zur Kurzzeitkonservierung von Nymphensittichspermien heraus, da mit dessen Verwendung die höchsten Raten der Spermiovitalität ( $\bar{x} = 75,3 \%$ ), Spermiengesamt- ( $\bar{x} = 59,2 \%$ ), sowie Spermienvorwärtsbeweglichkeit ( $\bar{x} = 47,4 \%$ ) erreicht wurden. Der Ausgangswert der Vorwärtsmotilität beim modifizierten Lake-Verdünner lag hierbei höher ( $\bar{x} = 70,7 \%$ ) als der von 1%iger Glukoselösung (ca. 61 %). Des Weiteren war die Reduktion des Anteils der vorwärtsbeweglichen Spermien über den Beobachtungszeitraum von 120

Minuten deutlich geringer (Abfall ca. 23 %) als bei der besten Verdünnung in anderen Studien (Abfall ca. 56 %) (STELZER, 2004). Vergleichend dazu lagen die Beweglichkeiten des modifizierten Verdünners nach BLANCO U. A. (2008) und des modifizierten BPSE-Verdünners lediglich zwischen 50 und 60 % (MOT), sowie zwischen 38 und 55 % (PMOT). Die Reduktion der Beweglichkeitsraten lag bei diesen beiden Verdünnern bei ca. 15 % (MOT), bzw. 25 % (PMOT). Der Vergleich des prozentualen Abfalls der Vorwärtsmotilität innerhalb des modifizierten Lake-Verdünners während des zweistündigen Untersuchungszeitraums ergab zwar einen geringeren Abfall in der 1:8 Verdünnungsstufe ( $\Delta = 13.9\%$ ) als in der 1:4-Verdünnungsstufe ( $\Delta = 23.4\%$ ), wohingegen die absoluten Werte der Vorwärtsbeweglichkeiten in der niedrigeren Verdünnungsstufe jedoch signifikant höher lagen. Der flachere Abfall in der höheren Verdünnungsstufe (1:8) unter Verwendung des Lake-Verdünners könnte durch den relativ höheren Gehalt an Nährstoffen und Energielieferanten in der 1:8-Verdünnung bedingt sein. Dies wird unterstützt durch PEÑA UND LINDE-FORSBERG (2000), die einen ähnlichen Effekt an caninem Sperma beobachteten und diskutierten. Im weiteren Verlauf der Studie wurde die 1:4-Verdünnung praktiziert, da die weitere Verarbeitung bis hin zur Kryokonservierung ohnehin in einem engeren Zeitfenster (< 30 min) angestrebt wurde und so höhere Ausgangswerte zugrunde lagen. Zudem ermittelte SEXTON (1977) im Vergleich verschiedener Verdünnungsstufen (1:2, 1:4, 1:6, 1:8), dass die maximale Verdünnungsstufe zur erfolgreichen artifizienten Insemination 1:4 betrug. Die Ergebnisse der Kontrollverdünnung (1%ige Glukoselösung) unmittelbar nach der Verdünnung sind weitestgehend vergleichbar zu denen von FISCHER U. A. (2014b), die anhand von 120 Nymphensittich-Ejakulaten eine Gesamtmotilität von 55 % bei einer Vorwärtsbeweglichkeit zwischen 48,5 und 60 % ermittelten. Ebenfalls ähnliche Ergebnisse erzielte STELZER (2004), die den Effekt sechs verschiedener Verdünnern auf die Motilität von Nymphensittichspermien evaluierte. Die 1%ige Glukoselösung war hier in der Lage die Vorwärtsmotilität über einen Zeitraum von 30 Minuten zwischen 40 und 60 % aufrecht zu erhalten, bevor ein linearer Abfall auf unter 10 % innerhalb der nächsten 90 Minuten erfolgte. Trotz dieses linearen Abfalls stellte sich die 1%ige Glukoselösung als der wirksamste Spermaverdüner dieser Studie heraus, verglichen mit 5%iger Glukoselösung, Ringer®-Lösung und drei weiteren Geflügelspermaverdünnern (BECHSTEDT U. A., 1974; SCHRAMM UND LÖHLE, 1984; LAKE UND STEWART, 1978). Die Beobachtungen von STELZER (2004) stützten sich wiederum auf die Studie von BEHNCKE (2002), der den Einfluss dreier

verschiedener Verdünner auf die Motilität von Wellensittichspermien verglich, indem er subjektiv die Halbwertszeit und Qualität der Bewegung einstuft (+ bis +++). Die 1%ige Glukoselösung schnitt hierbei im Vergleich mit 5%iger Glukoselösung und Ringer®-Lösung am besten ab, indem sie die Gesamtbeweglichkeit über einen Zeitraum mehrerer Minuten mit konstanter Qualität (++) bewahrte. Die Motilitätsergebnisse hinsichtlich des Lake-Verdünners der vorliegenden Studie decken sich ebenfalls nicht mit den Ergebnissen von STELZER (2004), in denen dieser sehr viel schlechter abschnitt. Dort startete er initial mit einer geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit von 15 %, gefolgt von einem Abfall auf 0 % innerhalb des Untersuchungszeitraums, was deutlich von dem in dieser Studie ermittelten Wert differiert. HOWARTH JR. (1983) verglich die Spermienmotilität von Haushahnspermien 30 Minuten und sechs Stunden nach Zugabe des Lake-Verdünners, des Beltsville-Poultry-Semen-Extenders und des Minimum Essential Mediums (MEM). Hier zeigte sich, dass Werte des Lake-Verdünners nach 30 Minuten bereits niedriger lagen ( $\bar{x} = 66,1 \%$ ) als die Werte von MEM ( $\bar{x} = 91,2 \%$ ) und BPSE ( $\bar{x} = 80 \%$ ). Deutlicher wird der Unterschied jedoch nach einer Beobachtungszeit von 6 Stunden. Hier hatte MEM den geringsten Motilitätsverlust von 5,6 % zu verzeichnen, die Motilität von BPSE sank um 22,6 % und die schlechtesten Ergebnisse traten unter Verwendung des Lake-Verdünners ( $\Delta = 65,1 \%$ ) auf. Diese Beobachtung wurde von SIUDZINSKA UND LUKASZEWICZ (2008) bestätigt. Die Verwendung des Lake-Verdünners in einer Studie an Blaukronenamazonen resultierte hingegen in initialen Vorwärtsbeweglichkeiten zwischen 41 und 82 %, die den Werten der vorliegenden Studie vergleichbar sind (BROCK, 1991). Jedoch wurde die Spermienbeweglichkeit nicht über einen längeren Untersuchungszeitraum beobachtet, sodass ein zeitlicher Vergleich scheitert. Wider Erwarten hatte der Zusatz von 30 mM ATP zum modifizierten Verdünner nach BLANCO U. A. (2008) keinen positiven Einfluss auf die Spermienmotilität. Dies wurde hingegen von SÖDERQUIST UND LARSSON (1985) an Bullenspermien und von BLANCO U. A. (2011) an Truthahnspermien evaluiert. Interessanterweise ließ sich ein positiver Effekt nicht an Kanadakranichspermien nachvollziehen (BLANCO U. A., 2011), was eine Speziesabhängigkeit nahelegt. Die unterschiedliche Fähigkeit zur Bewahrung der Motilität im Vergleich mit der Literatur könnte womöglich auf die unterschiedlichen Osmolalitäts- und pH-Werte der eingesetzten Verdünner zurückzuführen sein (LONG, 2006). In dieser Studie wurden die drei Spermaverdünner auf die speziesspezifischen Anforderungen von

Nymphensittichspermien adaptiert, indem pH und Osmolalität auf die Werte des zuvor gemessenen Seminalplasmas eingestellt wurden, während die 1%ige Glukoselösung unverändert blieb, um die Vergleichbarkeit zu den vorherigen Studien von BEHNCKE (2002), STELZER (2004) und FISCHER U. A., (2014c) zu gewährleisten. Laut SIUDZINSKA UND LUKASZEWICZ (2008) haben aber diese Werte entscheidenden Einfluss auf die Spermienbeweglichkeit. So ermittelten GIESEN UND SEXTON (1983) positive Effekte eines hypertonen Spermaverdünnens auf die Überlebensfähigkeit von Truthahnspermien. Im Gegensatz dazu führte eine Reduktion der Osmolalität auf unter 200 mOsm/kg zu einer irreversiblen Schädigung von Truthahn- und Haushahnspermien (BAKST, 1980). Möglich ist, dass die unterschiedlichen pH- und Osmolalitätswerte der modifizierten Verdünnern und der 1%igen Glukoselösung für den verschiedenartigen Ausgang der Motilitätsanalyse verantwortlich sind. Die schlechteren Ergebnisse der 1%igen Glukoselösung im Vergleich zu den anderen Spermaverdünnern könnten daher auf die Hypoosmolalität und des sauren pH-Wertes der Glukoselösung im Vergleich zum Seminalplasma der Nymphensittiche zurückzuführen sein.

Der mithilfe von Eosin B ermittelte Ausgangswert der Spermivitalität der unverdünnten Proben lag bei  $\bar{x} = 84,5 \%$  und war somit vergleichbar zu den Werten von STELZER (2004) und FISCHER U. A. (2014b) ( $\bar{x} = 90 \%$ ). Auch bei Rosenköpfchen ( $\bar{x} = 90 \%$ ) und Mönchsittichen ( $\bar{x} = 85 \%$ ) wurden ähnliche Werte angegeben (STELZER, 2004) wie bei Wellensittichen ( $\bar{x} = 95 \%$ ) (BEHNCKE, 2002). Die Werte verschiedener Arten von Großpapageien lagen vergleichsweise ähnlich zwischen 87,1 % und 95,9 % (LIERZ U. A., 2013). BUBLAT U. A. (2017) ermittelte für die die Gruppen "Kakadus" ( $\bar{x} = 87 \%$ ), "Amazonen" ( $\bar{x} = 80 \%$ ), "Aras" ( $\bar{x} = 76 \%$ ) und "Edelpapageien" ( $\bar{x} = 80 \%$ ) vergleichbare Werte. Bei Rassehahnhybriden wurden mittels einer Supravitalfärbung Vitalitätsraten zwischen 82,25 % und 89,63 % evaluiert (TABATABAEI U. A., 2009), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die ermittelten Werte innerhalb der vogeltypischen Spanne liegen. Überraschenderweise wiesen die nativen Spermproben eine höhere Viabilität nach 120 Minuten Lagerungszeit als die verdünnten Proben auf. Laut ŁUKASZEWICZ U. A. (2008) wird die Qualität der Färbungen jedoch von vielerlei Faktoren beeinflusst. So können Inhaltsstoffe der Färbelösung mit Membranbestandteilen zu Reaktionen führen (WAY U. A., 1995) oder die Osmolalität der Färbelösung sich negativ auf die Spermien

auswirken (ŁUKASZEWICZ U. A., 2008). Eine Interaktion der Färbelösung mit Inhaltsstoffen der einzelnen Spermaverdünner kann somit nicht ausgeschlossen werden. Hinsichtlich der Spermienüberlebensrate nach Zugabe verschiedener Spermaverdünner und einer Beobachtungszeit von 120 Minuten wurden die besten Ergebnisse in dieser Studie von dem modifizierten Lake-Verdünner in beiden Verdünnungsstufen erzielt. Nach 120 Minuten lag die ermittelte Lebendrate bei ca. 75 % und war demzufolge lediglich um 6 % gefallen. Auch bei der Verwendung des modifizierten Blanco-Verdünners und des modifizierten BPSE lagen die Reduktionsraten zwischen 5 und 10 %, die Unterschiede waren dementsprechend nicht signifikant. Im paarweisen Vergleich der verschiedenen Spermaverdünner mit der Kontrollverdünnung (1%ige Glukoselösung) zeigte sich jedoch, dass einzig der modifizierte Lake-Verdünner signifikant höhere Vitalitätsraten erzielen konnte. In der vorliegenden Studie wurde bei den kontrollverdünnten Proben unter Verwendung der SYBR Green Färbung eine Vitalitätsrate von  $70,1 \pm 5,1$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) ermittelt. Dies korrelierte stark mit den Werten, die mithilfe der Eosin B-Färbung ermittelt wurden ( $\bar{x} \pm SD = 70,5 \pm 9,0$  %). Insgesamt ergab sich aus dem Vergleich der Eosin B-Ausstriche und der Fluoreszenzanalysen eine starke positive Korrelation der beiden Evaluationsmethoden ( $n = 46$ ;  $r_s = 0,893$ ;  $p < 0,001$ ) in dieser Studie. Aufgrund des limitierten Spermavolumens wurde daher im weiteren Verlauf des Versuchs auf die Anfertigung von Fluoreszenzausstrichen im Rahmen der Verdünnerevaluierung verzichtet. Zudem wurden die Eosin B-Ausstriche nachfolgend noch für die Auswertung der Morphologie benötigt und daher als essentiell betrachtet.

### 5.3.1.2 Morphologische Analyse

Der höchste Anteil normaler Spermien ( $[0] \bar{x} = 47,2$  %;  $[120] \bar{x} = 39,6$  %) fand sich in den nativen, unverdünnten Spermaproben. Der Anteil lag weit unter den von BEHNCKE (2002) ( $\bar{x} = 93$  %) und STELZER (2004) ( $\bar{x} = 66,3$  %) ermittelten Werten für Wellen- und Nymphensittichspermien, jedoch vergleichbar zu den Werten dreier Sitticharten (*Aratinga auricapilla*, *A. acuticaudata*, *A. solstitialis*) (36 – 45 %) (STELZER, 2004). Verglichen zu dem Anteil morphologisch unveränderter Spermien des Spix-Aras ( $\bar{x} = 26,5$  %) (FISCHER U. A., 2014a) lag der in dieser Studie ermittelte Wert jedoch weit höher. Zu einem gewissen Teil kann eine Vererbbarkeit der Spermienmorphologie vermutet werden, wie sie bereits von

BIRKHEAD U. A (2005) an Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*) demonstriert wurde. Zum anderen können zahlreiche andere Faktoren, wie zum Beispiel die Unterbringung, das Alter, sowie Inzucht und eine geringe genetische Diversität (WATSON U. A., 2007; GOMENDIO UND ROLDAN, 2008) Einfluss auf die Tiere und somit möglicherweise auf die Spermienmorphologie haben. Im Vergleich der Verdüner war der signifikant geringste Anteil an Kopfveränderungen zu beiden Untersuchungszeitpunkten, und gleichzeitig auch die geringste Zunahme diesen Anteils, beim modifizierten Lake-Verdüner in 1:4 Verdünnungsstufe zu verzeichnen ([0]  $\bar{x}$  = 13,4 %; [120]  $\bar{x}$  = 15,6 %). Gleichzeitig war hier auch die höchste Rate an morphologisch unveränderten Spermien zu verzeichnen ([0]  $\bar{x}$  = 49,5 %; [120]  $\bar{x}$  = 43,4 %). Diese Ergebnisse stehen jedoch nicht im Einklang mit den Beobachtungen von SIUDZINSKA UND LUKASZEWICZ (2008), die ein signifikant höheres Auftreten morphologischer Alterationen beim Einsatz des Lake-Verdüners im Vergleich mit einem selbst entwickelten Verdüner (LUKASZEWICZ U. A., 2004) dokumentierten. Während der Lagerungszeit wurde ein Abfall der lebenden, morphologisch unveränderten Spermien und ein Anstieg der toten Spermien und Spermatozoen mit Kopfveränderungen bei allen eingesetzten Spermaverdünnern beobachtet, was im Einklang mit vorherigen Studien an Geflügelspermien steht (BLESBOIS U. A., 1999; SIUDZINSKA UND LUKASZEWICZ, 2008). Der Spermienkopf ist jedoch eine Region, die hoch empfindlich auf osmotische Veränderungen reagiert (BAKST, 1980). Da dieser Effekt laut den Ergebnissen der vorliegenden Studie unabhängig von der Lagerungszeit zu sein scheint, wird eine Optimierung des Spermaverdüners umso wichtiger, auch wenn nur eine kurze Lagerungszeit angestrebt wird (LONG, 2006; SIUDZINSKA UND LUKASZEWICZ, 2008). Ähnlich wie in Studien an Haushahnspermien (SIUDZINSKA UND LUKASZEWICZ, 2008) zeigte der Anteil der Schwanzveränderungen in der vorliegenden Studie keinerlei Abhängigkeit vom Einsatz des jeweiligen Verdüners, es traten jedoch signifikant höhere Raten (bis zu 6 %  $\Delta$ ) nach längerer Lagerungsdauer auf. Dieser Umstand könnte laut O'CONNELL U. A. (2002) einem lagerungsbedingtem Energieverlust und nachfolgender Degeneration der in der Geißel enthaltenen Mitochondrien geschuldet sein.

### 5.3.2 Evaluierung der Kryoprotektiva

In dieser Studie wurden Dimethylacetamid (DMA), Dimethylsulfoxid (DMSO) und Glycerin als penetrierende kryoprotektive Substanzen in jeweils drei Endkonzentrationen evaluiert,

da diese zu den am häufigsten eingesetzten Kryoprotektiva in der Langzeitkonservierung aviärer Spermien gehören (SAMOUR U. A., 1988; BLANCO U. A., 2012; O'BRIEN UND ROBECK, 2014; SEXTON, 1973). Glycerin wurde sogar als erste Substanz mit kryoprotektiven Eigenschaften anhand von Geflügelsperma von POLGE U. A. (1949) entdeckt, was die Spermienkonservierung aller Spezies revolutionierte. Obwohl auch verschiedene Zucker als nicht-penetrierende Kryoprotektiva genutzt werden können (BLANCO U. A., 2011; WISHART, 1995), führen diese zu einem erhöhten osmotischen Stress im Vergleich zu den die Spermienzelle penetrierenden Gefrierschutzmitteln (BENSON U. A., 2012). In diesem Fall wurde daher davon ausgegangen, dass DMA, DMSO und Glycerin den osmotischen Stress minimieren und in höheren Motilitäts- und Viabilitätsraten nach dem Auftauen resultieren. Die Vitalitätsrate wurde in der Evaluierung der Kryoprotektiva ausschließlich über die Fluoreszenzfärbung SYBR-14 und Propidiumjodid evaluiert. Dies lag hierin begründet, dass eine Differenzierung der lebenden von den toten Spermien in der Eosin B-Färbung nur sehr schwierig vorzunehmen war, da ein hohes Aufkommen von Färbeartefakten die Beurteilung verkomplizierte. Womöglich kam es aufgrund der Viskosität der Kryoprotektiva zu einer unzureichenden Farbverteilung im Eosin B-Ausstrich. Leider finden sich in der Literatur keine Angaben zum Auftreten von Färbeartefakten durch Kryoprotektiva, sodass diese Vermutung sich nicht untermauern lässt. Da sich in der Verdünnerevaluierung jedoch eine starke positive Korrelation der beiden Färbungsmethoden ergeben hatte, wurde davon ausgegangen, dass dieser Umstand auch für die Evaluierung der Kryoprotektiva zutraf, insbesondere, da CHALAH UND BRILLARD (1998) und CHALAH U. A. (1999) SYBR-14/PI als Lebend/Tot-Färbung gegenüber herkömmlichen Färbelösungen bevorzugen, da mithilfe der Fluoreszenzfärbung eine bessere Diskriminierung der toten Spermien möglich ist. Während der Lagerungszeit führte jedes der drei verwendeten Kryoprotektiva in jeder Konzentration zu einer Regression der Lebendrate und der morphologisch normalen Spermien und zu einem Anstieg der Totrate und dem Anteil der Spermien mit morphologischen Alterationen.

### 5.3.2.1 Motilitäts- und Viabilitätsanalyse

Die Kontrollproben, die nicht mit einem Kryoprotektivum versetzt waren, starteten initial (MOT,  $\bar{x} = 76,3$ ; PMOT,  $\bar{x} = 68,1$ ) mit deutlich höheren Werten als die Proben, denen ein

Kryoprotektivum zugesetzt war. So lagen die Ausgangswerte von DMA und DMSO in jeweils 8%iger Endkonzentration zwar deutlich tiefer (MOT, DMA ca. 68 %; MOT, DMSO ca. 65 %; PMOT, DMA ca. 55 %; PMOT, DMSO ca. 50 %), garantierten aber im Vergleich mit den anderen eingesetzten Konzentrationen, bzw. mit Glycerin in allen untersuchten Konzentrationen die höchsten Ausgangswerte. Der Einsatz von DMA in 8%iger Endkonzentration resultierte in der niedrigsten Verschlechterung der Motilität ( $\Delta = 13,9$  %), weshalb es für den weiteren Verlauf der Studie genutzt wurde. Der drastischste Abfall der Spermienmotilität war bei Glycerin zu beobachten. DMA demonstrierte des Weiteren bereits zufriedenstellende Ergebnisse bei der Kryokonservierung von Emuspermien im Vergleich mit DMSO und Glycerin (SOOD U. A., 2012). Hier konnte in der besten Kombination (DMA in 6%iger Endkonzentration) eine Motilität von  $29,8 \pm 1,3$  % ( $\pm$  SD), bei einer Viabilitätsrate von  $42,8 \pm 1,1$  % ( $\bar{x} \pm$  SD) und einem Anteil morphologisch normaler Spermien von  $39 \pm 1,3$  % ( $\bar{x} \pm$  SD) nach Auftauen erzielt werden, was weitestgehend vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Studie ist. BLANCO U. A. (2000) bestätigten den konzentrationsabhängigen Einfluss von DMA auf die Viabilität von Spermien verschiedener Vogelarten (Truthahn, Steinadler, Habichtsadler, Kaiseradler, Wanderfalke). Bei allen Spezies kam es bei steigender DMA-Konzentration zu einer Reduktion der Viabilität zwischen 10 und 90 % (BLANCO U. A., 2000). Überraschenderweise hatte Glycerin in allen untersuchten Konzentrationen den schädlichsten Einfluss auf die Beweglichkeit (MOT und PMOT) und Lebendrate der Nymphensittichspermien. Ursprünglich war hypothesisiert worden, dass Glycerin die potentesten kryoprotektiven Eigenschaften auf Vogelspermien besitzt, da es von POLGE U. A. (1949) als erstes Kryoprotektivum überhaupt anhand von Hahnensperma entdeckt wurde, was die Grundlage für die moderne Kryobiologie darstellte. Auch TSELUTIN U. A. (1999) bestätigten die positiven Eigenschaften von Glycerin auf den Anteil der lebenden Spermien (72 – 76 %) im Vergleich zu DMA (62 - 68 %) und DMSO (22 – 26 %) beim Geflügel. Die besseren Ergebnisse von Glycerin im Vergleich zu den anderen Kryoprotektiva werden von TSELUTIN U. A. (1999) dadurch erklärt, dass das Glycerinmolekül ein physiologischer Bestandteil der Spermienzelle ist und daher den niedrigsten schädlichen Einfluss auf diese hat. Die höchsten Fertilisationsraten wurden dennoch beim Einsatz von DMA (84,7 – 92,7 %) erzielt (TSELUTIN U. A., 1999). Auch SAMOUR U. A. (1988) benutzten erfolgreich Glycerin als Kryoprotektivum zur Tiefgefrierung von Wellensittichspermien. Es ist jedoch bekannt, dass der Grad, bis zu dem Zellen nach

der Zugabe einer kryoprotektiven Substanz schrumpfen und wieder anschwellen, abhängig von der Konzentration des jeweiligen Kryoprotektivums und der relativen Permeabilität der Membran zu Wasser und dem Kryoprotektivum ist (KLEINHANS, 1998), was für jeden Zelltypus individuell ist. So schrumpfen und schwellen Bullenspermien nur sehr wenig, wenn sie einem glyzerinhaltigen Medium ausgesetzt werden (CHAVEIRO U. A., 2006), während Kaninchenspermien hochsensitiv auf Glycerin reagieren (FOX UND BURDICK, 1963; SMITH UND POLGE, 1950). ABOUELEZZ U. A. (2015) konnten zwar keinen negativen Einfluss von Glycerin auf Frischsperma von Haushähnen ermitteln, bestätigten jedoch dessen starken kontrazeptiven Effekt ab Konzentration von 1,5 %. Diese Unterschiede in der Glycerintoleranz implizieren bedeutende speziesspezifische Unterschiede der Struktur der Spermienmembran und –funktion, die für Nymphensittiche in folgenden Studien untersucht werden sollten.

#### **5.3.2.2 Morphologische Analyse**

Der signifikant höchste Anteil der morphologischen Veränderungen betraf den Spermienkopf, die Region mit der höchsten osmotischen Sensitivität (BAKST, 1980). Aufgrund der Tatsache, dass alle in dieser Studie evaluierten Kryoprotektiva zur Kategorie der penetrierenden Substanzen gehörten, die während der Penetration des Spermienkopfes zu erheblichen Lücken im Lipidmuster der Zellmembran führen (HAMMERSTEDT UND GRAHAM, 1992), sind solche Membranschäden und daraus resultierende morphologische Veränderungen erklärbar. In einer vergleichenden Studie von MAEDA U. A. (1984) zum Effekt verschiedener Kryoprotektiva auf die Morphologie von Haushähnen wurden Glycerin, DMSO, Ethylenglykol und Methylformamid in einer Konzentration von 1 M evaluiert. Hierbei zeigte sich, dass vor dem Einfrieren kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Kryoprotektiva auszumachen war, nach dem Auftauen jedoch ein erhöhter Anteil von deformierten Spermien bei mit DMSO verdünntem Sperma im Vergleich zu den anderen Substanzen auftrat. Hierbei waren vor allem die Mittelstücke der Spermien geknickt oder gebogen. Aufgrund der Tatsache, dass das Auftreten gekrümmter Spermien negativ mit der Fertilität korreliert ( $r = 0,77$ ) (SAEKI, 1960), wird umso deutlicher, dass die Auswertung der Spermienmorphologie als ein wichtiges Hilfsmittel zur Evaluierung verschiedener Kryoprotektiva im Hinblick auf die prognostische

Fertilität anzusehen ist (O'CONNELL U. A., 2002; LÜPOLD U. A., 2009). Auch die morphologische Intaktheit des Akrosoms ist im Hinblick auf die Befruchtung bedeutend, insofern die enthaltenden Enzyme eine wichtige Rolle bei der Lyse und Penetration der perivitellinen Membran spielen (PALMER UND HOWARTH, 1973). In dieser Studie wurden durch kein zugegebenes Kryoprotektivum signifikante Veränderungen des Akrosoms hervorgerufen, wobei jedoch erwähnt werden muss, dass eine statistische Auswertung der Intaktheit des Akrosoms lediglich über die lichtmikroskopischen Untersuchungen erfolgte. MAEDA U. A. (1984) erwähnen in ihrer Studie, dass jegliche Spermideformationen in der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung deutlicher zu erkennen, bzw. zu differenzieren waren. Zukünftige Studien zum Einfluss verschiedener Kryoprotektiva auf Spermien verschiedener Papageienspezies sollten demnach, falls möglich, eine schrittweise elektronenmikroskopische Evaluation beinhalten. Nymphensittichspermien scheinen laut dieser Studie sehr viel empfindlicher auf die Anwesenheit von Glycerin in jeglicher Konzentration zu reagieren, als auf die Zugabe der anderen evaluierten Kryoprotektiva, da die höchste Rate der alleinigen Kopfveränderungen und der multiplen Veränderungen, die Kopfveränderungen beinhalteten, beim Einsatz von Glycerin auftraten. Das Auftreten von pathologischen Spermienveränderungen wird weiterhin als negativer prognostischer Faktor für die Spermienbeweglichkeit betrachtet (BLESBOIS U. A., 2008).

### **5.3.3 Evaluierung der Kühlrate**

In der vorliegenden Studie wurde ein Vergleich einer schnellen Einfrierrate mit einer langsamen, schrittweisen Kühlrate angestrebt. Die schnelle Kühlung wird vor allem im Säugetierbereich vorgenommen (PARKINSON UND WHITFIELD, 1987; HEITLAND U. A., 1996), konnte aber auch schon Erfolge im aviären Bereich erzielen (TSELUTIN U. A., 1999). Das langsame, kontrollierte Einfrieren wird hingegen häufiger beim Einfrieren von Vogelsperma praktiziert (SEXTON, 1978b; LAKE U. A., 1981; TAJIMA U. A., 1990; BACON U. A., 1986). Das schnelle Einfrieren wurde in Anlehnung an die Methode von TSELUTIN U. A. (1999) beim Geflügel vorgenommen, da diese in hohen Fertilisationsraten von ca. 92 % resultierte und daher als vielversprechend betrachtet wurde. Die Methode des langsamen, schrittweisen Einfrierens wurde unter persönlicher Anleitung von EHLING U. A. (2012) am Friedrich-Loeffler-Institut anhand von Haushahnsperma erlernt und aufgrund

der vielversprechenden Befruchtungsergebnisse (81,1 %) bei Haushühnern in der vorliegenden Studie evaluiert. Zusätzlich wurde die Methode der Vitrifikation evaluiert. Die Vitrifikation wird von einigen Autoren als vielversprechende Alternative zum konventionellen Einfrieren angesehen, da es durch ultrahohe Gefrieraten von ca. 30.000 °C/min die intrazelluläre Eiskristallbildung verhindert (LUYET UND HODAPP, 1938) und gleichzeitig um ein Vielfaches schneller und kostengünstiger als die konventionelle Methode des langsamen Einfrierens ist (NAWROTH U. A., 2002). ISACHENKO U. A. (2003) beschrieben zwei mögliche Methoden einer erfolgreichen Spermiovitrifikation. Bei der ersten Methode sind hohe Konzentrationen (ca. 30 – 50 %) an Kryoprotektiva nötig, um einen glasartigen Zustand der intrazellulären Flüssigkeit herbeizuführen. Dies wird jedoch von den relativ empfindlichen Spermien nicht gut toleriert, da es zu schwerwiegenden biochemischen Veränderungen und letalem osmotischen Stress führt (FAHY U. A., 1984). Bei der zweiten Methode werden nur sehr geringe Volumina eingesetzt, um eine hohe Temperaturübertragung zu ermöglichen (ISACHENKO U. A., 2003). Dabei gilt: je kleiner das eingesetzte Volumen, desto höher die Chance der Vitrifikation (ARAV, 1992). Beim Vergleich der Ergebnisse mit der aktuell vorhandenen Literatur muss beachtet werden, dass zum Teil unterschiedliche Zusätze (Spermaverdünner, Kryoprotektiva) zum Einsatz kamen. Von MAZUR (1970) und SEXTON (1980) ist jedoch bekannt, dass auch die Interaktion zwischen Kryoprotektivum und Kühlrate zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann, sodass unterschiedliche Ergebnisse unter Vorbehalt interpretiert werden müssen.

#### **5.3.3.1 Motilitäts- und Viabilitätsanalyse**

Die Evaluierung der verschiedenen Einfriermethoden demonstrierte, dass schnelle Einfrieraten in einer hochsignifikanten Verschlechterung aller untersuchten Spermienparameter (MOT, PMOT, Viabilität) auf Werte nahe 0 % resultierten, während Spermproben, die mit Hilfe des programmierbaren Einfrierautomaten eingefroren wurden, in vergleichsweise höheren Motilitätsraten (MOT;  $\bar{x} \pm SD = 22,2 \pm 11,3$  % und PMOT;  $\bar{x} \pm SD = 10,7 \pm 7,9$  %) resultierten. Verglichen mit den Werten vor dem Einfrieren der Proben ergab sich so eine Reduktion der MOT und der PMOT um ca. 45 %. PURDY U. A. (2009) erzielte mit Hahnensperma, das auf eine ähnliche Weise vorbehandelt wurde, lediglich eine MOT von 15,1 % bei einer PMOT von 1,8 %. Zudem wird von LONG (2006)

und SANTIAGO-MORENO U. A. (2011) eine Reduktion der Motilitätsrate um ca. 60 % nach dem Auftauen kryokonservierter Spermaproben als üblich betrachtet, sodass die Ergebnisse der vorliegenden Studie als äußerst vielversprechend zu bewerten sind. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass für die erfolgreiche Kryokonservierung von Nymphensittichen langsame Kühlraten notwendig sind, um eine intrazelluläre Eiskristallbildung zu minimieren. Diese Beobachtungen lassen sich mit Untersuchungen zur Kryokonservierung von Spermien der Felsentaube vergleichen, bei denen schnelle Einfrierraten zu Motilitätsraten von 0 % führten, ungeachtet dessen, welches Kryoprotektivum (DMA, DMSO, Polyethylenglykol) genutzt wurde. Vergleichend dazu lag die mittlere Motilitätsrate nach langsamer Einfrierrate bei  $37,8 \pm 3,0$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) (SONTAKKE U. A., 2004). Ähnliche Beobachtungen ergaben sich aus einer Studie von BLANCO U. A. (2000), in der sich zeigte, dass die Spermien von Truthähnen, Steinadler, Habichtsadler und Wanderfalke durch schnelle Kühlraten von ca. 50 °C/min irreparabel geschädigt wurden, wohingegen eine langsamere Kühlrate von 1 °C/min (von +4 °C bis -20 °C), gefolgt von 2 °C/min (von -20 °C bis -70 °C) in signifikant höheren Viabilitätsraten resultierte. FUNGFUANG U. A. (2009) ermittelten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der schnellen, einschrittigen Kühlung und dem langsamen, schrittweisen Einfrieren von Haushahnspermien.

Die aus der Humanandrologie übernommene Methode der Vitrifikation blieb weit hinter den Erwartungen zurück, da der Anteil der lebenden, und somit auch der der motilen Spermien, nach dem Erwärmen um 100 % sank. Die Vitrifikation von menschlichen Spermien wurde von NAWROTH U. A. (2002) erfolgreich in Portionen zu je 20 µl ohne den Zusatz von Kryoprotektiva durchgeführt, wobei Motilitätsraten von  $49,5 \pm 12,5$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) verglichen zu Raten von  $37,9 \pm 14,4$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) bei konventionellem, langsamen Gefrieren erzielt werden konnten. Die initiale Motilität betrug bei NAWROTH U. A. (2002)  $87,3 \pm 7,9$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ), ist also weitestgehend vergleichbar mit den Ausgangswerten dieser Studie ( $\bar{x} \pm SD = 77,3 \pm 7,0$  %). TSELUTIN U. A. (1999) erzielten durch Vitrifikation von Haushahnspermien in Pellets höhere Fertilisationsraten ( $\bar{x} \pm SD = 92,7 \pm 4,1$  %) als nach konventionellem Tiefgefrieren in Straws ( $\bar{x} \pm SD = 63,9 \pm 1,9$  %). Studien an Kaninchen-, Ratten-, Mäuse-, Meerschweinchen- und Bullenspermien resultierten jedoch in gänzlichem Misserfolg (HOAGLAND UND PINCUS, 1942), was vergleichbar zu den Resultaten der Spermienbeweglichkeit und -viabilität ist, die in dieser Studie erzielt wurden. Obwohl

aufgrund der Literaturangaben ersichtlich ist, dass das Sperma verschiedener Tierarten unterschiedlich gut geeignet zur Vitrifikation ist, scheinen die Erfolge jedoch weit hinter den herkömmlichen Methoden der Kryokonservierung zu liegen. Zukünftige Versuche in diesem Bereich sollten den Einsatz hochkonzentrierter Kryoprotektiva bei der Methode der Vitrifikation einschließen.

### 5.3.3.2 Morphologische Analyse

Bei den langsam eingefrorenen Proben stieg der Anteil der Kopfveränderungen von 16,4 % auf 23,4 %. Vergleichend dazu stieg der Anteil der Kopfveränderungen bei der schnellen Einfrierrate von 18,5 % auf 30,5 %. Somit fand sich sowohl absolut, als auch relativ, ein erhöhter Anteil an Spermienkopfanomalien bei der Methode des schnellen Einfrierens. Nach dem Auftauen kontrolliert gefrorener Spermproben fiel der Anteil normaler, unveränderter Spermien um ca. 10 %, während dieser bei schnell gefrorenen Spermproben um 18,00 % sank. In der Humanandrologie existieren unterschiedliche Angaben zur Reduktion des Anteils morphologisch unveränderter Spermien nach dem langsamen Tiefgefrierprozess. O'CONNELL U. A. (2002) berichten eine Abnahme um ca. 37 %, was eine deutlich höhere Reduktion darstellt als in der vorliegenden Studie. Im Gegensatz dazu wird von OZKAVUKCU U. A. (2008) lediglich ein Unterschied von ca. 3 % angegeben. In einer Studie an Königspinguinen (*Aptenodytes patagonicus*) betrug der Anteil morphologisch normaler Spermien vor dem Einfrieren 78,1 % (O'BRIEN UND ROBECK, 2014). Im Vergleich verschiedener Einfriermethoden lag dieser Anteil bei schnell eingefrorenen Proben nach dem Auftauen bei 34,6 %, während ein geringfügig höherer Anteil bei konventionell, mithilfe eines Einfrierautomaten, gekühlten Proben (36,8 %) zu verzeichnen war. Die Reduktion lag somit bei ca. 40 % und dementsprechend weit höher als in der vorliegenden Studie. Ähnliche Beobachtungen erfolgten beim Auerhahn (*Tetrao urogallus*) mit einer Reduktion der normalen Spermien um 42 %, sodass die Ergebnisse der aktuellen Studie als vergleichsweise vielversprechend interpretiert werden können. Die Vitrifikation hatte ebenfalls einen maßgeblichen Einfluss auf die Spermienmorphologie, da eine signifikant höhere Rate an Kopfdeformationen ( $\Delta = 27,1\%$ ) nach dem Erwärmen der Proben auftrat, während der Anteil normaler Spermien um nahezu 40 % sank. Vergleichend dazu ermittelten NAWROTH U. A. (2002) lediglich eine

26%ige Reduktion der Rate morphologisch unveränderter, humaner Spermien nach Vitrifikation. Eine mögliche Erklärung für die auftretenden Unterschiede liefern DROBNIS U. A. (1993), die vermuten, dass die Zusammensetzung und Anordnung der Lipidmoleküle in der Plasmamembran, genauso wie die Cholesterin/Phospholipidrate und die Protein/Phospholipidrate die Resistenzfähigkeit der Spermien gegenüber dem Kälteschockeffekt beeinflussen. Die Untersuchung der Plasmamembranzusammensetzung von Nymphensittichspermien war jedoch nicht Ziel der gegenwärtigen Studie, sollte in Zukunft hingegen näher beleuchtet werden.

#### **5.3.4 Evaluierung verschiedener Auftau- bzw. Erwärmmethoden**

Die Evaluierung verschiedener Erwärmmethoden erfolgte lediglich nach Einfrieren mittels Vitrifikation, da sich beim konventionellen Tiefgefrieren das Auftauen im +4 °C kalten Wasserbad als gut geeignet erwiesen hatte (BAKST UND SEXTON, 1979; BLANCO U. A., 2011; EHLING U. A., 2012). Zunächst wurde auch nach der Vitrifikation dieselbe Erwärmmethode angewandt, jedoch waren die Ergebnisse dieser moderaten Erwärmrate im +4 °C Wasserbad nicht zufriedenstellend (Motilitäts- und Viabilitätsraten nahe 0 %). Aus diesem Grund erfolgte die zusätzliche Evaluierung von sechs weiteren Erwärmmethoden. Drei Methoden fanden in einer 37 °C Umgebung statt, um die Erwärmgeschwindigkeit zu erhöhen (TSELUTIN U. A., 1999; PENFOLD U. A., 2001; ISACHENKO U. A., 2004) und somit ausschließen zu können, dass die schlechten Raten nicht lediglich das Ergebnis einer unzureichenden Erwärmmethode waren. Die optimale Erwärmrate von gefrorenen Spermproben ist abhängig von der eingesetzten Gefrierate (HAMMERSTEDT U. A., 1990), um das Phänomen der Rekristallisation zu vermeiden. Auf diese Weise sollen massive Zellschäden umgangen werden, die anderweitig zum Funktionsverlust der Zelle führen (MAZUR, 1984). Auf die erneute Evaluierung von konventionell tiefgefrorenen Proben mithilfe der sechs zusätzlichen Erwärmmethoden wurde verzichtet, da eine statistisch adäquate Ausführung dieser Fragestellung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Nichtsdestotrotz böte dieser Ansatz das Potential zu tiefergehender Betrachtung und sollte in zukünftigen Studien aufgegriffen werden.

#### 5.3.4.1 Motilitäts- und Viabilitätsanalyse

Jegliche Erwärmethode resultierte in einer drastischen Reduktion der Gesamt- und Vorwärtsmotilität, sowie der Spermienviabilität nach dem Erwärmen im Vergleich zu den Ausgangsproben. Ausgehend von einer MOT von  $85,3 \pm 6,9 \%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) vor Vitrifikation lag die höchste Gesamtbeweglichkeit bei  $0,7 \%$  nach kombinierter Wasserbadmethode. Auch bei der Vorwärtsmotilität ( $\bar{x} = 0,2 \%$ ) und der Viabilität ( $\bar{x} = 1,1 \%$ ) wurden die höchsten Anteile nach der kombinierten Wasserbadauftaumethode erzielt. Im direkten Vergleich mit den Ausgangswerten (PMOT,  $\bar{x} = 75 \%$ ; Viabilität,  $\bar{x} = 89,3 \%$ ) wird der drastische Qualitätsverlust jedoch deutlich. NAWROTH U. A. (2002) erzielten nach Vitrifikation humaner Spermien deutlich höhere Motilitätsraten von  $49,5 \pm 12,5 \%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) nach schnellen Erwärmraten mithilfe eines  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  warmen Wasserbades. SÖDERQUIST U. A. (1997) ermittelten signifikant höhere Motilitäts- und Viabilitätsraten von Schafbockspermien nach dem Erwärmen bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $67 \%$  und  $63 \%$ ) als nach dem Erwärmen bei  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $50,5 \%$  und  $41,7 \%$ ). Auch bei Hahnensperma resultierten schnellere Erwärmraten mit Hilfe von thermoregulierbaren Wärmeplatten ( $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ) in höheren Fertilisationsraten (ca.  $94 \%$ ) als nach moderaten Erwärmraten (ca.  $67 \%$ ) (TSELUTIN U. A., 1995, 1999). Dem gegenüber steht die Untersuchung von BLANCO U. A. (2012), die den Einfluss zweier verschiedener Erwärmraten (moderat:  $12,8 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ; langsam:  $6,3 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ) auf die Viabilität und Motilität von Kanadakranich- und Truthahnpermien untersuchten, hierbei jedoch keinen signifikanten Unterschied feststellten. Keine der in dieser Studie untersuchten Erwärmmethoden führte zu zufriedenstellenden Motilitäts- oder Viabilitätsraten nach Vitrifikation. Aufgrund der Homogenität der Ergebnisse konnte kein statistischer Unterschied zwischen den verschiedenen Erwärmmethoden ermittelt werden. Mögliche weitere Ansätze von zukünftigen Untersuchungen sollten die Evaluierung höherer Erwärmtemperaturen zum Erreichen noch schnellerer Erwärmraten (SÖDERQUIST U. A., 1997), sowie die Verwendung zusätzlicher Erwärmmedien, wie zum Beispiel SpermRinse™ (ISACHENKO U. A., 2005), beinhalten.

#### 5.3.5 Transmissionselektronenmikroskopie

In einer Studie zum Einfluss verschiedener Kryoprotektiva auf die Spermienmorphologie von Haushähnen zeigte sich in der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung, dass

alle Bereiche der Spermienzelle klarer und deutlicher zu erkennen waren als in der lichtmikroskopischen Untersuchung (MAEDA U. A., 1984). Daraus wurde geschlossen, dass die Elektronenmikroskopie die sensitivere Methode zur Evaluation morphologischer Veränderungen darstellt (MAEDA U. A., 1984), was unterstützt wird von OZKAVUKCU U. A. (2008), die zudem eine höhere Sensitivität der Raster- gegenüber der Transmissionselektronenmikroskopie in Bezug auf Oberflächenstrukturveränderungen humaner Spermatozoen ermittelten. Die Elektronenmikroskopie stellt somit in jedem Fall eine geeignete Untersuchungsmethode für größere Spermavolumina, bzw. zur gezielten Investigation der Intaktheit der Spermienmembran in fraglichen Fällen dar, wie es auch in der Humanandrologie (CARBONE U. A., 1998; MORETTI UND COLLODEL, 2012) oder in der erweiterten Zuchttauglichkeitsbeurteilung von Hengsten (PESCH U. A., 2006b) praktiziert wird. Die Entscheidung zur Transmissionselektronenmikroskopie erfolgte aus praktikablen Gründen, da eine Zusammenarbeit mit dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie die Bereitstellung der benötigten Utensilien und Materialien, sowie Hilfe bei der Auswertung der Schnitte möglich war. Bei der Auswertung wurden nicht die einzelnen morphologischen Alterationen betrachtet, sondern lediglich die Spermien hinsichtlich ihrer Membranintegrität beurteilt. Die Plasmamembran ist von herausragender Bedeutsamkeit für das Überleben der Spermien während des Einfrier- und Auftauprozesses und wird daher als der Hauptangriffspunkt von Gefrierschäden betrachtet (WATSON, 1995). In der vorliegenden Studie wurde jeweils eine unbehandelte Probe und eine Probe, die nach den Methoden des entwickelten Kryokonservierungsprotokolls eingefroren wurde, transmissionselektronenmikroskopisch untersucht und mit physiologischen Aufnahmen verglichen (JAMIESON U. A., 1995; LOVAS U. A., 2012). Die Beurteilung der Membranschäden erfolgte in Anlehnung an die von PESCH U. A. (2006b) und PESCH UND BERGMANN (2006) beschriebenen Veränderungen von Pferde- und Menschspermien. Die Ergebnisse wurden aufgrund des stark limitierten Probenumfangs in der vorliegenden Studie jedoch lediglich quantitativ miteinander verglichen. Nach Kryokonservierung trat ein doppelt so hoher Anteil von Plasmamembranveränderungen im Bereich des Kopfes auf, wohingegen Integritätsverluste im Bereich des Akrosoms und des Mittelstücks mit 4 % Unterschied nur leicht erhöht waren. Membranveränderungen im Bereich der Spermiengeißel zeigten sich in der vorliegenden Untersuchung unabhängig von der Behandlung der Spermprobe.

Diese Beobachtung wird unterstützt von WATSON U. A. (1987), der beschrieb, dass bei Hengsten Membranschäden des Spermienkopfes zunächst die Plasmamembran betreffen und erst danach die Akrosomenmembran. Das Vorkommen von Membrandefekten in der nativen Spermaprobe in der Transmissionselektronenmikroskopie zeigte sich ähnlich zu den mittels Fluoreszenzfärbung (SYBR/PI) ermittelten Werten nativer Spermaproben ( $\bar{x} = 25,00 \%$ ). Von SÖDERQUIST U. A. (1997) wurde bereits eine hohe Korrelation der Untersuchungsmethoden Fluoreszenzfärbung und Rasterelektronenmikroskopie in Bezug auf die Membranintegrität (ca. 40 %) von Schafbockspermien bestätigt, was die vorliegenden Ergebnisse unterstreicht. Bei der kryokonservierten Probe war ein solcher Zusammenhang jedoch nicht zu verzeichnen, hier war der Anteil membrandefekter Spermien in der Fluoreszenzevaluierung ( $\bar{x} = 70,17 \%$ ) deutlich höher als der durch Elektronenmikroskopie ermittelte Wert ( $\bar{x} = 48,00 \%$ ). Es muss jedoch bedacht werden, dass in der Transmissionselektronenmikroskopie nur selten Spermien in ihrer ganzen Länge angeschnitten sind und daher immer nur Teilabschnitte evaluiert werden können (FISCHBEIN U. A., 1997). Wenn also ein Membrandefekt nicht zufällig auf dem angeschnittenen Membranabschnitt lag, entzog er sich der Kenntnis und somit der Evaluierung. Ein Vergleich der beiden Proben resultierte in einem um ca. 50 % erhöhten Auftreten von Membrandefekten in der aufgetauten Spermaprobe, wobei die meisten Membrandefekte am Spermienkopf auftraten. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von BAKST UND SEXTON (1979), sowie O'CONNELL U. A. (2002), die nach Kryokonservierung eine um 50 % gesteigerte Rate von Plasmamembranschäden von Haushahn-, Truthahn-, sowie humaner Spermien beobachteten. Aufgrund des relativ großen benötigten Volumens (min. 100  $\mu\text{l}$ ) mit hoher Spermidichte stellte sich diese Methode zur routinemäßigen Anwendung als Qualitätsbeurteilung von Nymphensittichspermien jedoch als nicht geeignet dar. Dies war zudem der Grund, dass in dieser Studie nur zwei Proben einer elektronenmikroskopischen Untersuchung unterzogen wurden. Die limitierte Aussagekraft in diesem Fall muss daher kritisch betrachtet werden. Zukünftige Studien sollten daher eine größere Anzahl von Proben inkludieren, um die statistische Aussagekraft zu erhöhen.

### 5.3.6 Fertilisationsversuch

#### 5.3.6.1 Endoskopische Sterilisation von männlichen Nymphensittichen

Die endoskopische partielle Vasektomie der Hähne verlief bei 95 % der Tiere (19/20) komplikationslos. Ein Hahn fiel am Morgen nach dem Eingriff mit hochgradiger Dyspnoe auf und musste nachfolgend aufgrund einer persistierenden Lungenblutung euthanasiert werden. Die Blutung könnte eventuell durch eine Perforation der Lunge durch die stumpfe Penetration der Bauchmuskulatur mit der gebogenen Klemme verursacht worden sein, wobei auch eine primäre Schädigung des Lungengewebes im Sinne einer bis dato asymptomatischen Pneumonie nicht ausgeschlossen werden kann und im vorliegenden Fall wahrscheinlich erscheint. In sechs Fällen traten während der Operation gering- bis mittelgradige Blutungen des gemeinsamen Gekröses des Harn- und Samenleiters auf, wegen derer drei Eingriffe unterbrochen wurden und am nachfolgenden Tag fortgeführt wurden. In keinem der Fälle kam es zu einer Perforation des Harnleiters und die Tiere erholten sich problemlos von dem Eingriff, sodass sie ca. 24 Stunden nach Vollendung des Eingriffes wieder in ihre Voliere entlassen werden konnten. Eine Kontrollendoskopie wurde nicht durchgeführt. Stattdessen fand die Erfolgskontrolle des Eingriffes durch die Bestätigung von vier komplett infertilen Gelegen je Brutpaar statt. Hierzu wurde die Infertilität sämtlicher Eier der Gelege durch zweierlei Untersuchungsmethoden (Schieren und digitales Monitoring des Blutflusses) verifiziert. Alle Hähne zeigten nach der Sterilisation ein unverändertes Sozial- und Paarungsverhalten. Aus Studien an Japanischen Zwergwachteln (*Coturnix coturnix japonica*) (JONES UND REDIG, 2003), Kanadagänsen (*Branta canadensis*) (CONVERSE UND KENNELLY, 1994) und Stadttauben (*Columba livia domestica*) (HEIDERICH, 2014) geht hervor, dass sich nach Sterilisation keine Beeinträchtigung des Soziosexualverhaltens und daraus resultierend auch keine Beeinflussung des Sexualhormonhaushaltes der Tiere einstellt, was auch in der vorliegenden Studie zu gelten scheint.

#### 5.3.6.2 Artificielle Insemination von weiblichen Nymphensittichen

Aus dem Geflügelbereich ist bekannt, dass mehr als 80 % der Spermien unmittelbar nach der Insemination oder Kopulation aus der Kloake ausgeschieden werden (BAKST, 2011) und

dass nur ca. 1 % der intravaginal inseminierten Spermien überhaupt fähig sind, die Uterovaginaldrüsen zu erreichen (BAKST U. A., 1994), was bedeutet, dass sogar nach intravaginaler Insemination fortgeschrittene Mechanismen der Spermiselektion stattfinden. In dieser Studie wurde die Form der intravaginalen Insemination bevorzugt, da sich in Studien an Haushühnern gezeigt hatte, dass die Befruchtungsrate nach intravaginaler Insemination deutlich höher lag (97 %) (QUINN UND BURROWS, 1936), als nach intrakloakaler Insemination (19,1 %) (JULL UND QUINN, 1931). Zudem führt eine intrakloakale Insemination häufig zu einer Kontamination mit Kotbestandteilen und Uraten, was jedoch einen negativen Einfluss auf die Spermienqualität und somit zwangsläufig auch auf die Befruchtungsrate haben kann (BLANCO U. A., 2002a). War die intravaginale Insemination aufgrund von Abwehrbewegungen der Vögel nicht möglich, wurde auf die Methode der intrakloakalen Insemination zurückgegriffen, um Verletzungen der Tiere zu vermeiden. Diese wurde bei zahlreichen nichtdomestizierten Vogelspezies ebenfalls bereits erfolgreich angewandt (STUNDEN U. A., 1998; PENFOLD U. A., 2001; SONTAKKE U. A., 2004). Auch bei Nymphensittichen konnte nach intrakloakaler Insemination eine Befruchtungsrate von 73,9 % erzielt werden (NEUMANN U. A., 2013). In einer Studie zur minimal notwendigen Inseminationsdosis an Nymphensittichen betrug die Fertilisationsrate nach intravaginaler Insemination 66,7 % (FISCHER U. A., 2014b), sodass in der vorliegenden Studie beide Methoden als zuverlässig eingestuft wurden. Der Zeitpunkt der ersten von drei Wiederholungen der artifiziellen Insemination wurde gewählt, sobald das erste Ei der Gruppe gelegt wurde. Dieses Ei wurde abgewartet, da sonst in der Gruppe die Eier nicht sicher den Weibchen zugeordnet werden konnten. Inseminiert wurden nur diejenigen Hennen, die geweitete Legebeine, in Kombination mit einer deutlich sichtbaren, ödematisierten Oviduktöffnung aufwiesen, um falsch negative Befruchtungsergebnisse durch die Insemination sexuell inaktiver Weibchen zu vermeiden. Das erste Ei des Geleges war demnach unbefruchtet, da eine artifizielle Insemination mindestens 4 bis 5 Tage vor der Oviposition des ersten Eis erfolgen muss, um zu einer erfolgreichen Befruchtung zu führen, wie aus Studien an Wanderfalken und Steinadlern bekannt wurde (BLANCO U. A., 2002a). Die intrakloakale artifizielle Insemination eines Banks-Rabenkakadus (*Calyptorhynchus banksii*, ehem. *magnificus*) zwei Tage vor der Eiablage resultierte in einem unbefruchteten Ei (BEHNCKE UND STELZER, 2003). FISCHER U. A. (2014c) fanden heraus, dass für die intrakloakale artifizielle Insemination von

Nymphensittichen ein Volumen von 5  $\mu\text{l}$  mit einer Anzahl von 232.500 Spermien notwendig war, um in einem Fall zu sichtbarer Embryonalentwicklung zu führen. Für die erfolgreiche intravaginale Insemination waren hingegen lediglich 2  $\mu\text{l}$  Sperma mit einer geringgradig höheren Anzahl an Spermien (250.000) nötig, um zu einer erfolgreichen Befruchtung zu führen. Pro artifizieller Insemination wurde ein Volumen zwischen 8 und 15  $\mu\text{l}$  gewählt mit einer mittleren Spermienkonzentration von  $729.542 \pm 404.078,4$  Spermien/ $\mu\text{l}$  und einer hieraus resultierenden Inseminationsdosis von  $2.020.895,8 \pm 1.123.715,6$  Spermien/Tier ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ). Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass selbst bei Verlust einer kleinen Flüssigkeitsmenge, z. B. durch Defäkation, noch ein ausreichendes Volumen mit einer ausreichenden Spermiedosis in der Kloake verblieb, bzw. in der Lage war, die Vagina zu erreichen. Auf eine Entfernung des Kryoprotektivums vor AI wurde in dieser Studie verzichtet, da die Kryokonservierung der Spermien zuvor mit Hilfe von DMA erfolgte, was eine Entfernung laut TSELUTIN U. A. (1999) und PURDY U. A. (2009) nicht notwendig macht. In einem Befruchtungsversuch von Hühnern, bei dem mit DMA versetztes Sperma ohne vorherige Entfernung des Kryoprotektivums inseminiert wurde, konnten Fertilisationsraten zwischen 84,7 und 92,7 % erzielt werden, was keinen signifikanten Unterschied zur AI mit Frischsperma (94,7 %) ausmachte (TSELUTIN U. A., 1999). Im Gegenteil führen sämtliche Entfernungstechniken zu einer irreversiblen Schädigung der Spermien (PURDY U. A., 2009; MOCÉ U. A., 2010), was ein weiterer Grund war, auf diese Methode zu verzichten.

Während des ersten Inseminationsexperimentes wurden 42,9 % der artifiziellen Inseminationen mit Frischsperma intravaginal vorgenommen, während 57,1 % intrakloakal in die Nähe der Oviduktöffnung vorgenommen. Die mittlere Spermienkonzentration betrug 391.677 Spermien/ $\mu\text{l}$  in einem Inseminationsvolumen von 13  $\mu\text{l}$ . Vergleichend wurden 57,1 % der Inseminationen mit TG-Sperma intravaginal vorgenommen, während 42,9 % intrakloakal durchgeführt werden mussten. Pro Insemination wurde eine mittlere Spermienkonzentration von 794.667 Spermien/ $\mu\text{l}$  in einem Volumen von 11  $\mu\text{l}$  verwendet. Im zweiten Inseminations-Experiment erfolgte die artifizielle Insemination mit Frischsperma in 57,1 % der Fälle intravaginal mit einer Spermienkonzentration von 520833 Spermien/ $\mu\text{l}$  bei einem instillierten Volumen von durchschnittlich 11  $\mu\text{l}$  pro Henne. Im Vergleich dazu wurden 58,3 % der Insemination mit

TG-Sperma intravaginal durchgeführt. Im Mittel betrug die Spermienkonzentration 1.211.000 Spermien/ $\mu$ l in einem Volumen von ebenfalls 11  $\mu$ l. In allen Fällen lagen sowohl das Inseminationsvolumen, als auch die Inseminationsdosis über den von FISCHER U. A. (2014c) angegebenen Minimalwerten, weshalb von einem Erfolg ausgegangen werden konnte. Die Inseminationsdosis bei mit Tiefgefriersperma inseminierten Weibchen wurde höher als die der Frischspermaproben gewählt, da von einem erheblichen Qualitätsverlust durch den Einfrier- und Auftauprozess ausgegangen werden musste, was in den vorherigen Evaluation ersichtlich wurde. Da außerdem vom Geflügel bekannt ist, dass nur ca. 20 % der Spermien unmittelbar nach der Insemination in der Kloake verbleiben (BAKST, 2011) und dass mehr als 99 % der intravaginal inseminierten Spermien nicht fähig sind, die Uterovaginaldrüsen zu erreichen (BAKST U. A., 1994), sollte auf diese Weise die Wahrscheinlichkeit der Befruchtung erhöht werden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Befruchtungsergebnisse wäre es hingegen ratsam ein standardisiertes Volumen mit einer genau adaptierten Spermienkonzentration und somit einer gleichbleibenden Inseminationsdosis einzusetzen. In dieser Studie ging es jedoch vornehmlich um die Erforschung ob auf diese Weise konserviertes Sperma überhaupt in der Lage ist, zu einer erfolgreichen Befruchtung zu führen und sich das Protokoll für eine Anwendung in der Praxis eignet. In Zukunft sollten sich daher detailliertere Studien mit der Evaluation von Inseminationsdosen nach Kryokonservierung beschäftigen. Nach artifizieller Insemination mit Frischsperma wurden Befruchtungsraten von 92,6 % und 67,7 % erreicht, was vergleichbar mit Ergebnissen aus einer vorherigen Studie an Nymphensittichen ist, bei der eine Befruchtungsrate von 73,9 % nach intrakloakaler Insemination erzielt wurde (NEUMANN U. A., 2013). Auch bei anderen Papageienarten wurde eine ähnliche mittlere Fertilisationsrate nach AI ( $\bar{x}$  = 69,4 %) erzielt (LIERZ U. A., 2013). Die etwas höhere Rate ist wahrscheinlich der Tatsache geschuldet, dass in der vorliegenden Studie in etwa die Hälfte der Inseminationen intravaginal durchgeführt werden konnte und so das Risiko der Spermaausscheidung durch Kotabsatz oder Spermienbehinderungen durch das Vorhandensein von Kot und/oder Urin in der Kloake minimiert war. Nach intravaginaler artifizieller Insemination von Wellensittichen mit Frischsperma wurden Befruchtungsergebnisse von 88,8 % erzielt (SAMOUR U. A., 1988), was vergleichbar mit dem Ergebnis des Experiments 1 ist (92,6 %). Eine wesentlich niedrigere Fertilisationsrate (1/11; 9,1 %) wurde hingegen nach AI mit Frischsperma von Blaukronenamazonen

berichtet (BROCK, 1991). Nach artifizierter Insemination mit TG-Sperma wurden Fertilisationsraten von 30,8 und 18 % ermittelt. In einer Studie an Wellensittichen berichtete SAMOUR U. A. (1988) von einer wesentlich höheren Befruchtungsrate von 66,6 %, aber in vielen anderen nichtdomestizierten Vogelspezies sind Fertilisationsraten von annähernd 30 % sehr viel wahrscheinlicher (GEE UND SEXTON, 1990; PARKS U. A., 1986). Trotz der hohen Inseminationsvolumina und der im Vergleich zu Frischsperma höheren Spermindichte wurde die Chance, eine erfolgreiche Befruchtung zu erzielen, signifikant negativ (Coeff = -2,598;  $p < 0,0001$ ) von der Spermabeschaffenheit (TG-Sperma) beeinflusst. So bestand die Chance, mit TG-Sperma zu einer Befruchtung zu führen nur in ca. 1/14 der Chance, die bei der gleichen Methodik allerdings unter Verwendung von Frischsperma garantiert war. Diese vergleichsweise geringe Chance lässt sich womöglich durch die nicht unerheblichen Qualitätseinbußen des TG-Spermas im Vergleich zu Frischsperma erklären (WATSON, 2000). Eine ähnliche Beobachtung wurde ebenfalls bei Ebern (*Sus scrofa*) beschrieben, deren Spermienqualität nach Kryokonservierung signifikant abnahm (CEROLINI U. A., 2001). Hierbei wurde bestätigt, dass der Qualitätsverlust umso höher war, je schlechter die Ausgangsqualität der Spermaproben war, woraus sich die Notwendigkeit zu qualitativ hochwertigen Ausgangsproben ableitet. Nach artifizierter Insemination mit TG-Sperma wurden keinerlei Anzeichen einer lokalen oder systemischen Infektion bei den Nymphensittichhennen beobachtet. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das darin enthaltene Kryoprotektivum DMA weder zu Schleimhautreizungen, noch zu verspäteten Reaktionen wie Verklebungen des Eileiters, bzw. Legenot bei Nymphensittichen führt und daher bedenkenlos zum Tiefgefrieren von Papageiensperma eingesetzt werden kann, was im Einklang zu Beobachtungen mit Hahnensperma steht (TSELUTIN U. A., 1999; PURDY U. A., 2009). Auch im Säugetierbereich wurde bei Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus forma domestica*) nicht von entzündlichen Reaktionen nach artifizierter Insemination mit DMA-haltigem TG-Sperma berichtet (DI IORIO, 2015).

Die signifikant niedrigeren Fertilisationsraten beider Gruppen in Experiment 2 (Frischsperma: 67,7 %; TG-Sperma: 18 %) im Vergleich zu Experiment 1 (Frischsperma: 92,6 %; TG-Sperma: 30,8 %) sind womöglich dem anhaltenden Stress aufgrund lang andauernder Bauarbeiten in unmittelbarer Nähe der Volieren geschuldet. WHIRLEDGE UND

CIDLÓWSKI (2010) erläutern anhand zugrundeliegender molekularer Mechanismen die negativen Auswirkungen eines erhöhten Kortisolspiegels auf die Reproduktionsaktivität. So führt ein erhöhter Kortisolspiegel bei weiblichen Ratten beispielsweise zur einer frühen Apoptose der Plazenta und verhindert so die Nidation des Embryos (WADDELL U. A., 2000). Auch bei Vögeln wurde der negative Einfluss einer anhaltenden Immunsuppression auf die Reproduktionsaktivität beschrieben (WILLIAMS, 2005; TRAVERS U. A., 2010), sodass auch in diesem Fall von diesem Einfluss ausgegangen werden kann. Aus dem Bereich der Zier- und Volierenvögel ist zudem bekannt, dass mehr als 30 % der frühen Embryontode im ersten Drittel der Bebrütungsdauer auftreten, wobei Gründe dafür exzessive Erschütterungen und Stress darstellen können (SCHMIDT U. A., 2008), was sicherlich einen zusätzlichen negativen Effekt auf die Embryonalentwicklung in der vorliegenden Studie ausübte. Die Optimierung und Vereinheitlichung der Umweltbedingungen sollte daher bei allen zukünftigen Untersuchungen angestrebt werden, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. In diesem Fall war eine Verbesserung der äußeren Einflüsse jedoch ungünstigerweise nicht möglich, da sich die Baumaßnahmen in unmittelbarer Umgebung der Tierhaltung über einen Zeitraum von mehreren Monaten hinzogen, sodass die komplette Zuchtsaison während des Fertilisationsversuches davon betroffen war.

#### **5.4 Schlussbetrachtungen und offene Fragestellungen**

Der Evaluation der Spermaqualität kommt hinsichtlich der Prognostizität des Überlebens der Spermien während der Lagerungszeit, aber auch des Befruchtungserfolges nach AI eine große Bedeutung zu (BLESBOIS U. A., 2008). Standardmäßige In-vitro Tests zur Spermienanalyse sind die Evaluation der Spermiovitalität, der Prozentsatz der lebenden, morphologisch unveränderten Spermien und – womöglich am wichtigsten – der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien (BIRKHEAD U. A., 1999; FROMAN, 2000). Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie lässt sich zusammenfassen, dass sowohl ein geeigneter Spermaverdünner zur Flüssigkonservierung evaluiert und modifiziert, als auch ein effizientes Protokoll zur Kryokonservierung von Nymphensittichspermien entwickelt wurde. Insgesamt wurden 17 befruchtete Eier aus der artifiziellen Insemination mit TG-Sperma gewonnen, aus denen 12 Küken schlüpften. Dabei handelt es sich nach Kenntnis

der aktuell erhältlichen Literatur um den weltweit ersten Nymphensittichnachwuchs, der mit Hilfe von kryokonserviertem Sperma produziert wurde. Dies bedeutet einen ersten wichtigen Schritt zur Etablierung eines Kryokonservierungsprotokolls für weitere Papageienarten. Besonders im Hinblick auf stark bedrohte Spezies verspricht diese Methode einen Durchbruch in Arterhaltungsprogrammen, die häufig aus Mangel an natürlicher Nachzucht scheitern. Die offene Frage, die aus den Ergebnissen resultiert, ist, ob die bei diesen Versuchen erzielte höchste Fertilisationsrate von ca. 30 % nach artifizierlicher Insemination mit TG-Sperma für eine routinemäßige Anwendung ausreichend ist. Des Weiteren muss erwähnt werden, dass die in dieser Studie wirksamste Methode der Kryokonservierung von der Nutzung qualitativ hochwertiger, und daher teurer, Materialien und Geräte abhängig war und sich gleichzeitig auch als sehr zeitaufwändig darstellte. Dies macht eine nichtkommerzielle Nutzung unter Umständen schwierig, stellt aber selbstverständlich keinen letztendlichen Hinderungsgrund dar.

Das vorliegende Protokoll sollte als Grundlage zur Anwendung des Artenschutzes bedrohter Papageien betrachtet werden. Ein möglicher Transfer auf andere Papageienarten muss jedoch in zukünftigen Untersuchungen evaluiert werden, da speziesspezifische Unterschiede im Spermienaufbau und -metabolismus unterschiedliche Anforderung der Spermien an Spermaverdünner, Kryoprotektivum, Kühl- und sogar Auftauraten stellen können.

Eine Übertragbarkeit, bzw. Modifikation des Protokolls auf weitere Papageienarten stellt besonders im Hinblick auf den Artenschutz seltener, und hochbedrohter Papageienarten wie z.B. dem Spix-Ara (*Cyanopsitta spixii*) und der Königsamazone (*Amazona guildingii*) eine vielversprechende Option dar. Der Transport kryokonservierter Spermien würde es ermöglichen, dass geographisch weit voneinander entfernte Tiere für Zuchtprogramme verpaart werden könnten, um den Genpool bedrohter Arten optimal auszunutzen. Dies würde den Transport der Tiere, die damit verbundenen Gefahren und Stresssituationen (Gesundheits-Checks, Quarantäne, Paarzusammenführung, Eingewöhnung in den neuen Lebensraum) umgehen. Außerdem könnte bei seltenen Spezies durch vorherige Tests ausgeschlossen werden, dass Erreger durch die artifizierliche Insemination übertragen würden, die beim direkten Kontakt ein Risiko darstellen (LIERZ U. A., 2008). Auf diese Weise würden virale und bakterielle Infektionen, als zusätzliche Bedrohung für die Bestände,

---

eingedämmt (SNYDER U. A., 1996). Zudem erlaubt die Kryokonservierung die Schaffung von Gendatenbanken, die im aviären Bereich bisher gänzlich fehlen. Diese existieren jedoch für seltene Säugetierspezies (FICKEL U. A., 2007) und bieten dort die erfolgreiche Möglichkeit der dauerhaften Sicherung von Genmaterial bedrohter Spezies. Zudem sind sie bedeutend für die Erhaltung der genetischen Diversität und eines stabilen Genpools (HOLT UND PICKARD, 1999; WILDT U. A., 1997). Diese Arbeit stellt einen wichtigen Schritt in diese Richtung dar und könnte in Zukunft zur Erschaffung eben dieser Datenbanken im psittaziden Bereich und somit dem Erhalt bedrohter Papageienspezies dienen.

## 6. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, ein effektives Protokoll zur Kryokonservierung von Papageiensperma durch eine schrittweise Evaluierung zu entwickeln. Nymphensittiche (*Nymphicus hollandicus*) wurden als Modelltiere gewählt, da sie aufgrund ihrer geringen Größe leicht zu halten sind und in Menschenobhut nahezu ganzjährig zuverlässig reproduzieren. Des Weiteren lagen für diese Spezies bereits Orientierungsdaten zum Vergleich der Spermawerte vor und die Techniken der assistierten Reproduktion wurden zudem im Vorfeld der Studie an dieser Spezies erfolgreich angewendet.

Im Vorversuch der Studie wurden regelmäßige Spermaentnahmen an einer Gruppe von 30 männlichen Nymphensittichen durchgeführt, um die Ausgangswerte der Spermparameter für den folgenden Hauptversuch zu erhalten. Insbesondere der pH- ( $\bar{x} = 7,4$ ) und der Osmolalitätswert ( $\bar{x} = 297$  mOsm/kg) von nativem Sperma waren von großer Bedeutsamkeit für den weiteren Verlauf der Studie, da im ersten Teil der Hauptstudie drei verschiedene Spermaverdünner (SV 1 = Verdünner nach LAKE UND STEWART (1978); SV 2 = Verdünner nach BLANCO U. A. (2008); SV 3 = Beltsville-Poultry-Semen-Extender nach SEXTON (1977)) spezifisch auf die Physiologie von Nymphensittichspermien angepasst und entsprechend des pH-Wertes und Osmolalitätswertes modifiziert wurden, um eine optimale Grundlage zur Langzeitkonservierung zu schaffen. Mithilfe von 64 Einzelproben wurde jeder der drei Spermaverdünner in zwei unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:4 und 1:8) hinsichtlich Spermienmotilität, -vitalität und -morphologie über einen Zeitraum von 120 Minuten zu fünf Untersuchungszeitpunkten evaluiert. Im zweiten Teil der Studie wurden dem Sperma, das mit dem besten Verdünner versetzt wurde, drei verschiedene Kryoprotektiva (Glyzerin, Dimethylacetamid, Dimethylsulfoxid) in drei unterschiedlichen Konzentrationen (4 %, 8 %, 12 %) zugegeben, um dasjenige mit den geringsten Negativeinflüssen auf die Spermienqualität als Gefrierschutzmittel zur weiteren Verwendung zu evaluieren. Der nächste Schritt lag in der Evaluierung des Einflusses verschiedener Kühlraten auf Spermienmotilität, -viabilität und -morphologie. Hierzu wurde dasjenige Spermaverdünner/Kryoprotektivum-Gemisch mit den besten Ergebnissen eingesetzt und die Spermproben wurden vergleichend mit einer schnellen Kühlrate ( $> 50$  °C/min) und einer kontrollierten, langsamen Gefriertrate mithilfe

des programmierbaren Einfrierautomaten IceCube 14S eingefroren. Im letzten Versuchsteil wurden erneut Spermaproben auf die Weise eingefroren, die sich als die vielversprechendste Methode in den vorangegangenen Versuchsteilen etabliert hatte. Zwei Gruppen weiblicher Nymphensittiche wurden mit endoskopisch vasktomierten Nymphensittichhähnen vergesellschaftet, um ein natürliches Fortpflanzungsverhalten zu stimulieren und gleichzeitig eine natürliche Fertilisation zu verhindern. In einem Cross-over-Fertilisationsversuch wurden die Hennen aus Gruppe 1 zunächst artifiziell mit Frischsperma als Kontrolle inseminiert, während die Hennen aus Gruppe 2 aufgetaute Tiefgefrierspermaproben erhielten. Im zweiten Fertilisationsexperiment wurden die Gruppen getauscht, um individuelle Einflüsse der Hennen auszuschließen. Letztendlich ergab die Befruchtungsrate Aufschluss über die Effektivität des entwickelten Protokolls.

Nach 120 Minuten Beobachtungszeit bewies der modifizierte Lake-Verdüner in der Verdünnungsstufe 1:4 in den Standarduntersuchungen zur Spermienqualität die besten Ergebnisse hinsichtlich Spermienbeweglichkeit (59,1 %), -lebendrate (75,3 %) und des Anteils morphologisch unveränderter Spermien (43,38 %) und wurde folglich zur weiteren Evaluierung des Protokolls eingesetzt. Von den verwendeten Kryoprotektiva hatte Glycerin in allen eingesetzten Konzentrationen den signifikant schlechtesten Einfluss auf die Spermienqualität (MOT < 6 %, Lebendrate < 21 %), wohingegen Dimethylacetamid in 8%iger Endkonzentration die besten Ergebnisse hinsichtlich Spermienmotilität (54,1 %) und -viabilität (73 %) aufweisen konnte und daher als Gefrierschutzmittel zur Kryokonservierung im weiteren Versuchsablauf eingesetzt wurde. Bei der Evaluation des Einflusses schneller und langsamer Kühlraten im Einfrierprozess war klar ersichtlich, dass signifikant höhere Überlebens- und Beweglichkeitsraten bei langsamen Einfrierraten unter Zuhilfenahme eines programmierbaren Einfrierautomaten erzielt werden konnten. Schnelle Einfrierraten, inklusive Vitrifikation, führten in allen Fällen zu einem Absinken von Viabilität und Motilität auf Werte nahe 0 %. Der abschließende Fertilisationsversuch demonstrierte, dass die nach Auftauen mittlere Überlebensrate von  $29,8 \pm 14,2$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) bei einer Gesamtbeweglichkeit von  $22,2 \pm 11,3$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) und Vorwärtsbeweglichkeit von  $10,7 \pm 7,9$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) zur erfolgreichen artifiziellen Insemination von weiblichen Nymphensittichen ausreichte. Bei der Verwendung von Tiefgefriersperma konnten Befruchtungsraten von 30,8 % und 18 % erreicht werden. Im Vergleich dazu wurden in der

Kontrollgruppe unter Verwendung von Frischsperma Befruchtungsraten von 92,6 % und 67,7 % erzielt.

Mit dieser Studie wurde erstmalig ein erfolgreiches Protokoll zur Kryokonservierung von Nymphensittichsperma evaluiert. Insgesamt schlüpfen aus 17 befruchteten Eiern der Besamungsversuche mit Tiefgefriersperma 12 Küken. Zudem wurden erstmalig die Einflüsse verschiedener Verdünner, Kryoprotektiva und Einfriermethoden auf die Standardparameter von Papageiensperma untersucht und beschrieben. Ob und inwieweit die Erkenntnisse des anhand von Nymphensittichen entwickelten Einfrierprotokolls auf andere Papageienspezies übertragbar und anwendbar sind, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

## 7. Summary

Aim of the present study was the development of an effective protocol for the cryopreservation of psittacine semen. Cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) were chosen as model animals due to their small size and almost year-round seasonality so that semen can be collected quite reliably through the established massage method. Moreover, basic spermatological data were already available for this species and assisted reproduction techniques have been applied successfully before.

During the preliminary studies, regular semen collections were performed on a group of 30 male cockatiels in order to establish orientation sperm parameter values for the concluding main trial. Especially the pH-value ( $\bar{x} = 7.4$ ) and the osmolality value ( $\bar{x} = 297$  mOsm/kg) of native cockatiel semen were of particular interest for the further course of the study, because three different semen extenders [SV 1 = Diluent after LAKE UND STEWART (1978); SV 2 = Diluent after BLANCO U. A. (2008); SV 3 = Beltsville-Poultry-Semen-Extender after SEXTON (1977)] were specifically adjusted to cockatiel semen physiology and adjusted to mean pH and osmolality values in order to achieve a profound basis for long-term semen preservation. In the first part of the main study, out of 64 individual samples, each of the different semen extenders was evaluated in two different dilutions (1:4 and 1:8) concerning sperm motility, viability and morphology over the investigation period of 120 minutes at five different points in time. In the second part of the study, semen samples diluted with the best semen extender, were added with three different cryoprotective agents (glycerol, dimethylacetamide, dimethyl sulphoxide) in three different concentration (4 %, 8 %, 12 %), respectively, resulting in 96 individual samples, in order to evaluate the one with the least harmful effects on sperm quality.

The next step was the evaluation of the influence of different freezing rates on sperm motility, viability and morphology. Therefore, the cryodiluent mixture with the most promising results was used and semen samples were comparatively frozen using a high cooling rate ( $> 50$  °C/min) and a slow, controlled freezing rate, respectively. During the last step of the main trial, semen samples were again frozen with the most promising combination of semen extender, cryoprotectant and freezing method. Two groups of each 10 female cockatiels were housed with endoscopically vasectomized male partners to

stimulate natural breeding behaviour whilst excluding natural fertilization. In a cross-over fertilization experiment, females of group 1 were artificially inseminated with fresh semen samples as control, while females of group 2 received frozen/thawed semen samples, respectively. During the second insemination experiment, groups were switched to exclude individual influences. Concluding, the fertility rate gave information about the effectiveness of the developed protocol.

After an investigation period of 120 minutes, modified Lake diluent in 1:4 dilution provided best results concerning sperm motility (59.1 %), viability (75.3 %) and the rate of morphologically normal spermatozoa (43.4 %) and was therefore used as the semen extender for the evaluation of the next steps. Of the used cryoprotectants, glycerol in all applied concentrations resulted in the significant worst influence on sperm quality (MOT < 6 %, viability < 21 %), while dimethylacetamide in 8 % final concentration demonstrated best results concerning sperm motility (54.1 %) and –viability (73 %) and was therefore further used. Evaluating high and slow freezing rates, it became clear that significantly higher viability and motility rates were achieved when semen was frozen with the help of a programmable slow-rate freezing device. High freezing rates led to a decrease in sperm viability and motility to levels close to zero. The concluding fertility trial demonstrated that the mean viability rate of  $29.8 \pm 14.2$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) and a total motility of  $22.2 \pm 11.3$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ), with a progressive motility of  $10.7 \pm 7.9$  % ( $\bar{x} \pm SD$ ) were sufficient to achieve successful artificial insemination in female cockatiels. Using frozen/thawed semen fertility rates of 30.8 % and 18 % during the two trials were evaluated. By comparison, fertility rates of 92.6 % and 67.7 % were achieved in the control group using fresh semen samples.

With this study, for the first time an efficient protocol for the cryopreservation of cockatiel spermatozoa has been evaluated. Taken together, 12 chicks hatched and fledged out of 17 fertilized eggs following artificial insemination with frozen/thawed semen. Additionally, the influences of cryoprotective agents, freezing protocols, and thawing methods on semen parameters have been investigated for the first time in psittacine species. However, whether and to what extent a transfer of this protocol to other psittacine species is possible should be evaluated in future studies as species-specific differences in sperm metabolism must be considered.



## 8. Literaturverzeichnis

ABOUELEZZ, F.M.K., CASTAÑO, C., TOLEDANO-DÍAZ, A., ESTESO, M.C., LOPEZ-SEBASTIAN, A., CAMPO, J.L. UND SANTIAGO-MORENO, J. (2015a): Sperm-egg penetration assay assessment of the contraceptive effects of glycerol and egg yolk in rooster sperm diluents. *Theriogenology*, **83**(9), 1541–1547.

ABOUELEZZ, F.M.K., CASTAÑO, C., TOLEDANO-DÍAZ, A., ESTESO, M.C., LÓPEZ-SEBASTIÁN, A., CAMPO, J.L. UND SANTIAGO-MORENO, J. (2015b): Effect of the interaction between cryoprotectant concentration and cryopreservation method on frozen/thawed chicken sperm variables. *Reproduction in Domestic Animals*, **50**(1), 135–141.

AMANN, R.P. UND PICKETT, B.W. (1987): Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Special Review*, **7**(3), 145–173.

ANDERSON, S.J., BIRD, D.M. UND HAGEN, M.D. (2002): Semen characteristics of the quaker parakeet (*Myiopsitta monachus*). *Zoo Biology*, **21**(5), 507–512.

ARAV, A. (1992): Vitrification of oocytes and embryos. In: A. Lauria und F. Gondolfi, Hrsg., *Embryonic development and manipulation in animal production trends in research and applications*. London: Portland Press on behalf of the Biochemical Society, c1992.

ARNDT, T. (1996): *Lexikon der Papageien*. 1. Aufl. Bretten, Germany: Arndt-Verlag.

BACON, L.D., SALTER, D.W., MOTTA, J. V, CRITTENDEN, L.B. UND OGASAWARA, F.X. (1986): Cryopreservation of chicken semen of inbred or specialized strains. *Poultry science*, **65**(10), 1965–1971.

BAILEY, R.E. (1953): Accessory reproductive organs of male fringillid birds: Seasonal variations and response to various sex hormones. *The Anatomical Record*, **115**(1), 1–19.

BAKST, M.R. (1980): Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender. *Journal of reproduction and fertility*, **60**(1), 121–127.

BAKST, M.R. (2011): Physiology and endocrinology symposium: Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. *Journal of Animal Science*, **89**(5), 1323–1329.

BAKST, M.R. UND SEXTON, T.J. (1979): Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. *Journal of Reproduction and Fertility*, **55**, 1–7.

BAKST, M.R., WISHART, G.J. UND BRILLARD, J.P. (1994): Oviductal sperm selection, transport, and storage in poultry. *Poultry Science Reviews*, **5**, 117–143.

BAYYARI, G.R., COOK, J.R., HARRIS, G.C., MACY, L.B., SLAVIK, M.F. UND SKEELES, J.K. (1990): The evaluation of chicken spermatozoa using fluorescent staining in a 96-well format. *Poultry science*, **69**(9), 1602–5.

- BECHSTEDT, U., LOHLE, K. UND SCHRAMM, R. (1974): Untersuchungen zur Verdünnung und Kurzzeitkonservierung von Hahnensperma. Monatshefte für Veterinärmedizin, **30**, 937–940.
- BEHNCKE, H. (2002): Spermagewinnung und –untersuchung sowie endoskopische Beurteilung des Geschlechtsapparats in Abhängigkeit von der Spermaproduktion bei Psittaziden am Beispiel des Wellensittichs (*Melopsittacus undulatus*). *Klinik für Vögel und Reptilien*. Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig. Diss. med. vet.
- BEHNCKE, H. UND STELZER, G. (2003): Semen collection, analysis and first attempt of artificial insemination (AI) in red-tailed cockatoos (*Calyptorhynchus magnificus*). In: Proceedings Conference of the European Association of Avian Veterinarians. S.367–369.
- BELL, D.J. UND LAKE, P.E. (1962): Tissue components of the domestic fowl. 5. Phosphomonoesterases in the seminal plasma of the cock. *Biochemical Journal*, **82**, 277–281.
- BELLAGAMBA, F., CEROLINI, S. UND CAVALCHINI, L.G. (1993): Cryopreservation of poultry semen: a review. *World's Poultry Science Journal*, **49**(2), 157–166.
- BENSON, J.D., WOODS, E.J., WALTERS, E.M. UND CRITSER, J.K. (2012): The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, **78**(8), 1682–99.
- BETZEN, K.M. (1985): Techniques for Electrical Semen Collection from Birds. Oklahoma State University. Thesis.
- BILCIK, B., ESTEVEZ, I. UND RUSSEK-COHEN, E. (2005): Reproductive success of broiler breeders in natural mating systems: The effect of male-male competition, sperm quality, and morphological characteristics. *Poultry science*, **84**(9), 1453–1462.
- BILGILI, S.F. UND RENDEN, J.A. (1984): Fluorometric determination of avian sperm viability and concentration. *Poultry science*, **63**(11), 2275–7.
- BILGILI, S.F., SEXTON, K.J. UND RENDEN, J.A. (1987): Fluorometry of poultry semen: influence of dilution and storage on chicken spermatozoal viability and fertility. *Poultry science*, **66**(12), 2032–5.
- BIRD, D.M. (1982): The american kestrel as a laboratory research animal. *Nature*, **299**, 300–301.
- BIRD, D.M. UND LAGUË, P.C. (1977): Semen production of the American kestrel. *Canadian Journal of Zoology*, **55**(8), 1351–1358.
- BIRD, D.M., LAGUE, P.C. UND BUCKLAND, R.D. (1976): Artificial insemination vs. natural mating in captive American kestrels. *Canadian Journal of Zoology*, **54**, 1183–1191.
- BIRKHEAD, T.R. (1998): Sperm competition in birds. *Reviews of reproduction*, **3**(2), 123–9.

BIRKHEAD, T.R., MARTÍNEZ, J.G., BURKE, T. UND FROMAN, D.P. (1999): Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **266**(1430), 1759–1764.

BIRKHEAD, T.R., PELLATT, E.J., BREKKE, P., YEATES, R. UND CASTILLO-JUAREZ, H. (2005): Genetic effects on sperm design in the zebra finch. *Nature*, **434**(7031), 383–387.

BISHOP, M.W. UND SMILES, J. (1957): Differentiation between living and dead spermatozoa by fluorescence microscopy. *Nature*, **179**(4554), 308.

BLANCO, J., WILDT, D., HOFLE, U., VOELKER, W. UND DONOGHUE, A. (2009): Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. *Theriogenology*, **71**(1), 200–213.

BLANCO, J.M., GEE, G., WILDT, D.E. UND DONOGHUE, A.M. (2000): Species Variation in Osmotic, Cryoprotectant, and Cooling Rate Tolerance. *Biology of Reproduction*, **63**, 1164–1171.

BLANCO, J.M., GEE, G.F., WILDT, D.E. UND DONOGHUE, A.M. (2002a): Producing progeny from endangered birds of prey, urine contamination, intramaginal insemination. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **33**(1), 1–7.

BLANCO, J.M., LONG, J.A., GEE, G., DONOGHUE, A.M. UND WILDT, D.E. (2008): Osmotic tolerance of avian spermatozoa: Influence of time, temperature, cryoprotectant and membrane ion pump function on sperm viability. *Cryobiology*, **56**(1), 8–14.

BLANCO, J.M., LONG, J.A., GEE, G., WILDT, D.E. UND DONOGHUE, A.M. (2011): Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, **123**(3–4), 242–248.

BLANCO, J.M., LONG, J.A., GEE, G., WILDT, D.E. UND DONOGHUE, A.M. (2012): Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Effects of freezing and thawing rates on turkey and sandhill crane sperm cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, **131**(1–2), 1–8.

BLANCO, J.M., WILDT, D.E., MONFORT, S.L., GEE, G. UND DONOGHUE, A.M. (2002b): Developing assisted reproductive technologies to promote ex situ raptor conservation.

BLESBOIS, E., GRASSEAU, I. UND HERMIER, D. (1999): Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2 to 5°C. *Theriogenology*, **52**(2), 325–334.

BLESBOIS, E., GRASSEAU, I., SEIGNEURIN, F., MIGNON-GRASTEAU, S., SAINT JALME, M. UND MIALON-RICHARD, M.M. (2008): Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology*, **69**(2), 252–261.

BOBR, L.W., LORENZ, F.W. UND OGASAWARA, F.X. (1964): Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. I. Residence sites of spermatozoa in fowl oviducts. *Journal of reproduction and fertility*, **8**, 39–47.

- BOGDONOFF, P.D. UND SHAFFNER, C.S. (1954): The Effect of pH on in vitro Survival, Metabolic Activity, and Fertilizing Capacity of Chicken Semen. *Poultry Science*, **33**(4), 665–669.
- BOYD, L.L., BOYD, N.S. UND DOBLER, F.C. (1977): Reproduction of prairie falcons by artificial insemination. *Journal of Wildlife Management*, **41**, 266–271.
- BOYD, L.L. UND SCHWARTZ, C.H. (1983): Training imprinted semen donors. In: J.D. Weaver und T.J. Cade, Hrsg., *Falcon propagation. A manual on captive breeding*. New York: The Peregrine Fund, Inc. Ithaca, S.10.
- BREHM, A.E. (1890): 8. Band. In: E. Pechuel-Loesche, Hrsg., *Brehms Tierleben*, Dritte Auf. Wien: Bibliographisches Institut Leipzig.
- BRERETON, J.L. (1963): The life cycles of three Australian parrots: some comparative and population aspects. *Living Bird*, **2**, 21–29.
- BROCK, M.K. (1991): Semen collection and artificial insemination in the Hispaniolan parrot (*Amazona ventralis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **22**(1), 107–114.
- BUBLAT, A., FISCHER, D., BRUSLUND, S., SCHNEIDER, H., MEINECKE-TILLMANN, S., WEHREND, A. UND LIERZ, M. (2017): Seasonal and genera-specific variations in semen availability and semen characteristics in large parrots. *Theriogenology*, **91**, 82–89.
- BURROWS, W.H. UND MARSDEN, S.J. (1938): Artificial breeding of turkeys. *Poultry Science*, **17**(5), 408–411.
- BURROWS, W.H. UND QUINN, J.P. (1935): A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. *Poultry Science*, **14**(4), 251–254.
- BURROWS, W.H. UND QUINN, J.P. (1937): The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, **16**(1), 19–24.
- CARBONE, D.J., MCMAHON, J.T., LEVIN, H.S., THOMAS, A.J. UND AGARWAL, A. (1998): Role of electron microscopy of sperm in the evaluation of male infertility during the era of assisted reproduction. *Urology*, **52**(2), 301–5.
- CARPENTER, J.W. (2012): *Exotic animal formulary*. Elsevier Health Sciences.
- CEROLINI, S., MALDJIAN, A., PIZZI, F. UND GLIOZZI, T.M. (2001): Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction (Cambridge, England)*, **121**(3), 395–401.
- CHALAH, T. UND BRILLARD, J.P. (1998): Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology*, **50**(3), 487–493.
- CHALAH, T., SEIGNEURIN, F., BLESBOIS, E. UND BRILLARD, J.P. (1999): In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, **39**, 185–191.

- CHAVEIRO, A., MACHADO, L., FRIJTERS, A., ENGEL, B. UND WOELDERS, H. (2006): Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*, **65**(9), 1875–90.
- CHERMS, F.L. (1967): Elemental analysis of turkey semen. *Poultry Science*, **46**(6), 1605–1606.
- CHRISTIDIS, L., SCHODDE, R., SHAW, D.D. UND MAYNES, S.F. (1991): Relationships among the Australo-Papuan Parrots, Lorikeets, and Cockatoos (Aves: Psittaciformes): Protein Evidence. *The Condor*, **93**(2), 302–317.
- COBO, A., KUWAYAMA, M., PÉREZ, S., RUIZ, A., PELLICER, A. UND REMOHÍ, J. (2008): Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertility and Sterility*, **89**(6), 1657–1664.
- COLLAR, N.J. (1997): Family Psittacidae (Parrots). In: J. Del Hoyo, A. Elliott und J. Sargatal, Hrsg., *Handbook of the birds of the world, Vol. 4: Sandgrouse to Cuckoos*. S.280–477.
- CONVERSE, K.A. UND KENNELLY, J.J. (1994): Evaluation of canada goose sterilization for population control. *Wildlife Society Bulletin (1973-2006)*, **22**(2), 265–269.
- COOPER, T.G. UND YEUNG, C.-H. (2003): Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microscopy research and technique*, **61**(1), 28–38.
- CORTEN, P.J.M. (1973): Through method and machination. *Captive breeding of diurnal birds of prey*, **1**(4), 3–5.
- COX, C.R., GOLDSMITH, V.I. UND ENGELHARDT, H.R. (1993): Pair formation in california condors. *American Zoologist*, **33**(2), 126–138.
- CROWE, J.H., CROWE, L.M. UND CHAPMAN, D. (1984): Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science (New York, N.Y.)*, **223**(4637), 701–3.
- CROWE, J.H., HOEKSTRA, F.A., CROWE, L.M., ANCHORDOGUY, T.J. UND DROBNIS, E. (1989): Lipid phase transitions measured in intact cells with fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*, **26**(1), 76–84.
- CURIO, E. (1996): Conservation needs ethology. *Trends in ecology & evolution*, **11**(6), 260–3.
- DAW, A., FARRANT, J. UND MORRIS, G.J. (1973): Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing. *Cryobiology*, **10**(2), 126–33.
- DELHEY, K., PETERS, A. UND KEMPENAERS, B. (2007): Cosmetic coloration in birds: occurrence, function, and evolution. *The American naturalist*, **169 Suppl**, S145-58.

- DELLAVOLPE, A., SCHMIDT, V. UND KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E. (2011): Attempted semen collection using the massage technique in blue-fronted amazon parrots (*Amazona aestiva aestiva*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, **25**(1), 1–7.
- DERRICKSON, S.R. UND SNYDER, N.F.R. (1992): Potentials and limits of captive breeding in parrot conservation. In: S.R. Beissinger, Hrsg., *New World Parrots in Crisis*. Washington and London: Smithsonian, S.133–163.
- DIXON, W.J. (1993): *BMDP Statistical Software Manual*. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press.
- DOEBBLER, G.F. (1966): Cryoprotective compounds: Review and discussion of structure and function. *Cryobiology*, **3**(1), 2–11.
- DOGLIERO, A. (2015): Use of computer-assisted semen analysis for evaluation of Rosy-faced lovebird (*Agapornis roseicollis*) semen collected in different periods of the year. *Theriogenology*, **83**(1), 103–6.
- DONOGHUE, A.M. UND DONOGHUE, D.J. (1997): Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poultry Science*, **76**(10), 1440–1445.
- DONOGHUE, A.M., KIRBY, J.D., FROMAN, D.P., LERNER, S.P., CROUCH, A.N., KING, L.M., DONOGHUE, D.J. UND SONSTEGARD, T.S. (2003): Field testing the influence of sperm competition based on sperm mobility in breeder turkey toms. *British Poultry Science*, **44**(3), 498–504.
- DONOGHUE, A.M. UND WISHART, G.J. (2000): Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, **62**, 213–232.
- DROBNIS, E.Z., CROWE, L.M., BERGER, T., ANCHORDOGUY, T.J., OVERSTREET, J.W. UND CROWE, J.H. (1993): Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *The Journal of experimental zoology*, **265**(4), 432–7.
- DURRANT, B.S. UND BURCH, C. (1991): Successful artificial insemination of cryopreserved pheasant semen. *J Androl*, **16**, 56.
- EHLING, C., TAYLOR, U., BAULAIN, U., WEIGEND, S., HENNING, M. UND RATH, D. (2012): Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines. *Agriculture and Forestry Research*, **3**(62), 151–158.
- EKSTROM, J.M.M., BURKE, T., RANDRIANAINA, L. UND BIRKHEAD, T.R. (2007): Unusual sex roles in a highly promiscuous parrot: the Greater Vasa Parrot *Caracopsis vasa*. *Ibis*, **149**(2), 313–320.
- FAHY, G.M. (1986): The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology*, **23**(1), 1–13.
- FAHY, G.M., MACFARLANE, D.R., ANGELL, C.A. UND MERYMAN, H.T. (1984): Vitrification as an

approach to cryopreservation. *Cryobiology*, **21**(4), 407–426.

FICKEL, J., WAGENER, A. UND LUDWIG, A. (2007): Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *European Journal of Wildlife Research*, **53**(2), 81–89.

FISCHBEIN, A., ZABLUDOVSKY, N., ELTES, F., GRISCHENKO, V. UND BARTOOV, B. (1997): Ultramorphological sperm characteristics in the risk assessment of health effects after radiation exposure among salvage workers in Chernobyl. *Environmental health perspectives*, (Suppl 6), 1445–9.

FISCHER, D., NEUMANN, D., PURCHASE, C., BOUTS, T., MEINECKE-TILLMANN, S., WEHREND, A. UND LIERZ, M. (2014a): The use of semen evaluation and assisted reproduction in Spix's macaws in terms of species conservation. *Zoo Biology*, **33**(3), 234–244.

FISCHER, D., NEUMANN, D., SCHNEIDER, H., GIERSHER, K., BOUTS, T., PURCHASE, C., HEBEL, C., REINSCHMIDT, M., BRUSLUND, S., BUBLAT, A., MEINECKE-TILLMANN, S., WEHREND, A. UND LIERZ, M. (2013a): Assisted reproduction in two rare psittacine species - The Spix's macaw and the St. Vincent amazon. In: J. Chitty u. a., Hrsg., 1st International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine. Wiesbaden, Germany: VVB Laufersweiler Verlag, S.295–296.

FISCHER, D., NEUMANN, D., WEHREND, A. UND LIERZ, M. (2014b): Comparison of conventional and computer-assisted semen analysis in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and evaluation of different insemination dosages for artificial insemination. *Theriogenology*, **82**(4), 613–20.

FISCHER, D., SCHNEIDER, H., FAILING, K., MEINECKE-TILLMANN, S., WEHREND, A. UND LIERZ, M. (2013b): Evaluation of different live-dead staining protocols in semen samples of falcons. In: E. Gerlach, A. Bell, M. Rusch und P. Szczesniak, Hrsg., 6th GGL Conference on Life Sciences. Giessen, Germany: L&W Druck, S.127.

FISCHER, D., SCHNEIDER, H., MATHEWS, S., MEINECKE-TILLMANN, S., DELEHANTY, D. UND LIERZ, M. (2015): Assisted reproduction in Columbian sharp-tailed grouse as part of a species conservation project. In: International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Animal Medicine. Paris.

FORSYTH, J.M. UND COOPER, W.T. (1977): *Parrots of the World*. 2. Aufl. Neptune, N.J, USA: T.F.H. Publications, Inc.

FOX, R.R. UND BURDICK, J.F. (1963): PRESERVATION OF RABBIT SPERMATOZOA: ETHYLENE GLYCOL VS GLYCEROL FOR FROZEN SEMEN. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), **113**, 853–6.

FROMAN, D.P. (2000): Sperm mobility: Phenotype in roosters (*Gallus domesticus*) determined by concentration of motile sperm and straight line velocity. *Biology of Reproduction*, **62**(2), 303–309.

- FROMAN, D.P., FELTMANN, A.J., RHOADS, M.L. UND KIRBY, J.D. (1999): Sperm mobility: a primary determinant of fertility in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biology of reproduction*, **61**(2), 400–405.
- FUNGFUANG, W., SIRIPHOLVAT, V., SA-NGUANPHAN, S. UND PINYOPUMMIN, A. (2009): Effects of extender, cryoprotectant and freezing protocols on post-thaw sperm motility, morphology and viability of three-yellow cocks (*Gallus domesticus*) spermatozoa. *Kasetsart Journal, Natural Sciences*, **43**(2), 269–279.
- GAO, D.Y., LIU, J., LIU, C., MCGANN, L.E., WATSON, P.F., KLEINHANS, F.W., MAZUR, P., CRITSER, E.S. UND CRITSER, J.K. (1995): Andrology: Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*, **10**(5), 1109–1122.
- GARNER, D.L. UND JOHNSON, L.A. (1995): Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. **53**, 276–284.
- GEE, G.F. (1983): Avian artificial insemination and semen preservation. In: IFCB Symposium on breeding birds in captivity. North Hollywood, CA: International Foundation for the Conservation of Birds, S.375–98.
- GEE, G.F. (1995): Artificial insemination and cryopreservation of semen from nondomestic birds. In: M.R. Bakst und G.J. Wishart, Hrsg., First international symposium on the artificial insemination of poultry. Poultry Science Association, S.262–279.
- GEE, G.F., BAKST, M.R. UND SEXTON, T.J. (1985): Cryogenic preservation of semen from the Greater Sanhill Crane. *Journal of Wildlife Management*, **49**(2), 480–484.
- GEE, G.F., MORRELL, C.A., FRANSON, J.C. UND PATTEE, O.H. (1993): Cryopreservation of American kestrel semen with dimethylsulfoxide. *Journal of Raptor Research*, **27**(1), 21–25.
- GEE, G.F. UND SEXTON, T.J. (1990): Cryogenic preservation of semen from the Aleutian Canada goose (*Branta canadensis leucopareia*). *Zoo Biology*, **9**(5), 361–371.
- GEE, G.F. UND TEMPLE, S.A. (1978): Artificial insemination for breeding non-domestic birds. *Symposia of the Zoological Society of London*, **43**, 51–72.
- GIESEN, A.F. UND SEXTON, T.J. (1983): Beltsville-Poultry-Semen-Extender: 7. Comparison of commercial diluents for holding turkey semen six hours at 15 C. *Poultry Science*, **62**(2), 379–381.
- GILL, B.J. (CONVENER), BELL, B.D., CHAMBERS, G.K., MEDWAY, D.G., PALMA, R.L., SCOFIELD, R.P., TENNYSON, A.J.D. UND WORTHY, T.H. (2010): Checklist of the birds of New Zealand, Norfolk and Macquarie Islands and the Ross Dependency Ed. 4. 4. Aufl. Wellington, New Zealand: Te Papa Press.
- GIPPOLITI, S. UND CARPANETO, G.M. (1997): Captive breeding, zoos and good sense. *Conservation Biology*, **11**(3), 806–807.

- GLORIA, A., CONTRI, A., CARLUCCIO, A., PARRILLO, S., CICONI, M. UND ROBBE, D. (2014): The breeding management affects fresh and cryopreserved semen characteristics in *Melospittacus undulatus*. *Animal reproduction science*, **144**(1–2), 48–53.
- GOMENDIO, M. UND ROLDAN, E.R.S. (2008): Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *The International Journal of Developmental Biology*, **52**(5–6), 439–447.
- GRAHAM, J.K., KUNZE, E. UND HAMMERSTEDT, R.H. (1990): Analysis of sperm cell viability acrossosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, **43**, 55–64.
- GRIER, J.W. (1973): Techniques and results of artificial insemination with golden eagles. *Journal of Raptor Research*, **7**(1), 1–12.
- HAMMERSTEDT, R.H. UND GRAHAM, J.K. (1992): Cryopreservation of poultry sperm - The enigma of glycerol's. *Cryobiology*, **29**, 26–38.
- HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K. UND NOLAN, J.P. (1990): Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of andrology*, **11**(1), 73–88.
- HAMMOND, M., BOONE, M.A. UND BARNETT, B.D. (1965): Study of the Glukose, electrolytes, enzymes and nitrogen components of fowl seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility*, **10**(1), 21–28.
- HARRISON, G.J. (1982): First psittacine produced by artificial insemination. *AFA Watchbird*, **9**, 36.
- HARRISON, G.J. UND WASMUND, D. (1983): Preliminary studies of electroejaculation to facilitate manual semen collection in psittacines. In: *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians*. S.207–213.
- HARTLEY, P.S., DAWSON, B., LINDSAY, C., MCCORMICK, P. UND WISHART, G. (1999): Cryopreservation of houbara semen. *Zoo biology*, **18**, 147–152.
- HEIDENREICH, M. (1995): *Greifvögel: Krankheiten, Haltung, Zucht*. Blackwell-Wiss.-Verlag.
- HEIDERICH, E. (2014): Minimalinvasive endoskopisch gestützte Sterilisation männlicher Stadtauben (*Columba livia forma urbana*) als Maßnahme zur Populationsregulierung. *Universitätsbibliothek Giessen*.
- HEITLAND, A. V., JASKO, D.J., SQUIRES, E.L., GRAHAM, J.K., PICKETT, B.W. UND HAMILTON, C. (1996): Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*, **28**(1), 47–53.
- HEMBERGER, M.Y., HOSPES, R. UND BOSTEDT, H. (2001): Semen collection, examination and spermogram in ostriches. *Reproduction in Domestic Animals*, **36**(5), 241–243.

- HERMANN, A.-K. (2014): The artificial insemination of birds using the example of Psittaciformes and Falconiformes. Universität Maastricht; Masterarbeit.
- HOAGLAND, H. UND PINCUS, G. (1942): Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen. *The Journal of General Physiology*, **25**(3), 337–344.
- HOGLUND, J. (1989): Size and plumage dimorphism in lek-breeding birds: A comparative analysis. *The American Naturalist*, **134**(1), 72–87.
- HOLT, W. V. (2000): Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, **62**(1–3), 3–22.
- HOLT, W. V. UND PICKARD, A.R. (1999): Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reviews of Reproduction*, **4**, 143–150.
- HOMBERGER, D.G. (1980): Funktionell-morphologische Untersuchungen zur Radiation der Ernährungs- und Trinkmethoden der Papageien (Psittaci).
- HOWARTH JR., B. (1983): Comparison of diluents for holding cock semen six hours at 41 C. *Poultry Science*, **62**(6), 1084–1087.
- DI IORIO, M. (2015): Cryopreservation of rabbit semen: effectiveness of different permeable and non-permeable cryoprotectants on post-thaw sperm quality and reproductive performances. Università degli studi del Molise, Diss. med. vet.
- ISACHENKO, E., ISACHENKO, V., KATKOV, I.I., DESSOLE, S. UND NAWROTH, F. (2003): Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive biomedicine online*, **6**(2), 191–200.
- ISACHENKO, V., ISACHENKO, E., KATKOV, I.I., MONTAG, M., DESSOLE, S., NAWROTH, F. UND VAN DER VEN, H. (2004): Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biology of reproduction*, **71**(4), 1167–73.
- ISACHENKO, V., ISACHENKO, E., MONTAG, M., ZAEVA, V., KRIVOKHARCHENKO, I., NAWROTH, F., DESSOLE, S., KATKOV, I.I. UND DER VEN, H. VAN (2005): Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online*, **10**(3), 350–354.
- ISHIKAWA, H. (1930): The life duration of cock spermatozoa outside the body. *Proc. World Poult. Fourth Congr*, 90–94.
- IUCN (2016): The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-3.
- IVANOV, E. (1913): Experience sur la fécondation artificielle des oiseaux. *Comptes Rendues Biologies*, **75**, 371–374.
- JACKSON, J.R. (1963): The nesting of keas. *Notornis*, **10**(5), p319-326.

JAMIESON, B.G.M., KOEHLER, L. UND TODD, B.J. (1995): Spermatozoal ultrastructure in three species of parrots. *The Anatomical Record*, **241**, 461–468.

JANUSKAUSKAS, A., GIL, J., SÖDERQUIST, L., HRD, M.G.M., HRD, M.C., JOHANNISSON, A. UND RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1999): Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, **52**(4), 641–658.

JONES, R.G. UND REDIG, P.T. (2003): Endoscopy guided vasectomy in the immature Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). In: E.C. of A. of A. Veterinarians, Hrsg., Conf Europ Assoc Avian Vet. S.117–123.

JOSEPH, L., TOON, A., SCHIRTZINGER, E.E., WRIGHT, T.F. UND SCHODDE, R. (2012): A revised nomenclature and classification for family-group taxa of parrots (Psittaciformes). *Zootaxa*, **3205**(2).

JULL, M. UND QUINN, J.P. (1931): The inheritance of body weight in the domestic fowl. *Journal of Heredity*, **22**(9), 283–294.

KAMAR, G.A. UND RIZIK, M.A. (1972): Semen characteristics of two breeds of turkeys. *Journal of Reproduction and Fertility*, **29**(3), 317–325.

KAVANAGH, J.P. (1985): Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, ztrate and chloride content of human prostatic and seminal fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, **75**(1), 35–41.

KING, A.. (1981): Phallus. In: A.. King und J. McLelland, Hrsg., Form and Function in Birds. London: Academic Press, S.107–148.

KLEINHANS, F.W. (1998): Membrane permeability modeling: Kedem-Katchalsky vs a two-parameter formalism. *Cryobiology*, **37**(4), 271–89.

DE KLOET, R.S. UND DE KLOET, S.R. (2005): The evolution of the spindlin gene in birds: sequence analysis of an intron of the spindlin W and Z gene reveals four major divisions of the Psittaciformes. *Molecular phylogenetics and evolution*, **36**(3), 706–21.

KNOWLES-BROWN, A. UND WISHART, G.J. (2001): Progeny from cryopreserved golden eagle spermatozoa. *Avian Poult. Biol. Rev*, **12**, 201.

KOTLOWSKA, M., DIETRICH, G., WOJTCZAK, M., KAROL, H. UND CIERESZKO, A. (2007): Effects of liquid storage on amidase activity, DNA fragmentation and motility of turkey spermatozoa. *Theriogenology*, **67**(2), 276–286.

LAKE, P.E. (1957a): Fowl semen as collected by the massage method. *The Journal of Agricultural Science*, **49**(1), 120.

LAKE, P.E. (1957b): The male reproductive tract of the fowl. *Journal of Anatomy*, **91**, 116–129.

- LAKE, P.E. (1960): Studies on the dilution and storage of fowl semen. *Reproduction*, **1**(1), 30–35.
- LAKE, P.E. (1986): The History and Future of the Cryopreservation of Avian Germ Plasm. *Poultry Science*, **65**(1), 1–15.
- LAKE, P.E., BUTLER, E.J., MCCALLUM, J.W. UND MACINTYRE, I.J. (1958): A chemical analysis of the seminal and blood plasmas of the cock. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*, **43**(3), 309–313.
- LAKE, P.E., LORENZ, F.W. UND REIMAN, W.D. (1962): Further investigations of the carbohydrate metabolism of cock spermatozoa. *Nature*, **194**(4828), 545–547.
- LAKE, P.E. UND MCINDOE, W.M. (1959): The glutamic acid and creatine content of cock seminal plasma. *The Biochemical journal*, **71**(2), 303–6.
- LAKE, P.E. UND RAVIE, O. (1979): Effect on fertility of storing fowl semen for 24 h at 5 C in fluids of different pH. *Reproduction*, **57**(1), 149–155.
- LAKE, P.E. UND RAVIE, O. (1981): An attempt to improve the fertility of stored fowl semen with certain additives in a basic diluent. *Reproduction Nutrition Développement*, **21**(6B), 1077–1084.
- LAKE, P.E. UND RAVIE, O. (1985): An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *British Poultry Science*, **25**, 145–150.
- LAKE, P.E., RAVIE, O. UND MCADAM, J. (1981): Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: application to breeding programmes. *British poultry science*, **22**(1), 71–7.
- LAKE, P.E., RAVIE, O. UND WADDINGTON, D. (1985): Some effects of the composition of inseminated semen and the site of its deposition on fertility in *Gallus domesticus*. *Animal Reproduction Science*, **9**(3), 273–284.
- LAKE, P.E. UND STEWART, J.M. (1978): Preservation of fowl semen in liquid nitrogen—an improved method. *British Poultry Science*, **19**(2), 187–194.
- LIEBE, W. (1914): Das männliche Begattungsorgan der Hausente. *Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaften*, **51**, 627–630.
- LIERZ, M. (2008): Endoscopy, biopsy and endosurgery. In: J. Chitty und M. Lierz, Hrsg., *BSAVA manual of raptors pigeons and passerine birds*. Gloucester, UK: BSAVA Press.
- LIERZ, M. (2011): Endoskopische Diagnostik. In: M. Pees, Hrsg., *Leitsymptome bei Papageien und Sittichen – Diagnostischer Leitfaden und Therapie*, 2. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, S.285–296.
- LIERZ, M. UND KORBEL, R. (2012): Anesthesia and analgesia in birds. *Journal of Exotic Pet Medicine*, **21**(1), 44–58.

- LIERZ, M., MÜLLER, H., WEHREND, A., REINSCHMIDT, M. UND NEUMANN, D. (2011): Semen collection and artificial insemination in large Psittacine species. In: Proc 11th EAAV Conference and 1st ECZM Meeting. Madrid, Spain, S.219–220.
- LIERZ, M., OBON, E., SCHINK, B., CARBONELL, F. UND HAFEZ, H.M. (2008): The role of mycoplasmas in a conservation project of the lesser kestrel. *Avian Diseases*, **52**, 641–645.
- LIERZ, M., PETRITZ, O.A. UND SAMOUR, J. (2016): Reproduction. In: B. Speer, Hrsg., *Current Therapy in Avian Medicine and Surgery*, 1. Aufl. Elsevier Health Sciences, S.433–460.
- LIERZ, M., REINSCHMIDT, M., MÜLLER, H., WINK, M. UND NEUMANN, D. (2013): A novel method for semen collection and artificial insemination in large parrots (Psittaciformes). *Sci. Rep.*, **3**, 2066.
- LONG, J.A. (2006): Avian semen cryopreservation: What are the biological challenges? *Poultry Science*, **85**, 232–236.
- LONG, J.A. UND KULKARNI, G. (2004): An effective method for improving the fertility of glycerolexposed poultry semen. *Poultry Science*, **83**, 1594–1601.
- LORENZ, F.W. (1959): Reproduction in the domestic fowl: physiology of the male. In: H.H. Cole und P.T. Cupps, Hrsg., *Reproduction in Domestic Animals*. Vol. II. New York: Academic Press, S.343–398.
- LOVAS, E.M., FILIPPICH, L.J. UND JOHNSTON, S.D. (2012): Spermiogenesis in the Australian cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). *Journal of Morphology*, **273**(11), 1291–1305.
- LUKASZEWICZ, E., CHRZANOWSKA, M., JERYSZ, A. UND CHELMONKSA, B. (2004): Attempts on freezing the Greylag (*Anser anser* L.) gander semen. *Animal Reproduction Science*, **80**(1–2), 163–173.
- ŁUKASZEWICZ, E., JERYSZ, A., PARTYKA, A. UND SIUDZIŃSKA, A. (2008): Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. *Research in Veterinary Science*, **85**(3), 583–588.
- LÜPOLD, S., CALHIM, S., IMMLER, S. UND BIRKHEAD, T.R. (2009): Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society*, **276** Nr. **16**, 1157–1181.
- LUYET, B.J. UND HODAPP, E.L. (1938): Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Experimental Biology and Medicine*, **39**(3), 433–434.
- MAEDA, T., TERADA, T. UND TSUTSUMI, Y. (1984): Comparative study of the effects of various cryoprotectants in preserving the morphology of frozen and thawed fowl spermatozoa. *British poultry science*, **25**(4), 547–553.
- MALECKI, I. UND MARTIN, G. (2000): *Emu Farming: Reproductive Technology: a Report for the Rural Industries Research and Development Corporation*. Rural Industries Research & Development Corporation.

- MALECKI, I., MARTIN, G. UND LINDSAY, D. (1997): Semen production by the emu (*Dromaius novaehollandiae*). 1. Methods for collection of semen. *Poultry Science*, **76**(4), 615–621.
- MARVAN, F., ROB, O. UND JANECKOVÁ, E. (1981): Die Klassifikation morphologischer Spermienanomalien bei Gantern. *Zuchthygiene*, **16**, 176–183.
- MAYR, G. (2010): Parrot interrelationships - Morphology and the new molecular phylogenies. *Emu*, **110**(4), 348–357.
- MAYR, G. UND GÖHLICH, U.B. (2004): A new parrot from the miocene of Germany, with comments on the variation of hypotarsus morphology in some Psittaciformes. *Belg. J. Zool*, **134**(1), 47–54.
- MAZUR, P. (1970): Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science*, **168**(3934), 939–949.
- MAZUR, P. (1984): Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American journal of physiology*, **247**(3 Pt 1), C125-42.
- McFARLAND, L.Z., WARNER, R.L., WILSON, W.O. UND MATHER, F.B. (1968): The cloacal gland complex of the Japanese quail. *Experientia*, **24**(9), 941–3.
- MCGANN, L.E. (1978): Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*, **15**(4), 382–390.
- McINTOSH, J.R. UND PORTER, K.R. (1967): Microtubules in the spermatids of the domestic fowl. *The Journal of cell biology*, **35**(1), 153–73.
- MERYMAN, H.T. (1967): The relationship between dehydration and freezing injury in the human erythrocyte. *Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms: proceedings*, **2**, 231–244.
- MERYMAN, H.T. (1971): Cryoprotective agents. *Cryobiology*, **8**(2), 173–183.
- MILLAM, J.R., ROUDYBUSH, T.E. UND GRAU, C.R. (1988): Influence of environmental manipulation and nest-box availability on reproductive success of captive cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). *Zoo Biology*, **7**(1), 25–34.
- MOCÉ, E., GRASSEAU, I. UND BLESBOIS, E. (2010): Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Animal Reproduction Science*, **122**, 359–366.
- MONTGOMERY, R. (2010): Sexual conflict and the intromittent organs of male birds. In: J.L. Leonard und A. Córdoba-Aguilar, Hrsg., *The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals*. Oxford University Press, S.453–471.
- MORETTI, E. UND COLLODEL, G. (2012): Electron microscopy in the study of human sperm pathologies. *translocations*, **33**, 34.

MORRIS, G.J. (1987): Direct chilling injury. In: B.W.W. Grout und G.J. Morris, Hrsg., *The Effects of Low Temperatures on Biological Systems*. London: Edward Arnold, S.120–146.

NAWROTH, F., ISACHENKO, V., DESSOLE, S., RAHIMI, G., FARINA, M., VARGIU, N., MALLMANN, P., DATTENA, M., CAPOBIANCO, G., PETERS, D., ORTH, I. UND ISACHENKO, E. (2002): Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryoletters*, **23**(2), 93–102.

NEUMANN, D., KALETA, E.F. UND LIERZ, M. (2013): Semen collection and artificial insemination in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) - A potential model for psittacines. *Tierärztliche Praxis.Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*, **41**(2), 101–105.

NISHIYAMA, H. (1950): Studies on the physiology of reproduction in the male fowl. I. On the accessory organs of the phallus. *Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, **12**(1), 27–36.

NISHIYAMA, H. (1951): Studies on the physiology of reproduction in the male fowl III. On the addition of transparent fluid to the cock's semen. *Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, **13**, 377–387.

NISHIYAMA, H. (1952): On the hydrogen ion concentration of the transparent semen in the fowl. *Science bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, **12**(3), 277–281.

NISHIYAMA, H. (1955): Studies on the accessory reproductive organs in the cock. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, **10**(3), 277–305.

O'BRIEN, J.K., OEHLER, D.A., MALOWSKI, S.P. UND ROTH, T.L. (1999): Semen collection, characterization, and cryopreservation in Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). *Zoo Biology*, **18**(3), 199–214.

O'BRIEN, J.K. UND ROBECK, T.R. (2014): Semen characterization, seasonality of production, and in vitro sperm quality after chilled storage and cryopreservation in the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *Zoo Biology*, **33**(2), 99–109.

O'CONNELL, M., MCCLURE, N. UND LEWIS, S.E.M. (2002): The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, **17**(3), 704–709.

OZKAVUKCU, S., ERDEMLI, E., ISIK, A., OZTUNA, D. UND KARAHUSEYINOGLU, S. (2008): Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **25**(8), 403–411.

PALMER, M.B. UND HOWARTH, B. (1973): The requirement of a trypsin-like acrosomal enzyme for fertilization in the domestic fowl. *Journal of reproduction and fertility*, **35**(1), 7–11.

PARKER, G.A. (1970): Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*, **45**(4), 525–567.

PARKINSON, T.J. UND WHITFIELD, C.H. (1987): Optimisation of freezing conditions for bovine

spermatozoa. *Theriogenology*, **27**(5), 781–797.

PARKS, J.E., HECK, W.R. UND HARDASWICK, V. (1986): Cryopreservation of peregrine falcon semen and post-thaw dialysis to remove glycerol. *Journal of Raptor Research*, **20**(1), 15–20.

PARKS, J.E. UND LYNCH, D. V. (1992): Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, **29**(2), 255–266.

PARR, M. UND JUNIPER, T. (2010): *Parrots: a guide to parrots of the world*. Bloomsbury Publishing.

PAYNE, L.F. (1914): Preliminary report of vitality and activity of sperm cells and artificial insemination of the chicken. Oklahoma Agricultural and Mechanical College, Agricultural Experiment Station.

PEÑA, A. UND LINDE-FORSBERG, C. (2000): Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, **54**(5), 703–718.

PENFOLD, L., HARNAL, V., LYNCH, W., BIRD, D., DERRICKSON, S. UND WILDT, D. (2001): Characterization of northern pintail (*Anas acuta*) ejaculate and the effect of sperm preservation on fertility. *Reproduction*, **121**(2), 267–275.

PESCH, S. UND BERGMANN, M. (2006): Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, **37**(7), 597–612.

PESCH, S., BERGMANN, M. UND BOSTEDT, H. (2006a): Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology*, **66**(2), 307–313.

PESCH, S., BOSTEDT, H., FAILING, K. UND BERGMANN, M. (2006b): Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. *Animal Reproduction Science*, **91**(3–4), 285–298.

POLGE, C., SMITH, A.U. UND PARKES, A.S. (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **164**(4172), 666.

PONTBRIAND, D., HOWARD, J.G., SCHIEWE, M.C., STUART, L.D. UND WILDT, D.E. (1989): Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, **26**(4), 341–354.

PURDY, P.H., SONG, Y., SILVERSIDES, F.G. UND BLACKBURN, H.D. (2009): Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poultry Science*, **88**(10), 2184–2191.

QUINN, J.P. UND BURROWS, W.H. (1936): Artificial insemination in fowls. *The Journal of*

Heredity, 31–38.

QUINN, P.J. (1985): A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*, **22**(2), 128–146.

QUINN, P.J. UND WHITE, I.G. (1966): The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *Reproduction*, **12**(2), 263–270.

RAE, M.A. (2006): Diagnostic value of necropsy. In: G.J. Harrison und T.L. Lightfoot, Hrsg., *Clinical avian medicine*. Palm Beach, Florida, USA: Spix Publishing Palm Beach FL,, USA, S.661–678.

RALL, W.F. UND FAHY, G.M. (1985): Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature*, **313**(6003), 573–575.

REINSCHMIDT, M. (2007): Untersuchungen zur Brutbiologie des Inkakakadus (*Cacatua leadbeateri*) im Loro Parque, Teneriffa. Justus-Liebig-Universität Gießen. Diss. med. vet.

ROSE, K.A. (1996): Evaluation, liquid storage and cryopreservation of silver pheasant (*Lophura nycthemera*) and Edward's pheasant (*Lophura edwardsi*) semen. University of Guelph.

ROWLEY, I. (1997): Family: Cacatuidae (Cockatoos). In: J. Del Hoyo, A. Elliott und J. Sargatal, Hrsg., *Handbook of the birds of the world, Vol. 4: Sandgrouse to Cuckoos*. Lynx Edicion, S.246–279.

SAEKI, Y. (1960): Crooked-necked spermatozoa in relation to low fertility in the artificial insemination of fowl. *Poultry Science*, **39**(6), 1354–1361.

SAMOUR, J. (1986): Seminal plasma composition in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **84 A**(4), 735–738.

SAMOUR, J., SMITH, C., MOORE, H. UND MARKHAM, J. (1986): Semen collection and spermatozoa characteristics in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary Record*, **118**(14), 397–399.

SAMOUR, J.H. (2002): The Reproductive Biology of the Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*): Semen Preservation Techniques and Artificial Insemination Procedures. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, **16**(1), 39–49.

SAMOUR, J.H., MARKHAM, J.A., MOORE, H.D.M. UND WATSON, P.F. (1988): Semen cryopreservation and artificial insemination in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Journal of Zoology*, **216**(1), 169–176.

SANTIAGO-MORENO, J., CASTANO, C., TOLEDANO-DIAZ, A., COLOMA, M.A., LOPEZ-SEBASTIAN, A., PRIETO, M.T. UND CAMPO, J.L. (2011): Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time. *Poultry Science*, **90**(9), 2047–2053.

- SARAGUSTY, J. UND ARAV, A. (2011): Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, **141**(1), 1–19.
- SASAKI, K., TATSUMI, T., TSUTSUI, M., NIINOMI, T., IMAI, T., NAITO, M., TAJIMA, A. UND NISHI, Y. (2010): A method for cryopreserving semen from Yakido roosters using N-methylacetamide as a cryoprotective agent. *Japan Poultry Science Association*, **47**, 297–301.
- SASANAMI, T., MATSUZAKI, M., MIZUSHIMA, S. UND HIYAMA, G. (2013): Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *The Journal of reproduction and development*, **59**(4), 334–8.
- SCHMIDT, R.E., REAVILL, D.R. UND PHALEN, D.N. (2008): Reproductive System. In: *Pathology of Pet and Aviary Birds*. Iowa State Press, S.109–120.
- SCHÖNE, R. UND ARNOLD, P. (1985): *Australische Sittiche*. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag.
- SCHRAMM, G.-P. (2005): Künstliche Besamung beim Geflügel. *Züchtungskunde*, **77**(2/3), 206–217.
- SCHRAMM, G.P. UND LÖHLE, K. (1984): Verdünnung und Flüssigkonservierung des Spermas – eine Möglichkeit zur Erhöhung der Effektivität der Zuchtarbeit und Rationalisierung der künstlichen Besamung beim Geflügel. *Monatshefte für Veterinärmedizin*, **40**, 135–138.
- SCHWEIZER, M., SEEHAUSEN, O., GÜNTERT, M. UND HERTWIG, S.T. (2010): The evolutionary diversification of parrots supports a taxon pulse model with multiple trans-oceanic dispersal events and local radiations. *Molecular phylogenetics and evolution*, **54**(3), 984–94.
- SEIBERT, L.M. UND CROWELL-DAVIS, S.L. (2001): Gender effects on aggression, dominance rank, and affiliative behaviors in a flock of captive adult cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). *Applied Animal Behaviour Science*, **71**(2), 155–170.
- SEREBTOVSKII, A.S. UND SOKOLOVAKAJA, I.I. (1934): Electro ejaculation in birds. *Animal Breeding Abstracts, Edinburgh*.
- SEXTON, T.J. (1973): Effect of various cryoprotective agents on the viability and reproductive efficiency of chicken spermatozoa. *Poultry Science*, **52**(4), 1353–1357.
- SEXTON, T.J. (1975): Relationship of the method of addition and temperature of cryoprotective agents to the fertilizing capacity of cooled chicken spermatozoa. *Poultry science*, **54**(3), 845–8.
- SEXTON, T.J. (1977): A new poultry semen extender. 1. Effects of extension on the fertility of chicken semen. *Poultry science*, **56**(5), 1443–1446.
- SEXTON, T.J. (1978a): A new poultry semen extender 3. Effect of storage conditions on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5 degrees C. *Poultry science*, **57**(1), 285–

289.

SEXTON, T.J. (1978b): Viability of frozen chicken semen cooled at various rates to  $-20^{\circ}\text{C}$  in glass ampoules and plastic straws. In: 16th Congress of the World's Poultry Science Association. S.205–213.

SEXTON, T.J. (1980): Optimal rates for cooling chicken semen from  $+5$  to  $-196^{\circ}\text{C}$ . Poultry Science, **59**(12), 2765–2770.

SEXTON, T.J. (1988): Influence of seminal plasma on the fecundity of chicken spermatozoa. Theriogenology, **30**(4), 711–720.

SEXTON, T.J. UND FEWLASS, T.A. (1978): A new poultry semen extender 2. Effect of the diluent components on the fertilizing capacity of chicken semen stored at  $5^{\circ}\text{C}$ . Poultry science, **57**(1), 277–84.

SHIELDS, K.M., YAMAMOTO, J.T. UND MILLAM, J.R. (1989): Reproductive behavior and LH levels of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) associated with photostimulation, nest-box presentation, and degree of mate access. Hormones and Behavior, **23**(1), 68–82.

SIUDZINSKA, A. UND LUKASZEWICZ, E. (2008): Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. The Journal of Applied Poultry Research, **17**(1), 101–108.

SMITH, A.U. UND POLGE, C. (1950): Survival of spermatozoa at low temperatures. Nature, **166**(4225), 668–669.

SMITH, G.A. (1978): The encyclopedia of cockatiels. Tfh Publications Incorporated.

SNYDER, N.F.R., DERRICKSON, S.R., BEISSINGER, S.R., WILEY, J.W., SMITH, T.B., TOONE, W.D. UND MILLER, B. (1996): Limitations of captive breeding in endangered species recovery. Conservation Biology, **10**(2), 338–348.

SÖDERQUIST, L. UND LARSSON, K. (1985): Relationship between ATP content and post thaw motility in bull semen. Acta veterinaria Scandinavica, **26**(3), 308–12.

SÖDERQUIST, L., MADRID-BURY, N. UND RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1997): Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. Theriogenology, **48**(7), 1115–25.

SONTAKKE, S.D., UMAPATHY, G., SIVARAM, V., KHOLKUTE, S.D. UND SHIVAJI, S. (2004): Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial insemination in the Blue rock pigeon (*Columba livia*). Theriogenology, **62**(1–2), 139–153.

SOOD, S., MALECKI, I.A., TAWANG, A. UND MARTIN, G.B. (2012): Survival of emu (*Dromaius novaehollandiae*) sperm preserved at subzero temperatures and different cryoprotectant concentrations. Theriogenology, **78**(7), 1557–1569.

- SPOON, T.R., MILLAM, J.R. UND OWINGS, D.H. (2006): The importance of mate behavioural compatibility in parenting and reproductive success by cockatiels, *Nymphicus hollandicus*. *Animal Behaviour*, **71**(2), 315–326.
- STELZER, G. (2004): Spermagewinnung, -untersuchung und -flüssigkonservierung bei verschiedenen Papageienvögeln (Psittaciformes). Klinik für Vögel und Reptilien, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig. Diss. med. vet.
- STIEVE, H. (1918): Über experimentell, durch veränderte äußere Bedingungen hervorgerufene Rückbildungsvorgänge am Eierstock des Haushuhnes (*Gallus domesticus*). *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, **44**(3–4), 530–588.
- STUNDEN, C., BLUHM, C., CHENG, K. UND RAJAMAHENDRAN, R. (1998): Plasma testosterone profiles, semen characteristics, and artificial insemination in yearling and adult captive Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Poultry Science*, **77**(6), 882–887.
- TABATABAEI, S., BATAVANI, R.A. UND TALEBI, A.R. (2009): Comparison of semen quality in indigenous and Ross broiler breeder roosters. *J Anim Vet Adv*, **8**(1), 90–93.
- TAJIMA, A., GRAHAM, E.F., SHOFFNER, R.N., OTIS, J.S. UND HAWKINS, D.M. (1990): Research note: cryopreservation of semen from unique lines of chicken germ plasm. *Poultry science*, **69**(6), 999–1002.
- TAYLOR, M. (1994): Endoscopic examination and biopsy techniques. In: B.W. Ritchie, G.J. Harrison und L.R. Harrison, Hrsg., *Avian Medicine: Principles and Application*. Lake Worth, Florida: Wingers Publishing, S.327–354.
- TEMPLE, S.A. (1972): Artificial insemination with imprinted birds of prey. *Nature*, **237**(5353), 287–288.
- THIBIER, M. UND WAGNER, H.-G. (2001): World statistics for artificial insemination in cattle. *Livestock Production Science*, **74**, 203–212.
- THOMPSON, D.R. (1988): Cockatiel Mutations. *AFA Watchbird*, **15**(5), 6–9.
- TILMAN, D., MAY, R.M., LEHMAN, C.L. UND NOWAK, M.A. (1994): Habitat destruction and the extinction debt. *Letters to nature*, **371**, 65–66.
- TOKITA, M., KIYOSHI, T. UND ARMSTRONG, K.N. (2007): Evolution of craniofacial novelty in parrots through developmental modularity and heterochrony. *Evolution & development*, **9**(6), 590–601.
- TRAVERS, M., CLINCHY, M., ZANETTE, L., BOONSTRA, R. UND WILLIAMS, T.D. (2010): Indirect predator effects on clutch size and the cost of egg production. *Ecology Letters*, **13**(8), 980–988.
- TSELUTIN, K., NARUBINA, L., MAVRODINA, T. UND TUR, B. (1995): Cryopreservation of poultry semen. *British Poultry Science*, **36**(5), 805–811.

- TSELUTIN, K., SEIGNEURIN, F. UND BLESBOIS, E. (1999): Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Science*, **78**(4), 586–90.
- UMAPATHY, G., SONTAKKE, S., REDDY, A., AHMED, S. UND SHIVAJI, S. (2005): Semen characteristics of the captive Indian white-backed vulture (*Gyps bengalensis*). *Biology of Reproduction*, **73**(5), 1039–1045.
- VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M., BOOTH, P.J., JACOBSEN, H., GREVE, T. UND CALLESEN, H. (1998): Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*, **51**(1), 53–58.
- VERMA, O.P. UND CHERMS, F.L. (1965): The appearance of sperm and their persistency in storage tubules of turkey hens after a single insemination. *Poultry science*, **44**, 609–13.
- VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M. UND ONCLIN, K. (2002): Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. In: *Theriogenology*. S.149–179.
- VOLLMERSHAUS, B. UND SINOWATZ, F. (2004): Verdauungsapparat. In: R. Nickel, A. Schummer und E. Seiferle, Hrsg., *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Band V. Anatomie der Vögel, 3. Aufl. Stuttgart: Parey Verlag, S.176–224.
- WABERSKI, D. UND PETRUNKINA, A.M. (2007): Spermatologie. In: W. Busch und D. Waberski, Hrsg., *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren*. Stuttgart: Schattauer GmbH, Stuttgart, S.99–118.
- WADDELL, B.J., HISHEH, S., DHARMARAJAN, A.M. UND BURTON, P.J. (2000): Apoptosis in rat placenta is zone-dependent and stimulated by glucocorticoids. *Biology of Reproduction*, **63**(6), 1913–1917.
- WAIBL, H. UND SINOWATZ, F. (2004): Harn- und Geschlechtsapparat. In: R. Nickel, A. Schummer und E. Seiferle, Hrsg., *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Band V. Anatomie der Vögel, 3. Aufl. Stuttgart: Parey Verlag, S.224–261.
- WALES, R.G. UND WHITE, I.G. (1958): The Interaction of Ph, Tonicity, and Electrolyte Concentration on the Motility of Fowl Spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*, **11**(2), 177–186.
- VAN WAMBEKE, F. (1967): Storage of fowl semen: 1. Preliminary results with new extenders. *J. Reprod. Fertil*, **13**, 571–575.
- VAN WAMBEKE, F. (1972): Fertility and hatchability results with fowl spermatozoa stored in fresh and freeze-dried diluent. *British poultry science*, **13**(2), 179–183.
- WATANABE, M. (1957): An improved technique of the artificial insemination in ducks. *J. Fac. Fish Anim. Husbandry*, **1**, 363–370.
- WATERHOUSE, D.M., LINDOW, B.E.K., ZELENKOV, N. V. UND DYKE, G.J. (2008): Two new parrots (Psittaciformes) from the lower eocene fur formation of Denmark. *Palaeontology*, **51**(3),

575–582.

WATSON, P.F. (1995): Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility, and Development*, **7**(4), 871–891.

WATSON, P.F. (2000): The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, **60**, 481–492.

WATSON, P.F. UND PLUMMER, J.M. (ROYAL V.C.. L. (UK). D. OF P. (1985): The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: 1. International Conference on Deep Freezing of Boar Semen, Uppsala (Sweden), 25-27 Aug 1985. Sveriges Lantbruksuniv.

WATSON, P.F., PLUMMER, J.M. UND ALLEN, W.E. (1987): Quantitative assessment of membrane damage in cold-shocked spermatozoa of stallions. *J. Reprod. Fertil*, **35**, 651–653.

WATSON, R., DEB, A. UND HAMMER, S. (2007): Managing the world's largest population of Spix's macaws (*Cyanopsitta spixii*). In: Proceedings of the 33rd Annual Conference of the American Federation of Aviculture. LA, USA. S.118–132.

WAY, A.L., HENAULT, M.A. UND KILLIAN, G.J. (1995): Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology*, **43**(8), 1301–1316.

WEITZE, K.-F. (2001): Prinzipien der andrologischen Untersuchung und Spermatologische Untersuchung. In: W. Busch und A. Holzmann, Hrsg., *Veterinärmedizinische Andrologie*. Stuttgart: Schattauer GmbH.

WHIRLEDGE, S. UND CIDLOWSKI, J.A. (2010): Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva endocrinologica*, **35**(2), 109–25.

WHO (2010): WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th Aufl. Geneva, Switzerland: World Health Organization Press.

WILDT, D.E., RALL, W.F., CRITSER, J.K., MONFORT, S.L. UND SEAL, U.S. (1997): Genome resource banks - Living collections for biodiversity conservation. *Bioscience*, **47**(10).

WILKINSON, R. UND BIRKHEAD, T.R. (2008): Copulation behaviour in the Vasa parrots *Coracopsis vasa* and *C. nigra*. *Ibis*, **137**(1), 117–119.

WILLIAMS, T.D. (2005): Mechanisms underlying the costs of egg production. *BioScience*, **55**(1), 39.

WISHART, G.J. (1995): Cryopreservation of avian spermatozoa. *Methods in molecular biology - Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, **38**(17), 167–77.

WRIGHT, T.F., SCHIRTZINGER, E.E., MATSUMOTO, T., EBERHARD, J.R., GRAVES, G.R., SANCHEZ, J.J., CAPELLI, S., MÜLLER, H., SCHARPEGGE, J., CHAMBERS, G.K. UND FLEISCHER, R.C. (2008): A multilocus

molecular phylogeny of the parrots (Psittaciformes): support for a Gondwanan origin during the cretaceous. *Molecular biology and evolution*, **25**(10), 2141–56.

YAMAMOTO, J.T., SHIELDS, K.M., MILLAM, J.R., ROUDYBUSH, T.E. UND GRAU, C.R. (1989): Reproductive activity of force-paired cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). *The Auk*, **106**(1), 86–93.

YEUNG, C.H. (2003): Human sperm volume regulation. Response to physiological changes in osmolality, channel blockers and potential sperm osmolytes. *Human Reproduction*, **18**(5), 1029–1036.

ZINAMAN, M.J., BROWN, C.C., SELEVAN, S.G. UND CLEGG, E.D. (2000): Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *Journal of andrology*, **21**(1), 145–53.

ZIRKLER, H. (2005): Kryokonservierung von Hengstsperma. *Klinik für Pferde*. Tierärztliche Hochschule Hannover. Diss. med. vet.



# 9. Anhang

## 9.1 Protokolle

### 9.1.1 Protokoll zur Spermaentnahme

**Spermatologische Untersuchung der Einzelproben**

Vollere: \_\_\_\_\_ Probennummer: \_\_\_\_\_ Weiter/Temperatur: \_\_\_\_\_ Datum: \_\_\_\_\_ Uhrzeit: \_\_\_\_\_

Hahn Nr.	Farbring	AB	BCS	Volumen [µl]	Farbe	Beimengungen	Konsistenz	Spermienanzahl	Bew./Mot.	Verteilung	FLG	Dichte [n/µl]	pH
1	Blau 1												
2	Blau 2												
3	Blau 3												
4	Blau 4												
5	Blau 5												
6	Blau 6												
7	Blau 7												
8	Blau 8												
9	Blau 9												
10	Blau 10												

Bemerkungen: \_\_\_\_\_

AB: Allgemeinbefinden - reduziert (+) mäßig + gut ++ sehr gut	BCS: Body Condition Score von 1 (schlecht) bis 5 (sehr gut)	Farbe klar, gräulich; weißlich; elfenbein; strohfarben; gelblich; orange; rötlich; bräunlich	Beimengungen E Erythrozyten U Urat K Kot	Konsistenz wässrig, molkig, milchig sahnig, rahmig
	Spermienanzahl 0 (< 20) bis 5 (nicht zählbar)	Bewegung/Motilität 0 bis 4	Verteilung ges ab.	Verteilung ges ab.







## 9.1.5 Protokoll zur artifiziiellen Insemination

Gruppe 1							
Artifiziielle Insemination mit							
O Frischsperma				O TG-Sperma			
Henne Nr.	Art	Ringnummer	Geschlecht	Datum der Insemination	Art der Insemination	Bemerkungen	
53	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2041 885	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
54	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2041 921	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
55	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2041 923	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
58	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2041 907	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
60	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 1973 716	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
62	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2050 467	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
64	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2041 877	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
65	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2021 705	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
67	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2050 484	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
68	<i>Nymphicus hollandicus</i>	AZ 48189 P09 028	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		

Gruppe 2							
Artifiziielle Insemination mit							
O Frischsperma				O TG-Sperma			
Henne Nr.	Art	Ringnummer	Geschlecht	Datum der Insemination	Art der Insemination	Bemerkungen	
69	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2050 507	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
61	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2041 927	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
59	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2021 733	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
63	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2050 465	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
71	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 1937 977	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
56	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2021 669	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
70	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2021 699	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
52	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2021 725	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		
66	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Z III 2050 509	0,1		O intravaginal Vol [jul] _____ O intrakloakal Vol [jul] _____		

## 9.1.6 Protokoll Nistkastenkontrolle

Nestkontrolle Gruppe 1						
Nistkasten Nr.	Datum	Ei Nr.	Embryologisches Wachstum			
			Schieren		Egg Buddy	
1			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
2			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
26			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
10			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
12			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
13			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
14			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
15			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
16			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein

Nestkontrolle Gruppe 2						
Nistkasten Nr.	Datum	Ei Nr.	Embryologisches Wachstum			
			Schieren		Egg Buddy	
3			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
4			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
5			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
6			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
24			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
7			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
8			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
29			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
9			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
10			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein
11			<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja	<input type="radio"/> nein

### 9.1.7 Protokoll zur morphologischen Auswertung

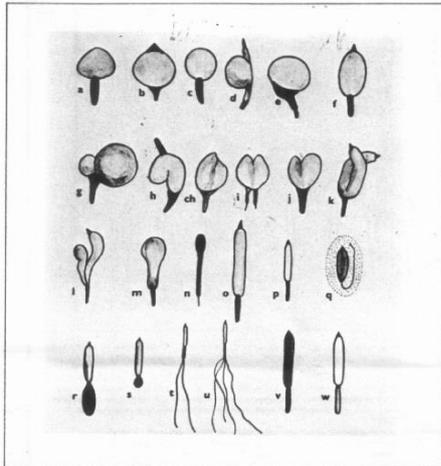
**Pathomorphologie**

Probennummer: \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_

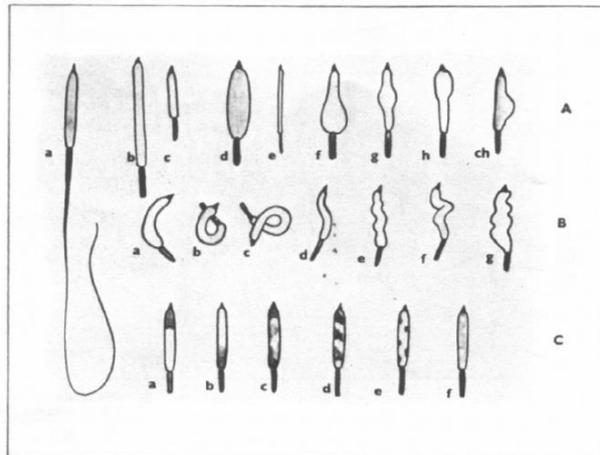
<b>Kopf</b>		<b>Akrosom</b>	
Riesenkopf		unentwickelt/abgelöst	
zu lang		rudimentär	
zu breit		langgestreckt	
proximal erweitert (Keule)		zugespitzt	
mittig erweitert (Spindel)		knopfförmig	
basal erweitert (Birne)		stecknadelförmig	
asymmetrisch		<b>Verbindungsstück</b>	
Zwergkopf		verdickt	
zu kurz		lokal erweitert	
zu dünn		seitlich angesetzt	
Diploidkopf		verkürzt	
Kopf abgelöst		verlängert	
geknickt/gebogen		unterbrochen	
ringförmig		geknickt/keilförmig	
S-förmig		korkenzieherförmig	
korkenzieherförmig		doppelt	
unregelmäßig gekrümmt		<b>Schwanz</b>	
kugelförmig		verlängert	
oval		verkürzt/abgebrochen	
aufgequollen (faltig)		verdickt	
		schräg angesetzt	
<b>Normale</b>		Retroversion der Geißel	
		knäulchenförmig	
		schleifenförmig	
<b>Mehrfachveränderung</b>		spiralförmig/aufgerollt	
		terminale Schleife	
		Plasmatropfen	
		doppelte Geißel	
		Mehrfachgeißeln	

9.1.8 Spermienmorphologie aus MARVAN U. A. (1981)

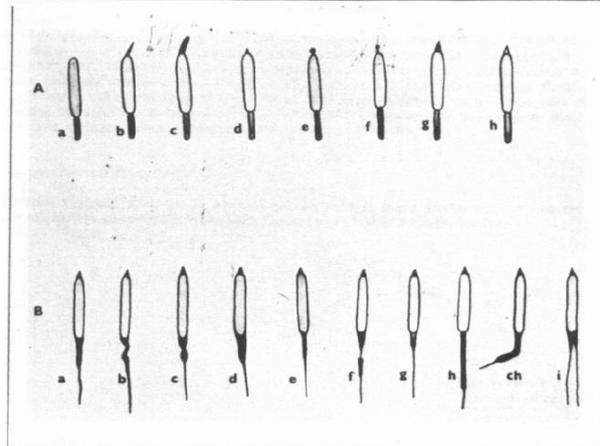


- a kugelförmiger Kopf
- b kugelförmiger Kopf
- c kugelförmiger Kopf
- d kugelförmiger Kopf
- e kugelförmiger Kopf
- f ovalförmiger Kopf
- g asymmetrischer Diploidkopf
- h asymmetrischer Diploidkopf
- ch asymmetrischer Diploidkopf
- i asymmetrischer Diploidkopf
- k asymmetrischer Diploidkopf
- l asymmetrischer Diploidkopf
- m keulenförmiger Kopf
- n unentwickeltes Spermium
- o riesiges Spermium
- p kleines Spermium
- q unreifes Spermium
- r Teratoidentwicklung der Geißel
- s Teratoidentwicklung der Geißel
- t verdoppelte Geißel
- u Spermium mit mehreren Geißeln
- v erhöhte Tinktion des Kopfes
- w verminderte Tinktion des Kopfes

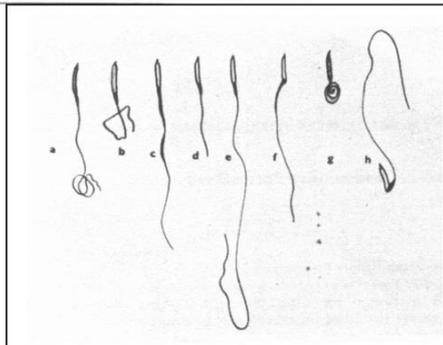
**I) Teratoidformen**



- II) Kopfanomalien**
- A Größenunterschiede
    - a normaler Kopf
    - b langer Kopf
    - c kurzer Kopf
    - d breiter Kopf
    - e schmaler Kopf
    - f basal erweiterter Kopf
    - g spindelartig erweiterter Kopf
    - h proximal erweiterter Kopf
    - ch asymmetrischer Kopf
  - B Gestaltunterschiede
    - a gebogener Kopf
    - b kipfförmiger Kopf
    - c ringförmig zusammengestellter K.
    - d S-förmiger Kopf
    - e stöpselzieherförmiger K.
    - f unregelmäßig gekrümmter K.
    - g aufgequollener (faltiger) Kopf
  - C Änderung innerer Strukturen
    - a unregelmäßige Tinktion proximal
    - b unregelmäßige Tinktion distal
    - c unregelmäßige Tinktion
    - d streifenweise gefärbter K.
    - e Granulation
    - f Vakuolisierung



- III) Akrosom-/Verbindungsstückanomalien**
- A Anomalien des Akrosoms
    - a unentwickeltes Akrosom
    - b zugespitztes Akrosom
    - c langgestrecktes Akrosom
    - d rudimentäres Akrosom
    - e knopfförmiges Akrosom
    - f stechnadelförmiges Akrosom
    - g vakuolisiertes Akrosom
    - h Akrosom mit verm. Färbbarkeit
  - B Verbindungsstückanomalien
    - a unregelmäßig erweitertes V.
    - b stöpselzieherförmiges V.
    - c erweitertes Verbindungsstück
    - d verdicktes Verbindungsstück
    - e verengtes Verbindungsstück
    - f unterbrochenes Verbindungsstück
    - g verkürztes Verbindungsstück
    - h verlängertes Verbindungsstück
    - ch keilförmiges Verbindungsstück
    - i verdoppeltes Verbindungsstück



- IV) Schwanzanomalien**
- a knäuelchenförmige Geißel
  - b schleifenförmige Geißel
  - c verdickte Geißel
  - d verkürzte Geißel
  - e verlängerte Geißel
  - f schräg angesetzte Geißel
  - g spiralförmige Geißel
  - h Retroversion der Geißel

## 9.2 Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse

### 9.2.1 Evaluierung der Verdüner

Tabelle 7: Resultierende p-Werte der dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Verdüner, Verdünnungsstufe und Zeit, evaluiert anhand von Nymphensittichsperma. Dargestellt: Globaler Vergleich

Variable	Haupteffekte (p-Wert)			Zweifachwechselwirkungen (p-Wert)			Dreifachwechselwirkungen (p-Wert)
	SV	C <sub>sv</sub>	t	SV x C <sub>sv</sub>	SV x t	C <sub>sv</sub> x t	SV x C <sub>sv</sub> x t
MOT	< 0,0001	0,0803	< 0,0001	0,6429	0,5114	0,1303	0,5630
PMOT	< 0,0001	0,0072	< 0,0001	0,3166	0,4152	0,1558	0,8506
Viabilität	< 0,0001	0,8077	< 0,0001	0,8961	0,5662	0,0884	0,4643
Normal	< 0,0001	0,0651	0,0003	0,0610	0,2421	0,4525	0,1540
Morphologie	Akrosom	0,2514	0,1114	0,8845	0,8892	0,6415	0,9614
	Kopf	0,0017	0,3772	0,0216	0,5464	0,9238	0,9816
	VB	0,2062	0,3276	0,4114	0,0312	0,7616	0,4649
	Schwanz	0,1044	0,2270	0,0021	0,4406	0,1195	0,1709
	Multipel	0,0648	0,7190	0,8837	0,7190	0,4524	0,9833

Spermaverdünner (SV); Verdünnungsstufe Spermaverdünner (C<sub>sv</sub>); Zeit (t); Wechselwirkung (x); Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT); Verbindungsstück (VB)

### 9.2.2 Evaluierung der Kryoprotektiva

Tabelle 8: Resultierende p-Werte der dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Kryoprotektivum, Konzentration und Zeit, evaluiert anhand von Nymphensittichsperma. Dargestellt: Globaler Vergleich

Variable	Haupteffekte (p-Wert)			Zweifachwechselwirkungen (p-Wert)			Dreifachwechsel- wirkungen (p-Wert)
	K	Ck	t	K x Ck	K x t	Ck x t	K x Ck x t
MOT	< 0,0001	0,0020	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	0,5322	0,9791
PMOT	< 0,0001	0,0009	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,8863	0,9947
Viabilität	< 0,0001	0,0034	< 0,0001	0,0003	< 0,0001	0,5468	0,7831
Normal	< 0,0001	0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,1201	0,6652	0,3872
Akrosom	0,5185	0,6302	0,0042	0,0131	0,2286	0,3334	0,8460
Kopf	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,3085	0,8411	0,3144
VB	0,0095	0,0335	0,2059	0,9451	0,1498	0,9788	0,7857
Schwanz	< 0,0001	0,0029	0,0026	< 0,0001	0,8694	0,9071	0,8886
Multipel	< 0,0001	0,0665	< 0,0001	< 0,0001	0,3458	0,9429	0,8667

Spermaverdünner (SV); Verdünnungsstufe Spermaverdünner ( $C_{SV}$ ); Zeit (t); Wechselwirkung (x); Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT); Verbindungsstück (VB)

## 9.3 Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse

### 9.3.1 Evaluierung der Verdüner

Tabelle 9: Resultierende p-Werte einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Verdüner und Zeit, evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Variable	Haupteffekte (p-Wert)		Zweifachwechselwirkung (p-wert)
	SV	t	SV x t
MOT	0,0002	<0,0001	0,5030
PMOT	<0,0001	<0,0001	0,8536
Viabilität	0,0005	<0,0001	0,4005
Morphologie	Normal	<0,0001	0,3173
	Akrosom	0,4102	0,9274
	Kopf	0,0214	0,0036
	VB	0,0956	0,6613
	Schwanz	0,2247	0,0008
Multipel	0,1430	0,5960	0,6990

Spermaverdünner (SV); Zeit (t); Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT), Verbindungsstück (VB)

**Tabelle 10:** Resultierende p-Werte einer zweifaktoriellen Varianzanalyse des paarweisen Vergleichs der Spermaverdünner mit 1%iger Glukoselösung, evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Variable	p-Werte					
	SE 1 (1:4)	SE 1 (1:8)	SE 2 (1:4)	SE 2 (1:8)	SE 3 (1:4)	SE 3 (1:8)
<b>MOT</b>	0,0014	0,0529	0,7287	0,3487	0,1206	0,2651
<b>PMOT</b>	< 0,0001	0,0073	0,9476	0,4185	0,0129	0,1252
<b>Viabilität</b>	0,0028	0,0045	0,8983	0,9707	0,1725	0,3086

Resultierende p-Werte einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Verdüner und Zeit

### 9.3.2 Evaluierung der Kryoprotektiva

Tabelle 11: Resultierende p-Werte einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Konzentration und Zeit, evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Variable	DMA			DMSO			Glyzerin		
	Haupteffekte (p-Wert)		Zweifachwechselwirkung (p-wert)	Haupteffekte (p-Wert)		Zweifachwechselwirkung (p-wert)	Haupteffekte (p-Wert)		Zweifachwechselwirkung (p-wert)
	C <sub>k</sub>	t	C <sub>k</sub> x t	C <sub>k</sub>	t	C <sub>k</sub> x t	C <sub>k</sub>	t	C <sub>k</sub> x t
<b>MOT</b>	0,0020	< 0,0001	0,0107	0,0051	< 0,0001	0,9750	0,0027	< 0,0001	< 0,0001
<b>PMOT</b>	0,0007	< 0,0001	0,0085	0,0070	< 0,0001	0,7148	0,0226	< 0,0001	0,0003
<b>Viabilität</b>	0,0025	< 0,0001	0,0012	0,2236	< 0,0001	0,5994	0,0050	< 0,0001	0,8824
<b>Normal</b>	0,0023	< 0,0001	0,1100	0,1465	< 0,0001	0,0653	< 0,0001	< 0,0001	0,8151
<b>Akrosom</b>	0,4745	0,0199	0,5144	0,0562	0,0389	0,4996	0,0522	0,7327	0,6695
<b>Kopf</b>	< 0,0001	< 0,0001	0,1045	< 0,0001	< 0,0001	0,5985	0,0144	< 0,0001	0,3464
<b>VB</b>	0,8950	0,4172	0,6890	0,3285	0,0119	0,5287	0,7583	0,1884	0,7765
<b>Schwanz</b>	0,0002	0,0068	0,4326	0,3842	0,0025	0,6348	0,6933	< 0,0001	0,1341
<b>Multipel</b>	0,0026	0,0010	0,5325	0,2734	0,0157	0,8848	0,0333	< 0,0001	0,3678

Konzentration Kryoprotektivum (C<sub>k</sub>); Zeit (t); Wechselwirkung (x); Verbindungsstück (VB)

### 9.3.3 Evaluierung der Kühlrate

Tabelle 12: Resultierende p-Werte einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich Zeit, evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Variable	Haupteffekte (p-Wert)		Zweifachwechselwirkung (p-wert)
	Methode	t	Methode x t
<b>MOT</b>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<b>PMOT</b>	0,0027	< 0,0001	< 0,0001
<b>Viabilität</b>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<b>Normal</b>	0,0010	< 0,0001	< 0,0001
<b>Akrosom</b>	0,1222	0,1048	0,3395
<b>Kopf</b>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<b>VB</b>	0,7029	0,5462	0,8002
<b>Schwanz</b>	< 0,0001	0,0203	0,4246
<b>Multipel</b>	0,0003	< 0,0001	< 0,0001

Zeit (t); Wechselwirkung (x)

## 9.4 Statistische Werte zu den Grafiken

### 9.4.1 Evaluierung der Verdüner

Tabelle 13: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichungen (SD), Mediane ( $\tilde{x}$ ), Quartile (Q1 Und Q3), sowie Minima ( $x_{\min}$ ) und Maxima ( $x_{\max}$ ) der Gesamtmotilität (MOT) in Prozent im Vergleich der verschiedenen Spermaverdünner und Verdünnungsstufen (n = 64), evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Variable	0						30						60						90						120							
	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:8)		
$\bar{x} \pm SD$	56,63 ± 13,57	77,31 ± 7,01	65,00 ± 10,68	52,61 ± 10,48	49,87 ± 14,75	64,17 ± 9,92	56,36 ± 17,34	74,11 ± 9,35	62,89 ± 13,39	52,14 ± 6,01	49,52 ± 12,03	64,25 ± 9,11	48,88 ± 14,49	68,28 ± 9,50	62,31 ± 13,04	47,84 ± 5,68	41,64 ± 14,10	59,34 ± 6,19	45,27 ± 13,72	63,55 ± 11,07	63,55 ± 11,07	44,53 ± 2,98	38,43 ± 15,82	54,05 ± 6,89	37,03 ± 16,65	59,14 ± 9,69	54,31 ± 12,06	38,15 ± 4,79	36,45 ± 13,56	44,72 ± 7,95	46,76 ± 12,26	
$\tilde{x}$	55,16	76,48	67,47	57,23	49,13	68,51	63,33	75,71	65,65	52,26	44,65	66,53	46,23	69,77	65,92	45,53	40,47	60,24	45,45	56,96	56,96	44,92	37,20	49,63	34,37	61,16	56,88	37,44	33,00	45,77	43,03	
Q1	47,61	73,49	58,29	46,91	38,56	54,44	44,66	66,52	56,80	47,11	42,76	59,20	41,00	61,35	52,44	44,83	32,24	55,59	39,89	52,24	51,62	42,58	26,40	41,46	29,99	49,87	48,96	36,09	26,85	36,92	40,24	
Q3	68,46	80,69	68,81	58,64	57,38	71,30	70,12	81,19	67,29	55,13	56,38	71,54	58,41	74,74	72,02	48,59	46,26	62,91	52,98	70,40	63,65	46,27	43,63	58,61	43,92	65,16	62,80	41,47	39,70	49,09	58,86	
$x_{\min} - x_{\max}$	24,90 - 74,33	67,32 - 90,16	47,77 - 83,42	36,53 - 64,86	33,24 - 75,60	50,14 - 75,49	15 - 75,89	59,96 - 86,15	41,41 - 86,13	45,38 - 63,34	36,09 - 73,40	47,74 - 73,22	20,90 - 70,32	55,03 - 82,32	40,00 - 78,33	42,35 - 58,43	24,63 - 70,13	50,16 - 68,62	10,00	50,62 - 77,69	33,78 - 72,32	39,51 - 48,90	22,88 - 71,53	45,80 - 62,25	32,63 - 67,66	0,00 - 75,50	46,72 - 73,40	31,38 - 66,94	29,96 - 45,56	24,19 - 66,09	35,68 - 57,01	28,33 - 61,71

1%ige Glukoselösung (1%G); Spermaverdünner (SV)

Tabelle 14: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichungen (SD), Mediane ( $\tilde{x}$ ), Quartile (Q1 Und Q3), sowie Minima ( $x_{\min}$ ) und Maxima ( $x_{\max}$ ) der Vorwärtmotilität (PMOT) in Prozent im Vergleich der verschiedenen Spermaverdüner und Verdünnungsstufen (n = 64) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

		0						30						60						90						120									
Variable	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)
$\bar{x} \pm SD$	41,89 ± 15,00	70,74 ± 7,82	55,03 ± 10,06	40,69 ± 9,17	37,90 ± 14,57	54,04 ± 11,34	48,13 ± 11,32	41,89 ± 15,00	70,74 ± 7,82	55,03 ± 10,06	40,69 ± 9,17	37,90 ± 14,57	54,04 ± 11,34	48,13 ± 11,32	41,89 ± 15,00	70,74 ± 7,82	55,03 ± 10,06	40,69 ± 9,17	37,90 ± 14,57	54,04 ± 11,34	48,13 ± 11,32	41,89 ± 15,00	70,74 ± 7,82	55,03 ± 10,06	40,69 ± 9,17	37,90 ± 14,57	54,04 ± 11,34	48,13 ± 11,32	41,89 ± 15,00	70,74 ± 7,82	55,03 ± 10,06	40,69 ± 9,17	37,90 ± 14,57	54,04 ± 11,34	48,13 ± 11,32
$\tilde{x}$	38,34	70,85	56,72	41,56	33,53	58,09	48,97	38,34	70,85	56,72	41,56	33,53	58,09	48,97	38,34	70,85	56,72	41,56	33,53	58,09	48,97	38,34	70,85	56,72	41,56	33,53	58,09	48,97	38,34	70,85	56,72	41,56	33,53	58,09	48,97
Q1	36,47	67,39	49,11	37,32	28,62	48,48	47,18	36,47	67,39	49,11	37,32	28,62	48,48	47,18	36,47	67,39	49,11	37,32	28,62	48,48	47,18	36,47	67,39	49,11	37,32	28,62	48,48	47,18	36,47	67,39	49,11	37,32	28,62	48,48	47,18
Q3	53,15	75,40	61,07	47,00	45,08	61,25	54,70	53,15	75,40	61,07	47,00	45,08	61,25	54,70	53,15	75,40	61,07	47,00	45,08	61,25	54,70	53,15	75,40	61,07	47,00	45,08	61,25	54,70	53,15	75,40	61,07	47,00	45,08	61,25	54,70
$x_{\min} - x_{\max}$	10,86 – 61,34	57,60 – 82,59	37,70 – 69,94	26,29 – 52,87	20,45 – 66,17	30,86 – 65,83	23,08 – 59,39	10,86 – 61,34	57,60 – 82,59	37,70 – 69,94	26,29 – 52,87	20,45 – 66,17	30,86 – 65,83	23,08 – 59,39	10,86 – 61,34	57,60 – 82,59	37,70 – 69,94	26,29 – 52,87	20,45 – 66,17	30,86 – 65,83	23,08 – 59,39	10,86 – 61,34	57,60 – 82,59	37,70 – 69,94	26,29 – 52,87	20,45 – 66,17	30,86 – 65,83	23,08 – 59,39	10,86 – 61,34	57,60 – 82,59	37,70 – 69,94	26,29 – 52,87	20,45 – 66,17	30,86 – 65,83	
Variable	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)
$\bar{x} \pm SD$	41,13 ± 16,27	65,93 ± 9,32	50,66 ± 13,67	38,93 ± 4,14	36,23 ± 13,40	53,66 ± 7,23	48,82 ± 8,83	41,13 ± 16,27	65,93 ± 9,32	50,66 ± 13,67	38,93 ± 4,14	36,23 ± 13,40	53,66 ± 7,23	48,82 ± 8,83	41,13 ± 16,27	65,93 ± 9,32	50,66 ± 13,67	38,93 ± 4,14	36,23 ± 13,40	53,66 ± 7,23	48,82 ± 8,83	41,13 ± 16,27	65,93 ± 9,32	50,66 ± 13,67	38,93 ± 4,14	36,23 ± 13,40	53,66 ± 7,23	48,82 ± 8,83	41,13 ± 16,27	65,93 ± 9,32	50,66 ± 13,67	38,93 ± 4,14	36,23 ± 13,40	53,66 ± 7,23	48,82 ± 8,83
$\tilde{x}$	42,31	69,25	53,53	39,45	33,29	52,46	46,05	42,31	69,25	53,53	39,45	33,29	52,46	46,05	42,31	69,25	53,53	39,45	33,29	52,46	46,05	42,31	69,25	53,53	39,45	33,29	52,46	46,05	42,31	69,25	53,53	39,45	33,29	52,46	46,05
Q1	31,15	58,51	43,46	37,41	28,60	50,79	42,52	31,15	58,51	43,46	37,41	28,60	50,79	42,52	31,15	58,51	43,46	37,41	28,60	50,79	42,52	31,15	58,51	43,46	37,41	28,60	50,79	42,52	31,15	58,51	43,46	37,41	28,60	50,79	42,52
Q3	54,13	73,58	58,66	41,39	41,79	56,39	57,64	54,13	73,58	58,66	41,39	41,79	56,39	57,64	54,13	73,58	58,66	41,39	41,79	56,39	57,64	54,13	73,58	58,66	41,39	41,79	56,39	57,64	54,13	73,58	58,66	41,39	41,79	56,39	57,64
$x_{\min} - x_{\max}$	5,00 – 53,57	48,71 – 75,06	29,66 – 70,67	31,78 – 44,06	18,48 – 61,56	41,65 – 64,13	37,49 – 60,74	5,00 – 53,57	48,71 – 75,06	29,66 – 70,67	31,78 – 44,06	18,48 – 61,56	41,65 – 64,13	37,49 – 60,74	5,00 – 53,57	48,71 – 75,06	29,66 – 70,67	31,78 – 44,06	18,48 – 61,56	41,65 – 64,13	37,49 – 60,74	5,00 – 53,57	48,71 – 75,06	29,66 – 70,67	31,78 – 44,06	18,48 – 61,56	41,65 – 64,13	37,49 – 60,74	5,00 – 53,57	48,71 – 75,06	29,66 – 70,67	31,78 – 44,06	18,48 – 61,56	41,65 – 64,13	
Variable	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)
$\bar{x} \pm SD$	33,75 ± 12,09	59,42 ± 9,45	48,70 ± 12,65	34,69 ± 3,62	30,28 ± 12,65	47,43 ± 6,34	41,81 ± 9,02	33,75 ± 12,09	59,42 ± 9,45	48,70 ± 12,65	34,69 ± 3,62	30,28 ± 12,65	47,43 ± 6,34	41,81 ± 9,02	33,75 ± 12,09	59,42 ± 9,45	48,70 ± 12,65	34,69 ± 3,62	30,28 ± 12,65	47,43 ± 6,34	41,81 ± 9,02	33,75 ± 12,09	59,42 ± 9,45	48,70 ± 12,65	34,69 ± 3,62	30,28 ± 12,65	47,43 ± 6,34	41,81 ± 9,02	33,75 ± 12,09	59,42 ± 9,45	48,70 ± 12,65	34,69 ± 3,62	30,28 ± 12,65	47,43 ± 6,34	41,81 ± 9,02
$\tilde{x}$	35,32	59,78	54,27	35,53	27,95	47,49	42,06	35,32	59,78	54,27	35,53	27,95	47,49	42,06	35,32	59,78	54,27	35,53	27,95	47,49	42,06	35,32	59,78	54,27	35,53	27,95	47,49	42,06	35,32	59,78	54,27	35,53	27,95	47,49	42,06
Q1	26,00	51,92	41,65	34,25	23,97	41,81	36,32	26,00	51,92	41,65	34,25	23,97	41,81	36,32	26,00	51,92	41,65	34,25	23,97	41,81	36,32	26,00	51,92	41,65	34,25	23,97	41,81	36,32	26,00	51,92	41,65	34,25	23,97	41,81	36,32
Q3	42,11	64,04	55,29	36,53	36,14	50,78	49,17	42,11	64,04	55,29	36,53	36,14	50,78	49,17	42,11	64,04	55,29	36,53	36,14	50,78	49,17	42,11	64,04	55,29	36,53	36,14	50,78	49,17	42,11	64,04	55,29	36,53	36,14	50,78	49,17
$x_{\min} - x_{\max}$	8,69 – 53,09	48,40 – 75,60	24,28 – 63,14	27,77 – 38,60	12,87 – 54,29	40,06 – 58,50	26,26 – 52,58	8,69 – 53,09	48,40 – 75,60	24,28 – 63,14	27,77 – 38,60	12,87 – 54,29	40,06 – 58,50	26,26 – 52,58	8,69 – 53,09	48,40 – 75,60	24,28 – 63,14	27,77 – 38,60	12,87 – 54,29	40,06 – 58,50	26,26 – 52,58	8,69 – 53,09	48,40 – 75,60	24,28 – 63,14	27,77 – 38,60	12,87 – 54,29	40,06 – 58,50	26,26 – 52,58	8,69 – 53,09	48,40 – 75,60	24,28 – 63,14	27,77 – 38,60	12,87 – 54,29	40,06 – 58,50	
Variable	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)
$\bar{x} \pm SD$	30,87 ± 10,21	54,07 ± 10,25	41,09 ± 10,49	31,05 ± 6,78	23,69 ± 13,53	41,48 ± 6,79	35,62 ± 7,17	30,87 ± 10,21	54,07 ± 10,25	41,09 ± 10,49	31,05 ± 6,78	23,69 ± 13,53	41,48 ± 6,79	35,62 ± 7,17	30,87 ± 10,21	54,07 ± 10,25	41,09 ± 10,49	31,05 ± 6,78	23,69 ± 13,53	41,48 ± 6,79	35,62 ± 7,17	30,87 ± 10,21	54,07 ± 10,25	41,09 ± 10,49	31,05 ± 6,78	23,69 ± 13,53	41,48 ± 6,79	35,62 ± 7,17	30,87 ± 10,21	54,07 ± 10,25	41,09 ± 10,49	31,05 ± 6,78	23,69 ± 13,53	41,48 ± 6,79	
$\tilde{x}$	31,86	55,68	42,66	33,13	21,88	38,88	36,38	31,86	55,68	42,66	33,13	21,88	38,88	36,38	31,86	55,68	42,66	33,13	21,88	38,88	36,38	31,86	55,68	42,66	33,13	21,88	38,88	36,38	31,86	55,68	42,66	33,13	21,88	38,88	
Q1	27,86	44,55	32,88	24,33	14,53	36,49	30,62	27,86	44,55	32,88	24,33	14,53	36,49	30,62	27,86	44,55	32,88	24,33	14,53	36,49	30,62	27,86	44,55	32,88	24,33	14,53	36,49	30,62	27,86	44,55	32,88	24,33	14,53	36,49	
Q3	35,17	59,78	50,29	34,80	26,49	45,23	39,39	35,17	59,78	50,29	34,80	26,49	45,23	39,39	35,17	59,78	50,29	34,80	26,49	45,23	39,39	35,17	59,78	50,29	34,80	26,49	45,23	39,39	35,17	59,78	50,29	34,80	26,49	45,23	
$x_{\min} - x_{\max}$	0,00 – 52,58	41,07 – 68,51	23,97 – 52,76	22,30 – 40,33	9,37 – 52,99	34,96 – 53,64	25,93 – 45,30	0,00 – 52,58	41,07 – 68,51	23,97 – 52,76	22,30 – 40,33	9,37 – 52,99	34,96 – 53,64	25,93 – 45,30	0,00 – 52,58	41,07 – 68,51	23,97 – 52,76	22,30 – 40,33	9,37 – 52,99	34,96 – 53,64	25,93 – 45,30	0,00 – 52,58	41,07 – 68,51	23,97 – 52,76	22,30 – 40,33	9,37 – 52,99	34,96 – 53,64	25,93 – 45,30	0,00 – 52,58	41,07 – 68,51	23,97 – 52,76	22,30 – 40,33	9,37 – 52,99		
Variable	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV										

Tabelle 15: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermivitalität in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der nativen Spermproben mit verschiedenen Spermaverdünnern in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 150), evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Variable	0							
	nativ	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)
$\bar{x} \pm SD$	84,45 ± 4,42	70,53 ± 8,98	81,69 ± 2,78	81,00 ± 3,45	70,50 ± 6,63	70,06 ± 5,16	77,00 ± 2,79	73,88 ± 6,31
$\bar{x}$	85,00	69,50	82,25	80,00	68,50	69,00	75,75	75,75
Q1	81,00	68,00	81,375	79,00	67,375	66,375	74,50	72,125
Q3	86,50	76,00	83,125	81,50	71,875	72,00	78,25	76,625
$X_{\min} - X_{\max}$	90,00 – 94,00	47,00 – 86,00	76,00 – 85,00	78,00 – 89,00	62,00 – 82,00	65,00 – 81,00	70,00 – 82,00	60,50 – 82,00
Variable	120							
	nativ	1%G (1:5)	SV 1 (1:4)	SV 1 (1:8)	SV 2 (1:4)	SV 2 (1:8)	SV 3 (1:4)	SV 3 (1:8)
$\bar{x} \pm SD$	78,45 ± 4,00	64,56 ± 9,15	75,25 ± 3,81	74,81 ± 4,69	63,69 ± 8,04	65,31 ± 6,76	67,75 ± 9,32	68,50 ± 5,95
$\bar{x}$	82,00	64,00	76,00	75,50	62,50	64,50	70,00	70,00
Q1	78,75	62,50	72,75	71,75	58,00	59,75	66,375	68,25
Q3	82,75	69,00	78,00	77,00	66,125	69,125	71,25	72,00
$X_{\min} - X_{\max}$	77,00 – 93,00	41,50 – 84,00	69,00 – 80,00	67,50 – 83,00	54,00 – 76,00	58,00 – 78,00	45,00 – 73,50	55,00 – 74,00

1%ige Glukoslösung (1%G); Spermaverdüner (SV)

Tabelle 16: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermienmorphologie in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der nativen Spermaproben mit verschiedenen Spermaverdünnern in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 140) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Spermazusatz	Untersuchungszeitpunkt [min]	Veränderung						
		Kopf	Akrosom	VB	Schwanz	Multipel	Normal	
nativ	0	14,68 ± 1,21	1,91 ± 0,25	1,59 ± 0,19	26,45 ± 1,59	8,14 ± 0,51	47,23 ± 0,81	
	120	19,23 ± 1,57	1,95 ± 0,30	1,60 ± 0,20	29,50 ± 1,66	8,09 ± 0,42	39,64 ± 0,88	
1% G (1:5)	0	19,38 ± 1,06	2,38 ± 0,18	2,03 ± 0,15	35,15 ± 1,18	9,26 ± 0,39	31,79 ± 0,75	
	120	23,18 ± 1,08	2,44 ± 0,19	1,47 ± 0,11	36,74 ± 1,11	10,35 ± 0,51	25,82 ± 0,56	
SV 1 (1:4)	0	13,38 ± 1,67	2,06 ± 0,26	0,88 ± 0,11	26,00 ± 3,25	8,19 ± 1,02	49,50 ± 6,19	
	120	15,62 ± 1,39	1,75 ± 0,36	0,81 ± 0,16	30,50 ± 2,31	7,94 ± 0,68	43,38 ± 1,05	
	(1:8)	0	17,44 ± 1,38	1,31 ± 0,31	1,56 ± 0,23	31,31 ± 2,89	8,69 ± 0,78	39,69 ± 1,45
		120	19,56 ± 1,46	1,75 ± 0,31	2,44 ± 0,32	37,31 ± 2,61	9,50 ± 1,11	29,44 ± 1,39
SV 2 (1:4)	0	22,69 ± 1,98	2,44 ± 0,53	2,63 ± 0,16	33,63 ± 1,73	8,50 ± 0,67	30,13 ± 1,41	
	120	23,81 ± 2,98	2,19 ± 0,27	2,75 ± 0,34	36,94 ± 4,62	9,56 ± 2,00	24,75 ± 3,09	
	(1:8)	0	23,69 ± 2,17	2,25 ± 0,36	1,44 ± 0,25	38,31 ± 2,37	10,50 ± 0,72	23,81 ± 0,83
		120	25,94 ± 2,61	1,88 ± 0,25	1,63 ± 0,32	39,69 ± 2,35	10,88 ± 1,05	20,00 ± 0,77
SV 3 (1:4)	0	22,38 ± 1,45	2,13 ± 0,40	0,69 ± 0,15	34,56 ± 1,75	12,25 ± 1,08	28,00 ± 0,96	
	120	25,38 ± 1,67	2,56 ± 0,43	0,69 ± 0,13	38,81 ± 1,74	11,62 ± 0,92	20,94 ± 1,06	
	(1:8)	0	22,00 ± 1,35	1,88 ± 0,33	1,88 ± 0,25	36,75 ± 2,38	10,63 ± 0,94	26,88 ± 0,71
		120	24,13 ± 1,59	1,75 ± 0,32	1,88 ± 0,28	34,25 ± 2,30	9,69 ± 0,93	28,31 ± 1,34

Verbindungsstück (VB); 1%ige Glukoselösung (1%G); Spermaverdüner (SV)

## 9.4.2 Evaluierung der Kryoprotektiva

s. nächste Seite

Tabelle 17: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichungen (SD), Mediane ( $\tilde{x}$ ), Quartile (Q1 Und Q3), sowie Minima ( $x_{\min}$ ) und Maxima ( $x_{\max}$ ) der Gesamtmotilität (MOT) in Prozent im Vergleich der verschiedenen Kryoprotektiva und Konzentrationen (n = 96) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

0												
Variable	Lake (1:4)	DMA 4 %	DMA 8%	DMA 12 %	DMSO 4 %	DMSO 8 %	DMSO 12 %	Glyzerin 4 %	Glyzerin 8 %	Glyzerin 12 %		
$\bar{x} \pm SD$	76,31 ± 5,82	65,17 ± 7,89	67,93 ± 3,68	55,71 ± 13,93	53,70 ± 13,14	65,14 ± 8,64	53,51 ± 8,02	18,34 ± 11,87	7,50 ± 6,56	2,92 ± 3,89		
$\tilde{x}$	77,74	67,28	69,07	55,22	55,22	67,30	54,06	20,51	4,93	1,15		
Q1	71,61	60,28	67,41	43,51	43,51	65,53	45,92	8,25	2,96	0,00		
Q3	81,19	69,23	69,74	64,59	64,59	69,03	59,06	27,45	10,47	4,40		
$x_{\min} - x_{\max}$	62,47 – 84,46	53,29 – 76,52	59,57 – 71,25	40,33 – 78,24	40,33 – 78,24	44,50 – 71,72	43,80 – 64,28	0,00 – 31,92	1,52 – 20,08	0,00 – 9,65		
30												
Variable	Lake (1:4)	DMA 4 %	DMA 8%	DMA 12 %	DMSO 4 %	DMSO 8 %	DMSO 12 %	Glyzerin 4 %	Glyzerin 8 %	Glyzerin 12 %		
$\bar{x} \pm SD$	74,96 ± 6,88	59,16 ± 10,10	66,25 ± 4,24	50,53 ± 13,23	50,71 ± 10,34	62,26 ± 6,72	48,26 ± 10,38	12,35 ± 10,38	5,80 ± 6,85	2,53 ± 3,83		
$\tilde{x}$	77,51	62,45	67,52	46,13	46,13	63,45	45,89	9,23	3,59	0,56		
Q1	70,60	51,38	66,73	42,13	42,12	61,48	43,66	4,62	0,52	0,00		
Q3	80,00	65,65	68,08	60,88	60,88	65,76	53,06	20,75	8,42	3,53		
$x_{\min} - x_{\max}$	59,96 – 84,11	44,18 – 71,45	56,16 – 69,50	36,14 – 73,02	36,14 – 73,02	47,09 – 68,65	31,68 – 64,78	0,00 – 27,92	0,00 – 16,38	0,00 – 10,46		
60												
Variable	Lake (1:4)	DMA 4 %	DMA 8%	DMA 12 %	DMSO 4 %	DMSO 8 %	DMSO 12 %	Glyzerin 4 %	Glyzerin 8 %	Glyzerin 12 %		
$\bar{x} \pm SD$	70,58 ± 7,82	53,99 ± 9,58	62,66 ± 3,54	48,22 ± 11,19	46,85 ± 9,31	56,85 ± 8,26	44,98 ± 9,46	9,99 ± 9,14	3,01 ± 3,58	2,29 ± 3,76		
$\tilde{x}$	72,07	56,33	61,79	43,40	43,40	57,18	40,76	7,85	1,82	0,79		
Q1	66,88	45,91	60,65	41,17	41,17	51,52	38,08	2,32	0,00	0,00		
Q3	75,21	60,82	64,87	57,95	57,95	64,15	51,24	17,56	4,78	0,20		
$x_{\min} - x_{\max}$	48,14 – 82,70	40,98 – 66,89	57,52 – 67,91	35,12 – 66,19	35,12 – 66,19	42,89 – 67,04	35,99 – 59,05	0,00 – 22,38	0,00 – 8,43	0,00 – 10,62		
90												
Variable	Lake (1:4)	DMA 4 %	DMA 8%	DMA 12 %	DMSO 4 %	DMSO 8 %	DMSO 12 %	Glyzerin 4 %	Glyzerin 8 %	Glyzerin 12 %		
$\bar{x} \pm SD$	66,50 ± 8,21	47,52 ± 9,85	57,60 ± 6,05	42,66 ± 11,99	42,53 ± 9,09	52,75 ± 9,44	40,67 ± 8,53	8,04 ± 7,61	2,36 ± 3,73	1,51 ± 2,44		
$\tilde{x}$	67,81	48,63	55,85	36,48	36,48	53,33	37,39	5,70	0,32	0,00		
Q1	64,48	39,93	52,52	34,35	34,35	46,20	33,86	2,40	0,00	0,00		
Q3	69,79	54,98	60,75	51,43	51,43	58,48	45,63	12,58	3,24	2,25		
$x_{\min} - x_{\max}$	42,33 – 82,29	34,28 – 60,77	52,35 – 66,59	32,06 – 63,68	32,06 – 63,68	39,32 – 66,85	32,76 – 54,43	0,00 – 20,37	0,00 – 8,34	0,00 – 5,86		
120												
Variable	Lake (1:4)	DMA 4 %	DMA 8%	DMA 12 %	DMSO 4 %	DMSO 8 %	DMSO 12 %	Glyzerin 4 %	Glyzerin 8 %	Glyzerin 12 %		
$\bar{x} \pm SD$	62,93 ± 7,39	42,99 ± 8,47	54,06 ± 7,21	38,22 ± 10,64	38,84 ± 9,50	50,11 ± 9,29	38,02 ± 9,76	5,86 ± 6,24	1,81 ± 3,36	0,63 ± 1,27		
$\tilde{x}$	63,15	44,22	53,04	35,26	35,26	51,10	35,34	4,40	0,00	0,00		
Q1	60,40	36,50	48,61	30,31	30,31	41,09	30,54	0,79	0,00	0,00		
Q3	64,87	49,31	57,44	46,71	46,71	56,13	44,10	9,48	1,81	0,38		
$x_{\min} - x_{\max}$	45,88 – 80,69	31,05 – 52,82	45,43 – 64,53	25,36 – 55,00	25,36 – 55,00	38,41 – 63,81	26,89 – 52,21	0,00 – 14,86	0,00 – 7,26	0,00 – 3,47		

Tabelle 18: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichungen (SD), Mediane ( $\tilde{x}$ ), Quartile (Q1 Und Q3), sowie Minima ( $x_{\min}$ ) und Maxima ( $x_{\max}$ ) der Vorwärtmotilität (PMOT) in Prozent im Vergleich der verschiedenen Kryoprotektiva und Konzentrationen (n = 96) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Variable	0											
	Lake (1:4)	DMA 4 %	DMA 8%	DMA 12 %	DMSO 4 %	DMSO 8 %	DMSO 12 %	Glycerin 4 %	Glycerin 8 %	Glycerin 12 %		
$\bar{x} \pm SD$	68,09 ± 9,10	49,32 ± 5,45	54,72 ± 7,08	36,56 ± 20,10	39,19 ± 10,29	50,07 ± 7,43	36,22 ± 10,34	7,74 ± 7,44	3,14 ± 3,64	1,75 ± 2,57		
$\tilde{x}$	71,10	48,44	56,36	33,21	40,40	48,63	37,10	5,13	1,79	0,32		
Q1	61,90	45,88	48,75	18,68	34,94	46,12	27,74	3,71	0,48	0,00		
Q3	75,13	50,19	59,69	49,20	45,44	56,25	44,33	10,59	4,90	2,69		
$x_{\min} - x_{\max}$	45,65 – 77,12	43,32 – 60,71	44,59 – 63,91	16,85 – 68,48	20,81 – 53,82	37,85 – 60,94	20,56 – 50,06	0,00 – 19,88	0,00 – 10,21	0,00 – 6,80		
Variable	30											
	Lake (1:4)	DMA 4 %	DMA 8%	DMA 12 %	DMSO 4 %	DMSO 8 %	DMSO 12 %	Glycerin 4 %	Glycerin 8 %	Glycerin 12 %		
$\bar{x} \pm SD$	65,48 ± 9,07	42,90 ± 9,32	52,71 ± 7,88	33,65 ± 18,81	36,53 ± 10,20	47,75 ± 7,66	33,94 ± 10,56	5,96 ± 6,24	1,95 ± 2,14	0,36 ± 0,51		
$\tilde{x}$	68,34	43,64	51,18	31,25	36,28	47,51	32,98	3,30	1,58	0,00		
Q1	58,88	40,40	46,48	19,40	30,72	40,92	24,23	1,63	0,00	0,00		
Q3	72,66	46,62	59,43	44,88	40,60	52,61	42,75	10,34	2,98	0,75		
$x_{\min} - x_{\max}$	48,56 – 77,45	25,24 – 57,88	41,93 – 61,39	10,28 – 63,93	22,95 – 55,27	39,42 – 59,54	22,52 – 49,71	0,00 – 16,00	0,00 – 5,07	0,00 – 1,18		
Variable	60											
	Lake (1:4)	DMA 4 %	DMA 8%	DMA 12 %	DMSO 4 %	DMSO 8 %	DMSO 12 %	Glycerin 4 %	Glycerin 8 %	Glycerin 12 %		
$\bar{x} \pm SD$	60,14 ± 10,23	38,17 ± 9,43	49,65 ± 7,16	29,98 ± 17,07	33,90 ± 8,81	41,71 ± 8,49	31,74 ± 10,56	4,20 ± 5,12	1,11 ± 1,35	9,78 ± 1,49		
$\tilde{x}$	61,67	40,78	50,80	27,39	31,36	41,01	31,33	1,82	0,67	0,00		
Q1	55,35	32,71	43,90	16,26	28,36	34,00	24,51	0,68	0,00	0,00		
Q3	66,82	42,89	56,10	43,36	39,98	45,98	38,20	6,65	1,80	0,623		
$x_{\min} - x_{\max}$	33,34 – 75,79	20,94 – 50,73	40,05 – 57,27	10,33 – 54,07	23,78 – 49,43	33,32 – 57,46	16,85 – 47,02	0,00 – 14,07	0,00 – 3,07	0,00 – 3,76		
Variable	120											
	Lake (1:4)	DMA 4 %	DMA 8%	DMA 12 %	DMSO 4 %	DMSO 8 %	DMSO 12 %	Glycerin 4 %	Glycerin 8 %	Glycerin 12 %		
$\bar{x} \pm SD$	56,26 ± 9,23	30,51 ± 7,48	44,51 ± 7,72	23,58 ± 14,80	29,80 ± 9,97	37,40 ± 8,27	26,22 ± 8,06	3,20 ± 4,34	0,85 ± 1,57	0,42 ± 0,85		
$\tilde{x}$	57,43	29,17	44,80	21,01	28,43	36,18	23,83	1,11	0,00	0,00		
Q1	51,32	27,71	37,40	10,94	23,73	32,31	19,97	0,00	0,00	0,00		
Q3	60,62	34,06	50,71	32,99	34,62	39,82	33,47	5,01	0,85	0,26		
$x_{\min} - x_{\max}$	32,87 – 75,50	17,77 – 42,56	34,45 – 55,58	8,54 – 46,28	16,43 – 48,14	28,22 – 54,66	16,95 – 37,81	0,00 – 11,73	0,00 – 3,40	0,00 – 2,30		
Variable	120											
	Lake (1:4)	DMA 4 %	DMA 8%	DMA 12 %	DMSO 4 %	DMSO 8 %	DMSO 12 %	Glycerin 4 %	Glycerin 8 %	Glycerin 12 %		
$\bar{x} \pm SD$	50,01 ± 7,93	26,96 ± 7,83	40,25 ± 7,94	19,28 ± 10,82	25,82 ± 10,66	33,17 ± 7,69	21,99 ± 7,37	2,47 ± 3,45	0,73 ± 1,36	0,14 ± 0,39		
$\tilde{x}$	50,91	26,13	38,72	19,53	26,62	31,61	21,45	0,53	0,00	0,00		
Q1	45,95	22,95	33,13	8,93	19,25	27,60	18,29	0,00	0,00	0,00		
Q3	53,09	30,21	47,88	27,80	30,07	34,55	27,35	4,23	0,73	0,00		
$x_{\min} - x_{\max}$	33,70 – 62,88	15,46 – 41,52	29,97 – 50,63	7,30 – 33,27	9,40 – 44,98	26,83 – 50,05	8,79 – 30,98	0,00 – 8,50	0,00 – 2,93	0,00 – 1,11		

Tabelle 19: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermivitalität in SYBR-14/PI Ausstrichen beim Vergleich der nativen Spermproben mit Spermaverdünner und verschiedenen Kryoprotektiva in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 240) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Variable	0										120												
	nativ	Lake (1:4)	DMA 4 %	DMA 8 %	DMA 12 %	DMSO 4 %	DMSO 8 %	DMSO 12 %	Glycerin 4 %	Glycerin 8 %	Glycerin 12 %	nativ	Lake (1:4)	DMA 4 %	DMA 8 %	DMA 12 %	DMSO 4 %	DMSO 8 %	DMSO 12 %	Glycerin 4 %	Glycerin 8 %	Glycerin 12 %	
$\bar{x} \pm SD$	88,79 ± 4,58	87,21 ± 5,01	78,63 ± 6,27	80,13 ± 3,07	77,56 ± 5,66	75,06 ± 3,54	76,88 ± 5,60	74,31 ± 7,54	49,75 ± 20,52	35,44 ± 17,36	30,88 ± 16,10	82,50 ± 5,22	81,29 ± 6,34	65,88 ± 5,98	73,00 ± 3,67	61,25 ± 3,50	63,62 ± 4,67	65,88 ± 6,36	60,56 ± 3,52	20,88 ± 14,33	10,06 ± 2,83	6,44 ± 3,53	
$\bar{x}$	87,75	86,50	78,75	80,25	75,00	76,25	26,50	71,00	55,00	26,50	23,00	82,50	82,00	66,00	73,25	60,50	64,50	10,50	59,50	14,00	10,50	5,50	5,50
Q1	85,00	83,75	75,00	78,125	73,75	72,25	21,00	68,875	41,875	21,00	19,50	82,50	82,50	63,875	69,75	58,75	61,125	8,50	59,00	8,625	8,50	3,75	3,75
Q3	92,375	91,625	82,625	82,50	82,50	78,00	47,50	79,125	61,50	47,50	35,50	82,00	82,00	69,00	75,00	72,50	68,00	12,00	61,625	37,375	12,00	9,25	9,25
$X_{\min} - X_{\max}$	82,00 – 97,00	77,00 – 96,00	69,00 – 88,00	75,00 – 84,00	72,50 – 87,00	68,00 – 79,00	20,00 – 64,50	65,50 – 88,00	12,00 – 78,50	20,00 – 64,50	18,00 – 61,00	72,50 – 93,00	69,00 – 94,50	54,00 – 77,00	68,00 – 78,50	56,00 – 68,00	55,00 – 69,50	5,00 – 14,50	55,50 – 68,50	6,00 – 40,00	5,00 – 14,50	2,00 – 12,50	2,00 – 12,50

Tabelle 20: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermienmorphologie in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der verdünnten Spermaproben mit verschiedenen Kryoprotektiva in unterschiedlichen Konzentrationen (n = 240) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Spermazusatz	Untersuchungszeitpunkt [min]	Veränderung					Normal	
		Kopf	Akrosom	VB	Schwanz	Multipel		
Lake (1:4)	0	14.04 ± 0.17	2.10 ± 0.05	1.23 ± 0.04	26.23 ± 0.31	8.69 ± 0.14	47.71 ± 0.38	
	120	16.50 ± 0.19	2.04 ± 0.04	0.71 ± 0.03	30.40 ± 0.42	8.10 ± 0.12	42.25 ± 0.35	
DMA	4%	0	20.06 ± 0.27	1.81 ± 0.20	0.88 ± 0.03	22.88 ± 0.95	14.88 ± 0.58	39.50 ± 0.46
		120	29.00 ± 0.77	2.19 ± 0.09	0.88 ± 0.11	24.44 ± 1.33	16.13 ± 0.55	27.38 ± 0.59
	8%	0	17.06 ± 0.87	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.15	28.31 ± 0.79	10.19 ± 0.49	42.44 ± 0.70
		120	18.94 ± 0.74	1.63 ± 0.11	0.88 ± 0.08	28.88 ± 0.98	14.06 ± 0.44	35.63 ± 0.80
	12%	0	30.25 ± 0.37	1.00 ± 0.13	0.94 ± 0.06	13.38 ± 0.43	16.88 ± 0.47	37.56 ± 0.72
		120	30.06 ± 1.15	1.81 ± 0.11	0.94 ± 0.10	15.19 ± 0.59	16.69 ± 0.63	22.81 ± 0.71
DMSO	4%	0	22.06 ± 0.51	2.19 ± 0.17	0.88 ± 0.07	18.94 ± 0.55	15.31 ± 0.33	40.63 ± 0.76
		120	29.06 ± 0.62	2.19 ± 0.19	0.94 ± 0.17	20.63 ± 0.94	18.44 ± 0.80	28.75 ± 0.91
	8%	0	26.25 ± 0.54	1.38 ± 0.14	0.69 ± 0.04	15.81 ± 0.62	17.94 ± 0.40	37.94 ± 0.47
		120	34.38 ± 0.51	1.75 ± 0.10	0.25 ± 0.04	19.63 ± 0.90	21.50 ± 0.69	22.50 ± 0.68
	12%	0	29.63 ± 0.59	0.63 ± 0.08	0.94 ± 0.07	14.50 ± 0.53	16.25 ± 0.54	38.06 ± 0.72
		120	38.88 ± 0.53	1.88 ± 0.15	0.69 ± 0.06	18.13 ± 0.54	18.38 ± 0.71	22.06 ± 0.65
Glyzerin	4%	0	34.63 ± 0.54	1.06 ± 0.13	1.06 ± 0.07	10.44 ± 0.18	18.44 ± 0.45	34.38 ± 0.52
		120	39.69 ± 0.55	1.06 ± 0.09	1.31 ± 0.09	13.00 ± 0.18	22.88 ± 0.50	22.06 ± 0.58
	8%	0	36.50 ± 0.60	1.19 ± 0.10	0.81 ± 0.05	11.56 ± 0.38	21.50 ± 0.39	28.44 ± 0,79
		120	43.69 ± 0.57	1.06 ± 0.09	1.19 ± 0.09	14.31 ± 0.43	25.00 ± 0.43	14.75 ± 0.70
	12%	0	40.50 ± 0.82	1.81 ± 0.10	1.06 ± 0.07	11.88 ± 0.57	23.81 ± 0.39	20.94 ± 0.92
		120	47.00 ± 0.69	2.25 ± 0.16	1.31 ± 0.09	12.88 ± 0.36	28.31 ± 0.61	8.25 ± 0.31

Verbindungsstück (VB)

### 9.4.3 Evaluierung der Kühlrate

Tabelle 21: Mittelwerte und Standardabweichungen der Gesamtmotilität (MOT), Vorwärtsmotilität (PMOT) und der Spermiovitalität in SYBR-14/PI Ausstrichen in Prozent im Vergleich der verschiedenen Kühlraten (n = 62), evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Variable	vor Einfrieren											
	Vitrifikation ohne Kryoprotektivum				schnelle Kühlrate (DMA 8 %)				langsame Kühlrate (DMA 8 %)			
	MOT	PMOT	Viabilität	MOT	PMOT	Viabilität	MOT	PMOT	Viabilität	MOT	PMOT	Viabilität
$\bar{x} \pm SD$	92,63 ± 2,72	86,35 ± 2,40	91,50 ± 3,14	78,21 ± 0,36	57,82 ± 0,83	69,50 ± 1,50	71,34 ± 12,37	51,61 ± 20,70	71,34 ± 12,37	51,61 ± 20,70	80,63 ± 7,49	80,63 ± 7,49
$\bar{x}$	92,13	85,81	90,75	78,21	57,28	69,50	74,19	56,90	74,19	56,90	81,50	81,50
Q1	91,06	84,73	89,00	78,04	56,86	68,75	65,45	34,25	65,45	34,25	78,25	78,25
Q3	93,70	87,44	93,25	78,38	57,69	70,25	79,26	66,19	79,26	66,19	85,75	85,75
$x_{min} - x_{max}$	65,86 – 96,30	38,70 – 89,58	79,00 – 95	29,38 – 78,57	1,40 – 58,11	62,00 – 81,00	49,24 – 93,56	18,21 – 85,47	49,24 – 93,56	18,21 – 85,47	60,60 – 93,50	60,60 – 93,50
Variable	nach Auftauen											
	Vitrifikation ohne Kryoprotektivum				schnelle Kühlrate (DMA 8 %)				langsame Kühlrate (DMA 8 %)			
	MOT	PMOT	Viabilität	MOT	PMOT	Viabilität	MOT	PMOT	Viabilität	MOT	PMOT	Viabilität
$\bar{x} \pm SD$	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,38 ± 0,25	0,83 ± 0,12	0,00 ± 0,00	1,25 ± 0,25	22,19 ± 11,26	10,70 ± 7,86	22,19 ± 11,26	10,70 ± 7,86	29,83 ± 14,16	29,83 ± 14,16
$\bar{x}$	0,00	0,00	0,50	0,83	0,00	1,25	22,45	7,98	22,45	7,98	27,50	27,50
Q1	0,00	0,00	0,38	0,77	0,00	1,13	11,81	6,89	11,81	6,89	22,25	22,25
Q3	0,00	0,00	0,50	0,89	0,00	1,38	30,38	14,93	30,38	14,93	37,25	37,25
$x_{min} - x_{max}$	0,00 – 0,91	0,00 – 0,00	0,00 – 1,5	0,00 – 6,42	0,00 – 2,11	1,00 – 17,00	5,22 – 39,35	2,51 – 32,82	5,22 – 39,35	2,51 – 32,82	1,50 – 57,00	1,50 – 57,00

Tabelle 22: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermiegesamt- und vorwärtsmotilität, sowie der Spermiovitalität in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der Vitrifikation ohne Kryoprotektivum und mit CryoSOfree™ (n = 16), evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Vitrifikation	MOT [%]		PMOT [%]		Vitalität [%]	
	vor Einfrieren	nach Auftauen	vor Einfrieren	nach Auftauen	vor Einfrieren	nach Auftauen
ohne Kryoprotektivum	92,63 ± 2,72	0,00 ± 0,00	86,35 ± 2,40	0,00 ± 0,00	91,50 ± 3,14	0,38 ± 0,25
CryoSOfree™	77,73 ± 8,01	0,50 ± 0,37	62,48 ± 16,04	0,00 ± 0,00	85,75 ± 4,63	1,00 ± 0,34

Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT)

Tabelle 23: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermiengesamt- und vorwärtsmotilität, sowie der Spermiovitalität in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich verschiedener Kryoprotektiva und der Methode des direkten Eintauchens (n = 24) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Direktes Eintauchen"	MOT [%]		PMOT [%]		Vitalität [%]	
	vor Einfrieren	nach Auftauen	vor Einfrieren	nach Auftauen	vor Einfrieren	nach Auftauen
DMA (8 %)	78,21 ± 0,36	0,83 ± 0,12	57,28 ± 0,83	0,00 ± 0,00	69,50 ± 1,50	1,25 ± 0,25
DMA (12 %)	27,99 ± 0,35	0,00 ± 0,00	3,36 ± 1,96	0,00 ± 0,00	79,50 ± 1,50	13,25 ± 1,25
DMSO (8 %)	50,75 ± 6,25	4,12 ± 0,66	45,83 ± 7,99	1,28 ± 0,48	68,25 ± 2,23	15,25 ± 1,75
DMSO (12 %)	59,06 ± 0,28	5,45 ± 0,97	47,05 ± 0,85	1,85 ± 0,27	67,50 ± 5,50	12,50 ± 2,50
Glyzerin (8 %)	1,41 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	19,00 ± 1,00	2,00 ± 1,00
Glyzerin (12 %)	0,84 ± 0,19	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	41,00 ± 0,12	0,75 ± 0,25

Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT)

Tabelle 24: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermienmorphologie in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der verschiedenen Einfriermethoden (n = 62) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Einfrierprotokoll	Untersuchungszeitpunkt [min]	Veränderung					
		Kopf	Akrosom	VB	Schwanz	Multipel	Normal
Vitrifikation ohne Kryoprotektivum	vor Einfrieren	17,25 ± 2,07	1,63 ± 0,34	0,88 ± 0,12	15,13 ± 1,92	12,75 ± 1,62	52,38 ± 1,64
	nach Auftauen	44,38 ± 1,89	1,63 ± 0,28	1,00 ± 0,18	16,25 ± 1,43	22,00 ± 1,45	14,75 ± 1,09
schnelle Kühlrate/ DMA (8%)	vor Einfrieren	18,50 ± 2,12	2,75 ± 1,24	0,25 ± 0,18	21,50 ± 1,06	17,50 ± 1,06	39,50 ± 1,06
	nach Auftauen	30,50 ± 3,18	0,75 ± 0,18	1,25 ± 0,18	20,75 ± 1,94	25,25 ± 1,95	21,50 ± 3,18
langsame Kühlrate / DMA (8%)	vor Einfrieren	16,43 ± 0,43	1,87 ± 0,12	1,00 ± 0,09	28,17 ± 0,40	12,07 ± 0,30	40,47 ± 0,40
	nach Auftauen	23,40 ± 0,39	1,73 ± 0,05	1,00 ± 0,05	29,27 ± 0,42	14,90 ± 0,23	29,70 ± 0,35

Verbindungsstück (VB)

### 9.4.4 Evaluierung der Auftaumethoden

Tabelle 25: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) in Prozent der Spermiengesamt- und vorwärtsmotilität, sowie der Spermiovitalität in Eosin B-Ausstrichen beim Vergleich der verschiedenen Auftaumethoden nach Vitrifikation (n = 56) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Auftauprotokoll	MOT [%]		PMOT [%]		Vitalität [%]	
	vor Einfrieren	nach Auftauen	vor Einfrieren	nach Auftauen	vor Einfrieren	nach Auftauen
4 °C Wasserbad	77,73 ± 6,94	0,14 ± 0,24	62,48 ± 13,89	0,00 ± 0,00	85,75 ± 4,01	1,13 ± 0,22
37 °C Wasserbad	92,63 ± 2,35	0,00 ± 0,00	86,35 ± 2,08	0,00 ± 0,00	91,50 ± 2,72	0,25 ± 0,25
Raumtemperatur	92,63 ± 2,35	0,00 ± 0,00	86,35 ± 2,08	0,00 ± 0,00	91,50 ± 2,72	0,25 ± 0,43
37 °C Brutschrank	92,63 ± 2,35	0,00 ± 0,00	86,35 ± 2,08	0,00 ± 0,00	91,50 ± 2,72	0,25 ± 0,25
4 °C + Raumtemperatur	77,73 ± 6,94	0,00 ± 0,00	62,48 ± 13,89	0,00 ± 0,00	85,75 ± 4,01	0,88 ± 0,22
4 °C + 37 °C	77,73 ± 6,94	0,71 ± 0,51	62,48 ± 13,89	0,18 ± 0,31	85,75 ± 4,01	1,13 ± 0,22
Vit Kit®-Thaw	85,72 ± 0,00	0,14 ± 0,24	78,56 ± 0,00	0,00 ± 0,00	93,50 ± 0,00	1,00 ± 0,35

### 9.4.5 Fertilisationsversuch

Tabelle 26: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichungen (SD), Mediane ( $\tilde{x}$ ), Quartile (Q1 Und Q3), sowie Minima ( $x_{\min}$ ) und Maxima ( $x_{\max}$ ) der Spermienkonzentration, Inseminationsvolumina und Inseminationsdosen (n = 12) , evaluiert anhand von Nymphensittichsperma

Experiment 1						
Variable	Csp [n/ $\mu$ l]		Vi [ $\mu$ l] (+SV 1 (1:4))		Inseminationsdosis [n]	
	Frischsperma	TG-Sperma	Frischsperma	TG-Sperma	Frischsperma	TG-Sperma
$\bar{x} \pm SD$	391677,00 $\pm$ 179795,40	794667,00 $\pm$ 177.360,90	13,00 $\pm$ 1,41	11,00 $\pm$ 0,94	1256250,00 $\pm$ 521191,50	2159000,00 $\pm$ 679874,01
$\tilde{x}$	325000,00	740000,00	12,00	10,00	1218750,00	1850000,00
Q1	268750,00	675000,00	12,00	10,00	928125,00	1687500,00
Q3	481250,00	887000,00	13,50	11,00	1565625,00	2476000,00
Xmin - Xmax	212500,00 - 637500,00	610000,00 - 1034000,00	12,00 - 15,00	10,00 -12,00	637500,00 - 1912500,00	1525000,00 $\pm$ 3102000,00
Experiment 2						
Variable	Csp [n/ $\mu$ l]		Vi [ $\mu$ l] (+SV 1 (1:4))		Inseminationsdosis [n]	
	Frischsperma	TG-Sperma	Frischsperma	TG-Sperma	Frischsperma	TG-Sperma
$\bar{x} \pm SD$	520833,00 $\pm$ 258362,90	1211000,00 $\pm$ 358915,96	11,00 $\pm$ 1,89	11,00 $\pm$ 0,94	1410833,00 $\pm$ 840640,46	3257500,00 $\pm$ 1051322,58
$\tilde{x}$	455000,00	1380000,00	12,00	10,00	910000,00	3852500,00
Q1	348750,00	1046000,00	10,00	10,00	818750,00	2816250,00
Q3	520312,50	1120500,00	12,38	11,25	1652343,75	3289625,00
Xmin - Xmax	242500,00 - 865000,00	712000,00 - 1541000,00	8,00 - 12,00	10,00 -12,00	727500,00 - 2595000,00	1780000,00 - 4140000,00

Spermienkonzentration ( $C_{sp}$ ); Inseminationsvolumen ( $V_i$ ); Spermaverdüner (SV)

## 9.5 Multiple logistische Regressionsanalyse des Fertilisationsversuches

Tabelle 27: Multiple logistische Regression der Befruchtungs- und Absterberaten von Nymphensitticheiern nach der artifizien Insemination mit Frisch- und Tiefgefriersperma

Variable	Befruchtungsrate					
	Coeff	SE	Coeff/SE	OR	p-Wert	95 % Konfidenzintervall
Experiment	-1,093	0,441	-2,48	0.335	0,0151	0,140 – 0,803
Spermabeschaffenheit	-2,598	0,434	-5,98	0,0744	< 0,0001	0,0315 – 0,176
Variable	Absterberate					
	Coeff	SE	Coeff/SE	OR	p-Wert	95 % Konfidenzintervall
Experiment	-0.4149	0.513	-0.808	0.660	0,4337	0,237 – 1,84
Spermabeschaffenheit	-1.117	0.609	-1.83	0.327	0,0787	0,0967 – 1,11

Regressionskoeffizient (Coeff); Standardfehler (SE); Odds Ratio (OR)

## 9.6 Detaillierte Ergebnistabellen

### 9.6.1 Evaluierung der Verdüner

Tabelle 28: Detaillierte Ergebnisdarstellung ausgewählter Spermaparameter von Nymphensittichen nach Zusätze verschiedener Spermaverdüner im Zuge der Verdünnerevaluierung (n = 64)

Probe	Verdüner	Csv	Zeitpunkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen [%]					Normal	
								Kopf	Akrosom	VB	Schwanz	Multipel		
34	1% G	(1:5)	0	47,61	36,47	68,00	74,00	19,00	1,00	0,00	28,00	9,00	43,00	
		(1:5)	30	55,24	39,76	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	60	41,12	29,89	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	90	32,73	25,10	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	120	37,76	31,45	62,50	68,50	24,50	1,00	2,00	37,00	8,50	27,00	
	SV 1	(1:4)	0	90,16	82,59	82,50	83,00	15,00	1,00	0,00	18,50	6,50	59,00	
		(1:4)	30	86,15	74,12	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	60	82,32	75,60	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	90	77,69	65,78	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	120	73,40	63,18	74,00	79,50	18,00	1,00	1,00	21,00	3,00	56,00	
	SV 3	(1:4)	0	71,10	65,83	78,00	81,00	28,50	2,50	1,00	31,50	11,50	25,00	
		(1:4)	30	73,22	64,13	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	60	68,62	58,50	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	90	61,16	53,64	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	120	52,42	44,84	73,50	78,00	23,00	2,50	0,00	38,00	8,50	28,00	
		(1:8)	0	57,93	47,90	75,50	79,00	25,00	0,50	2,00	37,00	8,50	27,00	
		(1:8)	30	53,47	42,91	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	60	46,73	39,56	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	90	42,90	37,73	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	120	37,37	32,67	70,00	76,50	16,50	2,50	0,00	30,00	9,00	42,00	
35	1% G	(1:5)	0	41,81	16,96	76,00	76,50	19,50	2,00	0,00	27,00	12,50	39,00	
		(1:5)	30	35,68	27,64	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	60	26,13	17,71	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	90	51,69	27,53	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	120	30,99	12,55	69,00	71,50	32,50	2,50	1,00	31,00	10,50	22,50	
	SV 1	(1:8)	0	47,77	37,70	81,50	85,00	15,00	3,00	0,50	14,50	10,00	57,00	
		(1:8)	30	41,41	29,66	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	60	40,00	24,28	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	90	53,31	33,15	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	120	66,94	53,97	76,00	80,50	10,50	1,50	0,00	26,50	7,50	54,00	
	SV 2	(1:8)	0	52,50	28,94	72,00	76,00	24,00	0,50	0,00	33,00	6,50	36,00	
		(1:8)	30	36,09	18,48	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	60	33,41	12,87	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	90	27,43	9,37	*	*	*	*	*	*	*	*	
(1:8)	120	24,19	10,22	69,50	71,00	23,00	1,50	1,00	36,50	8,50	29,50			
36/37	1% G	(1:5)	0	53,44	38,25	58,50	67,00	18,50	1,50	1,00	33,00	12,00	34,00	
		(1:5)	30	44,66	32,91	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	60	41,00	26,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	90	45,45	37,19	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	120	30,22	19,19	52,00	62,00	29,50	4,50	0,00	41,00	15,00	10,00	
	SV 1	(1:8)	0	56,32	46,40	80,00	82,50	18,50	2,50	0,50	38,50	8,50	31,50	
		(1:8)	30	59,17	51,21	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	60	51,05	42,62	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	90	33,78	23,97	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	120	31,38	17,40	75,00	76,50	14,00	3,00	4,00	49,00	10,50	19,50	
	SV 2	(1:8)	0	33,34	20,45	70,00	74,00	13,00	2,50	4,50	50,50	5,50	24,00	
		(1:8)	30	43,95	28,97	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	60	24,63	19,85	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	90	23,34	14,77	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	120	26,82	13,17	66,00	70,50	11,50	1,00	3,50	55,50	9,00	19,50	
	SV 3	(1:8)	0	58,84	49,95	76,50	79,00	17,00	1,50	0,00	34,00	13,00	34,50	
		(1:8)	30	55,24	45,47	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	60	46,61	36,66	*	*	*	*	*	*	*	*	
(1:8)		90	37,13	25,93	*	*	*	*	*	*	*	*		
(1:8)	120	28,33	16,67	72,00	74,50	28,00	1,00	2,00	26,00	15,00	28,00			

## Fortsetzung

Probe	Verdüner	Csv	Zeitpunkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen [%]						
								Kopf	Akrosom	VB	Schwanz	Multipel	Normal	
38	1% G	(1:5)	0	54,16	38,34	67,50	66,00	17,50	1,00	0,00	29,00	14,00	38,50	
		(1:5)	30	37,10	16,08	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	60	35,98	22,16	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	90	40,58	29,94	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	120	25,60	14,83	65,00	62,00	23,50	3,00	0,00	34,00	15,50	24,00	
	SV 1	(1:4)	0	74,19	68,71	83,00	84,50	16,50	0,50	3,00	38,00	7,50	34,50	
		(1:4)	30	64,91	57,99	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	60	55,03	48,40	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	90	50,62	43,08	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	120	48,97	40,56	73,00	77,00	13,00	2,50	1,00	45,50	6,50	31,50	
	SV 2	(1:4)	0	36,53	26,29	82,00	77,50	23,50	3,50	5,00	36,50	6,50	25,00	
		(1:4)	30	45,38	40,06	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	60	44,44	38,60	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	90	47,08	40,33	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	120	41,30	34,61	76,00	72,00	21,00	5,00	4,00	39,00	4,00	27,00	
	SV 3	(1:4)	0	71,92	61,77	82,00	78,50	19,00	2,00	0,50	33,50	19,50	25,50	
		(1:4)	30	64,57	54,19	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	60	56,77	46,42	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	90	47,70	36,61	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	120	47,98	37,46	72,00	77,50	24,00	2,00	0,50	43,00	17,50	13,00	
39	1% G	(1:5)	0	54,82	32,80	71,00	72,00	24,50	1,50	3,00	33,00	8,00	30,00	
		(1:5)	30	54,17	30,23	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	60	46,23	27,15	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	90	39,88	27,86	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	120	21,23	14,03	67,50	69,00	32,00	1,00	2,00	34,00	5,00	26,00	
	SV 1	(1:8)	0	58,95	50,01	80,00	81,50	19,50	2,50	5,50	42,50	6,50	23,50	
		(1:8)	30	49,69	33,56	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	60	52,90	38,74	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	90	46,55	32,07	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	120	45,13	33,81	71,00	74,00	21,00	1,50	4,00	40,50	10,00	23,00	
	SV 2	(1:8)	0	45,76	33,31	72,00	75,00	26,00	3,00	2,50	36,00	16,00	16,50	
		(1:8)	30	43,40	29,41	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	60	39,36	27,79	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	90	38,11	21,44	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	120	33,47	20,12	69,00	70,00	25,50	1,00	1,00	34,00	18,00	20,50	
SV 3	(1:8)	0	56,19	45,02	82,00	80,50	28,00	0,00	0,00	42,50	9,50	20,00		
	(1:8)	30	53,61	37,49	*	*	*	*	*	*	*	*		
	(1:8)	60	49,33	26,26	*	*	*	*	*	*	*	*		
	(1:8)	90	32,63	27,05	*	*	*	*	*	*	*	*		
	(1:8)	120	43,75	36,81	74,00	77,00	27,50	1,00	0,00	51,50	9,50	10,50		
40	1% G	(1:5)	0	55,16	24,24	79,00	79,00	25,50	2,50	4,00	45,00	8,50	14,50	
		(1:5)	30	71,44	46,25	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	60	58,41	41,06	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	90	52,03	33,04	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	120	58,60	37,52	63,00	74,00	17,50	5,00	4,00	44,00	8,00	21,50	
	SV 1	(1:4)	0	67,32	57,60	76,00	77,00	6,50	2,00	0,00	31,50	5,50	54,50	
		(1:4)	30	59,96	49,71	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	60	62,94	52,93	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	90	52,24	41,07	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	120	46,72	27,23	69,00	72,00	9,50	1,00	2,00	38,00	10,00	39,50	

## Fortsetzung

Probe	Verdüner	Csv	Zeitpunkt [min]	Veränderungen [%]									
				MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Kopf	Akrosom	VB	Schwanz	Multipel	Normal
40	SV 2	(1:4)	0	59,15	52,87	79,00	79,50	19,00	2,00	4,00	43,50	10,00	21,50
		(1:4)	30	53,80	40,84	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	46,46	30,77	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	39,51	32,69	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	29,96	18,05	75,50	75,00	28,50	3,00	5,50	43,50	11,00	8,50
	SV 3	(1:4)	0	50,14	30,86	73,00	70,00	22,00	2,00	1,50	45,50	9,00	20,00
		(1:4)	30	60,38	51,07	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	58,88	50,19	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	52,45	41,04	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	37,26	23,83	45,00	56,00	29,00	1,50	0,00	45,00	10,50	14,00
41	1% G	(1:5)	0	24,90	10,86	47,00	*	30,50	6,50	5,00	27,50	9,50	21,00
		(1:5)	30	15,00	5,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	60	20,90	8,69	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	90	10,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	120	0,00	0,00	41,50	*	33,50	3,00	1,00	37,00	12,00	13,50
	SV 1	(1:8)	0	68,31	56,41	81,50	*	18,00	0,50	0,00	20,50	14,50	46,50
		(1:8)	30	64,54	46,76	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	60	72,48	57,86	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	90	66,52	52,76	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	120	62,06	48,18	67,50	*	24,00	2,00	0,00	28,00	14,50	31,50
	SV 2	(1:8)	0	40,31	33,76	66,00	*	14,50	1,50	0,00	45,00	9,50	29,50
		(1:8)	30	45,34	37,18	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	60	41,58	35,28	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	90	36,29	29,18	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	120	32,53	21,64	59,00	*	15,50	1,00	0,00	45,00	13,50	25,00
	SV 3	(1:8)	0	52,30	23,08	60,50	*	22,50	2,50	2,00	41,50	9,00	22,50
		(1:8)	30	61,69	41,35	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	60	59,19	44,56	*	*	*	*	*	*	*	*
(1:8)		90	50,52	31,82	*	*	*	*	*	*	*	*	
(1:8)		120	41,19	19,58	55,00	*	19,50	2,00	4,00	45,00	8,50	21,00	
42	1% G	(1:5)	0	64,49	48,58	76,00	*	24,50	2,50	5,50	43,50	6,50	17,50
		(1:5)	30	63,33	31,15	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	60	55,03	31,34	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	90	52,98	37,47	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	120	50,46	40,89	73,00	*	23,50	1,00	3,00	45,00	12,50	15,00
	SV 1	(1:8)	0	67,75	57,03	79,00	*	7,00	1,00	2,00	28,50	5,00	56,50
		(1:8)	30	66,85	55,84	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	60	66,15	54,20	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	90	54,78	41,22	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	120	52,18	41,16	77,00	*	21,00	2,50	6,00	33,50	10,50	26,50
	SV 2	(1:8)	0	33,24	27,69	68,00	*	23,50	3,00	0,50	36,50	11,50	25,00
		(1:8)	30	40,83	27,48	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	60	29,50	25,34	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	90	22,88	13,83	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	120	26,85	15,83	63,00	*	30,00	2,00	1,00	44,00	13,50	9,50
	SV 3	(1:8)	0	60,89	47,98	77,00	*	18,50	4,00	5,00	46,00	6,50	20,00
		(1:8)	30	56,88	46,62	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	60	48,21	35,31	*	*	*	*	*	*	*	*
(1:8)		90	48,74	35,33	*	*	*	*	*	*	*	*	
(1:8)		120	42,31	30,19	72,00	*	17,50	2,00	3,00	32,00	5,50	40,00	

## Fortsetzung

Probe	Verdüner	C <sub>sv</sub>	Zeitpunkt [min]	Veränderungen [%]										
				MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Kopf	Akrosom	VB	Schwanz	Multipel	Normal	
43	1% G	(1:5)	0	68,57	56,18	82,50	*	6,00	0,00	2,00	30,00	7,50	54,50	
		(1:5)	30	74,50	57,64	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	60	45,02	23,60	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	90	40,32	24,20	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	120	34,24	14,95	72,00	*	18,00	2,50	3,00	37,50	5,50	33,50	
	SV 1	(1:4)	0	71,40	63,42	82,00	*	6,00	1,50	1,00	24,50	6,00	61,00	
		(1:4)	30	67,06	58,68	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	60	56,58	48,90	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	90	52,23	45,04	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	120	50,18	40,35	78,00	*	9,00	1,00	0,00	31,00	9,50	49,50	
		SV 2	(1:4)	0	50,10	40,91	68,00	*	17,50	2,00	2,50	28,50	10,00	39,50
			(1:4)	30	47,46	38,41	*	*	*	*	*	*	*	*
			(1:4)	60	45,26	35,50	*	*	*	*	*	*	*	*
			(1:4)	90	44,81	33,89	*	*	*	*	*	*	*	*
			(1:4)	120	41,97	30,58	54,00	*	30,00	0,50	3,00	36,50	16,00	14,00
			44	1% G	(1:5)	0	68,46	53,15	69,50	*	6,50	0,00	1,00	32,00
(1:5)	30	71,15			54,13	*	*	*	*	*	*	*	*	
(1:5)	60	70,32			53,09	*	*	*	*	*	*	*	*	
(1:5)	90	53,51			31,86	*	*	*	*	*	*	*	*	
(1:5)	120	34,37			7,51	63,00	*	9,00	1,00	0,00	32,50	10,00	47,50	
SV 1	(1:4)	0		76,21	70,44	85,00	*	11,00	1,00	2,00	28,50	6,00	51,50	
	(1:4)	30		77,99	69,85	*	*	*	*	*	*	*	*	
	(1:4)	60		74,55	66,89	*	*	*	*	*	*	*	*	
	(1:4)	90		67,58	56,10	*	*	*	*	*	*	*	*	
	(1:4)	120		64,56	51,03	78,00	*	16,50	3,00	1,00	39,50	3,50	36,50	
	SV 2	(1:4)		0	56,76	40,21	62,00	*	12,50	1,50	3,00	21,50	7,50	54,00
(1:4)		30		55,08	34,42	*	*	*	*	*	*	*	*	
(1:4)		60		54,98	37,74	*	*	*	*	*	*	*	*	
(1:4)		90		46,00	24,64	*	*	*	*	*	*	*	*	
(1:4)		120		35,08	10,50	58,00	*	14,50	2,00	3,50	22,50	12,50	45,00	
SV 3	(1:4)	0		67,49	55,36	77,50	*	11,50	0,00	0,00	39,00	11,00	38,50	
	(1:4)	30	68,49	53,85	*	*	*	*	*	*	*	*		
	(1:4)	60	62,50	48,57	*	*	*	*	*	*	*	*		
	(1:4)	90	62,25	44,11	*	*	*	*	*	*	*	*		
	(1:4)	120	47,11	27,52	72,00	*	16,50	4,00	1,00	40,50	12,50	25,50		
45	1% G	(1:5)	0	65,76	47,63	76,00	*	24,00	5,50	5,00	46,00	6,00	13,50	
		(1:5)	30	70,12	52,04	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	60	68,57	49,52	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	90	54,63	31,63	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	120	43,92	10,88	71,50	*	22,00	5,00	4,00	42,50	10,00	16,50	
	SV 2	(1:4)	0	64,86	42,21	67,00	*	16,50	1,00	2,00	41,50	10,00	29,00	
		(1:4)	30	63,34	43,04	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	60	58,43	35,57	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	90	48,90	22,30	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	120	45,56	15,52	58,00	*	15,50	2,00	2,00	45,00	11,00	24,50	
		SV 3	(1:4)	0	75,49	60,82	75,00	*	27,50	3,00	0,00	38,50	6,00	25,00
	(1:4)		30	71,09	50,88	*	*	*	*	*	*	*	*	
	(1:4)		60	64,14	40,06	*	*	*	*	*	*	*	*	
	(1:4)		90	57,64	36,15	*	*	*	*	*	*	*	*	
	(1:4)		120	57,01	24,55	70,00	*	29,50	2,00	1,00	43,50	7,00	17,00	

## Fortsetzung

Probe	Verdüner	C <sub>sv</sub>	Zeitpunkt [min]	Veränderungen [%]									
				MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Kopf	Akrosom	VB	Schwanz	Multipel	Normal
46	1% G	(1:5)	0	66,72	52,07	68,00	*	20,50	3,50	2,00	27,00	9,50	37,50
		(1:5)	30	67,00	48,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	60	64,36	38,81	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	90	62,28	36,16	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	120	53,74	22,13	63,00	*	28,50	2,50	0,00	28,00	10,50	30,50
	SV 1	(1:8)	0	70,29	61,94	79,00	*	15,50	1,00	2,00	42,50	9,00	30,00
		(1:8)	30	68,60	59,01	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	60	71,86	63,14	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	90	62,69	49,84	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	120	65,00	52,46	77,00	*	17,50	2,50	2,00	46,00	10,00	22,00
	SV 2	(1:8)	0	62,60	49,16	66,50	*	30,50	2,50	0,00	32,50	8,00	26,50
		(1:8)	30	56,17	40,20	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	60	45,28	28,10	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	90	43,33	22,31	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	120	43,00	17,73	58,00	*	44,00	2,00	1,00	32,50	8,50	12,00
	SV 3	(1:8)	0	69,18	59,39	71,00	*	24,50	2,00	2,00	25,00	13,50	33,00
		(1:8)	30	67,57	57,31	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	60	61,44	48,55	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	90	57,79	44,36	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	120	61,44	32,39	69,00	*	29,50	1,50	1,00	18,00	11,00	39,00
47	1% G	(1:5)	0	42,32	38,22	70,00	*	22,50	1,00	0,00	27,50	14,00	35,00
		(1:5)	30	40,25	34,40	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	60	39,86	35,32	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	90	33,99	30,02	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	120	28,05	21,59	64,00	*	20,00	1,00	0,00	26,00	13,50	39,50
	SV 1	(1:4)	0	82,27	77,05	82,00	*	17,50	3,50	1,00	19,50	13,00	45,50
		(1:4)	30	80,71	75,06	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	70,32	56,64	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	77,57	68,51	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	66,94	53,97	78,00	*	23,00	1,00	0,00	15,50	10,50	50,00
	SV 2	(1:4)	0	37,31	28,64	69,00	*	37,50	2,00	1,50	31,50	9,00	18,50
		(1:4)	30	46,07	38,85	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	42,35	36,13	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	42,72	37,55	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	36,89	31,22	62,50	*	17,50	3,00	4,00	50,50	8,00	17,00
	SV 3	(1:4)	0	55,04	48,68	75,00	*	34,50	1,50	0,00	31,00	11,50	21,50
		(1:4)	30	47,74	41,65	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	52,06	41,18	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	45,80	34,96	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	35,68	25,92	70,00	*	37,00	2,00	1,00	34,00	13,50	12,50
48	1% G	(1:5)	0	41,22	37,46	69,00	*	13,00	3,00	2,50	42,00	10,50	29,00
		(1:5)	30	46,19	42,31	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	60	42,20	35,59	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	90	36,23	31,86	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	120	29,99	23,50	58,00	*	19,50	2,50	2,50	36,00	10,00	29,50
	SV 1	(1:8)	0	67,19	60,78	78,00	*	21,50	0,00	1,00	33,50	8,50	35,50
		(1:8)	30	66,75	58,54	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	60	65,69	54,44	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	90	59,14	44,10	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:8)	120	50,24	35,80	72,00	*	20,50	0,00	0,00	36,00	4,50	39,00

## Fortsetzung

Probe	Verdüner	C <sub>sv</sub>	Zeitpunkt [min]	Veränderungen [%]										
				MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Kopf	Akrosom	VB	Schwanz	Multipel	Normal	
48	SV 2	(1:8)	0	55,64	43,71	65,00	*	28,00	3,00	1,50	37,00	15,00	15,50	
		(1:8)	30	57,00	46,58	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	60	49,19	38,71	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	90	44,50	25,60	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	120	38,61	19,94	60,00	*	32,50	4,00	0,00	31,00	12,50	20,00	
	SV 3	(1:8)	0	60,46	53,54	72,50	*	29,00	2,00	0,00	24,00	11,50	33,50	
		(1:8)	30	72,11	58,64	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	60	69,15	51,02	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	90	61,06	37,42	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	120	58,00	25,83	66,00	*	36,50	0,50	0,00	24,00	11,00	28,00	
49	1% G	(1:5)	0	74,33	61,17	86,00	*	31,00	4,50	1,50	32,00	8,00	23,00	
		(1:5)	30	75,89	63,67	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	60	66,70	49,16	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	90	72,36	52,58	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	120	75,50	53,97	84,00	*	29,00	2,00	0,50	30,50	9,50	28,50	
	SV 1	(1:8)	0	83,42	69,94	89,00	*	24,50	0,00	1,00	30,00	7,50	37,00	
		(1:8)	30	86,13	70,67	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	60	78,33	54,33	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	90	72,32	51,62	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	120	61,58	45,99	83,00	*	28,00	1,00	3,50	39,00	8,50	20,00	
		(1:8)	0	75,60	66,17	81,00	*	30,00	2,00	2,50	36,00	12,00	17,50	
	SV 2	(1:8)	30	73,40	61,56	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	60	70,13	54,29	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	90	71,53	52,99	*	*	*	*	*	*	*	*	
			(1:8)	120	66,09	47,45	78,00	*	25,50	2,50	5,50	39,00	3,50	24,00
	SV 3	(1:8)	0	67,92	58,17	76,00	*	11,50	2,50	4,00	44,00	13,50	24,50	
		(1:8)	30	72,73	60,74	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:8)	60	69,25	52,58	*	*	*	*	*	*	*	*	
(1:8)		90	67,66	45,30	*	*	*	*	*	*	*	*		
(1:8)		120	61,71	41,20	70,00	*	18,00	3,50	5,00	47,50	8,00	18,00		
(1:8)		0	68,58	61,34	69,00	*	12,00	2,00	1,00	34,00	7,50	43,50		
50	1% G	(1:5)	30	66,42	57,57	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	60	51,16	42,11	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	90	45,45	35,17	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:5)	120	36,28	23,84	67,00	*	12,50	2,00	1,00	38,00	10,50	36,00	
		(1:4)	0	80,17	74,85	83,50	*	14,50	3,00	0,00	20,00	12,50	50,00	
	SV 1	(1:4)	30	82,66	73,40	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	60	75,32	62,91	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	90	68,01	57,76	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	120	64,18	53,24	80,00	*	16,00	2,50	0,00	22,50	9,50	49,50	
	SV 2	(1:4)	0	58,47	47,64	67,50	*	24,50	3,50	1,00	26,50	10,50	34,00	
		(1:4)	30	50,73	31,78	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	60	45,80	27,77	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	90	45,04	23,40	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	120	37,98	16,11	62,50	*	26,50	2,00	0,00	32,50	4,00	35,00	
		(1:4)	0	52,65	47,89	79,00	*	21,00	2,50	1,50	38,00	11,50	25,50	
SV 3	(1:4)	30	55,66	50,53	*	*	*	*	*	*	*	*		
	(1:4)	60	50,16	42,02	*	*	*	*	*	*	*	*		
	(1:4)	90	46,09	36,72	*	*	*	*	*	*	*	*		
	(1:4)	120	35,88	26,81	71,00	*	24,50	2,50	2,00	39,50	12,50	19,00		

Probe	Verdüner	C <sub>sv</sub>	Zeitpunkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen [%]					Normal
								Kopf	Akrosom	VB	Schwanz	Multipl	
51	1% G	(1:5)	0	70,34	58,39	66,00	*	14,50	2,50	1,00	61,00	7,50	13,50
		(1:5)	30	70,06	60,50	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	60	57,91	42,61	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	90	45,50	33,20	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:5)	120	38,60	22,11	62,00	*	19,00	2,00	1,00	50,50	9,50	18,00
	SV 1	(1:4)	0	76,75	71,26	79,50	*	20,00	4,00	0,00	27,50	8,50	40,00
		(1:4)	30	73,43	68,64	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	69,21	63,09	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	62,42	55,25	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	58,14	49,24	72,00	*	20,00	2,00	1,50	31,00	11,00	34,50
	SV 2	(1:4)	0	57,70	46,78	69,50	*	30,50	4,00	2,00	39,50	4,50	19,50
		(1:4)	30	55,26	44,06	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	44,96	35,41	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	42,18	33,57	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	36,43	25,54	63,00	*	37,00	0,00	0,00	26,00	10,00	27,00
	SV 3	(1:4)	0	69,52	61,07	76,50	*	15,00	3,50	1,00	19,50	18,00	43,00
		(1:4)	30	72,88	63,01	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	61,60	52,53	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	59,28	48,60	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	44,43	32,41	68,50	*	19,50	4,00	0,00	27,00	11,00	38,50

Verdünnungsstufe (C<sub>sv</sub>); Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT); Verbindungsstück (VB)

### 9.6.2 Evaluierung der Kryoprotektiva

Tabelle 29: Detaillierte Ergebnisdarstellung ausgewählter Spermaparameter von Nymphensittichen nach Zusätze verschiedener Kryoprotektiva im Zuge der der Kryoprotektivaevaluierung (n = 96)

Probe	Kryo- protekt- ivum	C <sub>k</sub>	Zeit- punkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen					Normal
								Kopf	Akro- som	VB	Schwanz	Multi- pel	
52	Lake	(1:4)	0	77,26	70,27	80,00	83,00	16,00	3,00	0,00	19,50	12,50	49,00
		(1:4)	30	77,34	68,58	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	74,19	66,70	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	68,30	57,61	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	64,57	52,00	72,00	79,50	16,50	3,00	0,00	21,50	9,50	49,50
	DMA	12%	0	40,33	16,96	*	73,50	27,50	1,00	2,00	18,00	11,00	40,50
		12%	30	36,37	17,96	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	38,99	17,05	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	35,03	13,65	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	34,70	13,40	*	64,00	42,00	3,50	1,50	18,50	11,50	23,00
	DMSO	12%	0	43,80	20,56	*	72,00	31,00	2,00	1,00	14,50	17,50	34,00
		12%	30	45,89	22,52	*	*	*	*	*	*	*	*
12%		60	37,37	25,46	*	*	*	*	*	*	*	*	
12%		90	36,58	20,26	*	*	*	*	*	*	*	*	
12%		120	34,32	19,92	*	68,50	41,00	1,50	0,00	14,00	23,50	20,00	
Glyzerin	12%	0	9,65	6,80	*	18,00	52,50	3,00	0,50	8,00	20,50	15,50	
	12%	30	10,46	1,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
	12%	60	10,62	3,76	*	*	*	*	*	*	*	*	
	12%	90	5,86	2,30	*	*	*	*	*	*	*	*	
	12%	120	3,47	1,11	*	7,00	53,50	3,00	1,50	8,50	24,50	9,00	

## Fortsetzung

Probe	Kryo- protekt- ivum	Ck	Zeit- punkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen					Normal
								Kopf	Akro- som	VB	Schwanz	Multi- pel	
53	Lake	(1:4)	0	81,52	76,20	82,50	84,50	20,00	4,00	0,00	27,50	8,50	40,00
		(1:4)	30	78,48	69,66	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	74,50	62,36	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	69,36	55,84	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	64,16	51,55	74,50	77,00	20,50	2,50	1,50	31,00	10,00	34,50
	DMA	8%	0	67,63	54,60	*	77,00	11,50	1,00	2,50	29,00	8,50	47,50
		8%	30	65,54	50,50	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	64,11	47,53	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	58,35	42,82	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	55,09	37,68	*	72,50	20,00	0,50	1,00	33,50	11,50	33,50
	DMSO	8%	0	68,41	49,73	*	75,00	31,00	2,00	1,00	13,50	11,50	41,00
		8%	30	64,38	51,46	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	64,11	47,53	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	57,29	36,93	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	55,04	29,78	*	68,50	34,50	1,00	0,50	13,50	27,00	23,50
	Glyzerin	8%	0	13,96	6,26	*	31,00	28,50	0,50	0,00	15,50	19,50	36,00
		8%	30	16,38	5,07	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	8,43	3,07	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	8,34	3,40	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	7,26	2,93	*	14,50	35,50	1,50	0,00	18,00	25,00	20,00
54	Lake	(1:4)	0	67,32	57,60	76,50	77,00	17,50	3,50	1,00	19,50	13,00	45,50
		(1:4)	30	59,96	49,71	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	62,94	52,93	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	60,84	49,49	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	60,43	37,38	71,00	72,00	23,50	1,00	0,00	15,00	10,50	50,00
	DMA	12%	0	78,24	68,48	*	73,50	28,50	0,00	1,00	8,50	13,50	48,50
		12%	30	73,02	63,93	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	66,19	54,07	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	63,68	46,28	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	55,00	33,27	*	68,00	32,50	1,50	2,00	13,50	19,00	31,50
	DMSO	12%	0	63,11	45,86	*	69,00	30,50	0,00	0,50	13,50	7,00	48,50
		12%	30	60,25	42,86	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	59,05	44,23	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	52,24	35,06	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	52,09	30,98	*	62,00	37,50	3,50	0,00	14,00	13,50	31,50
Glyzerin	12%	0	8,28	4,43	*	21,00	45,00	0,50	1,00	9,00	20,00	24,50	
	12%	30	5,97	1,18	*	*	*	*	*	*	*	*	
	12%	60	5,08	2,50	*	*	*	*	*	*	*	*	
	12%	90	4,88	1,05	*	*	*	*	*	*	*	*	
	12%	120	1,54	0,00	*	10,00	55,00	0,00	1,50	10,00	21,50	12,00	
55	Lake	(1:4)	0	71,40	57,25	75,50	80,00	15,50	0,50	3,00	38,50	7,50	35,00
		(1:4)	30	73,74	53,23	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	67,17	51,91	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	63,60	51,31	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	61,60	48,53	66,00	72,50	14,50	3,00	1,00	43,00	6,00	32,50
	DMA	4%	0	68,57	49,23	*	76,50	15,50	0,00	1,00	34,00	12,00	37,50
		4%	30	64,68	44,97	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	61,19	41,75	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	54,84	37,74	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	48,43	32,06	*	54,00	19,00	3,00	2,50	41,00	13,00	21,50

Fortsetzung

Probe	Kryo- protekt- ivum	Ck	Zeit- punkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen					Normal
								Kopf	Akro- som	VB	Schwanz	Multi- pel	
55	DMSO	4%	0	62,59	36,34	*	73,00	22,50	2,00	1,00	23,00	18,50	33,00
		4%	30	56,33	33,33	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	51,32	29,97	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	47,66	25,79	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	42,75	24,00	*	55,00	32,50	1,50	0,00	30,00	23,00	13,00
	Glyzerin	4%	0	19,14	4,67	*	66,00	32,50	0,00	0,50	11,00	21,00	35,00
		4%	30	13,08	4,32	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	11,38	2,58	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	8,74	1,18	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	7,55	0,00	*	18,00	36,50	0,50	0,00	14,50	29,50	19,00
56	Lake	(1:4)	0	70,65	61,78	82,00	85,50	18,50	3,00	1,00	25,50	9,50	42,50
		(1:4)	30	68,95	60,39	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	67,50	58,33	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	64,77	54,67	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	62,61	53,55	78,00	82,00	19,00	2,50	1,50	32,00	10,50	34,50
	DMA	8%	0	69,44	59,22	*	79,00	18,00	0,00	0,50	18,50	17,50	45,50
		8%	30	68,73	57,86	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	67,91	57,27	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	66,26	51,29	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	64,53	47,89	*	74,00	21,00	2,50	0,50	18,00	16,00	42,00
	DMSO	8%	0	65,56	45,61	*	76,00	22,50	2,00	1,00	23,00	18,50	33,00
		8%	30	60,82	39,42	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	56,46	38,06	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	54,35	35,42	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	51,89	33,90	*	55,00	32,50	1,50	0,00	30,00	23,00	13,00
	Glyzerin	8%	0	4,19	0,91	*	21,00	43,50	1,00	1,00	9,50	22,00	23,00
8%		30	5,76	1,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
8%		60	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
8%		90	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
8%		120	0,00	0,00	*	9,00	47,00	1,00	1,50	16,00	25,50	9,00	
57	Lake	(1:4)	0	81,20	74,65	80,00	83,00	17,00	0,50	3,00	37,00	8,00	34,50
		(1:4)	30	81,08	72,16	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	70,82	58,21	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	69,49	57,61	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	64,50	52,13	72,00	76,50	12,50	2,50	1,00	45,50	7,00	31,50
	DMA	4%	0	76,52	48,52	*	79,50	18,00	1,00	0,50	36,50	10,50	33,50
		4%	30	71,45	42,30	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	66,89	46,03	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	60,77	32,83	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	52,82	24,27	*	66,00	24,00	3,50	1,50	40,50	6,50	24,00
	DMSO	4%	0	71,85	45,37	*	78,00	18,50	3,50	1,00	19,00	15,00	43,00
		4%	30	63,19	43,11	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	56,69	41,13	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	48,56	33,82	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	44,93	0,30	*	65,00	21,50	2,00	0,00	25,50	16,50	34,50
	Glyzerin	4%	0	31,92	0,91	*	78,50	32,50	0,00	0,50	11,50	15,50	40,00
4%		30	5,38	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
4%		60	1,54	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
4%		90	2,59	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
4%		120	1,05	1,05	*	10,00	39,00	0,50	1,00	14,50	20,50	24,50	

## Fortsetzung

Probe	Kryo- protekt- ivum	Ck	Zeit- punkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen					Normal
								Kopf	Akro- som	VB	Schwanz	Multi- pel	
58	Lake	(1:4)	0	62,47	48,79	83,50	91,50	11,50	2,00	0,00	19,00	8,50	59,00
		(1:4)	30	68,55	56,94	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	60,59	41,27	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	59,15	48,82	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	57,18	42,43	78,00	85,00	18,50	2,00	0,50	19,00	4,00	56,00
	DMA	4%	0	61,95	43,32	*	88,00	20,50	0,00	1,00	13,00	25,50	40,00
		4%	30	46,49	25,24	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	42,43	20,94	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	34,28	17,77	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	31,05	15,46	*	77,00	40,00	2,50	0,00	14,00	20,00	23,50
	DMSO	4%	0	47,19	30,76	*	68,00	29,00	3,50	2,00	20,00	13,00	32,50
		4%	30	38,13	22,95	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	34,04	23,78	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	33,03	16,43	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	27,71	9,40	*	58,50	28,50	6,00	4,00	30,50	10,00	21,00
	Glyzerin	4%	0	7,51	4,64	*	60,00	39,50	0,00	0,50	7,50	15,00	37,50
		4%	30	4,13	2,18	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	2,59	1,05	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	2,65	1,05	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	0,00	0,00	*	7,50	43,50	1,00	1,00	12,50	19,00	23,00
1	Lake	(1:4)	0	67,64	58,79	77,00	82,00	17,50	3,50	1,00	19,50	13,00	45,50
		(1:4)	30	63,30	53,78	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	59,46	44,89	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	42,33	32,87	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	47,76	37,50	68,50	75,00	25,50	1,00	0,00	15,50	10,50	47,50
	DMA	12%	0	66,76	46,15	*	74,00	30,00	0,00	0,50	12,00	14,00	43,50
		12%	30	61,88	42,44	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	59,24	41,88	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	55,00	30,57	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	49,48	26,99	*	57,50	38,00	2,50	0,00	12,00	15,50	32,00
	DMSO	12%	0	64,28	43,82	*	68,50	27,00	1,00	1,00	12,00	20,50	38,50
		12%	30	64,78	49,71	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	58,87	47,02	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	54,43	37,81	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	52,21	30,53	*	60,00	32,50	0,00	1,00	20,50	19,00	27,00
	Glyzerin	12%	0	1,00	0,00	*	18,00	43,50	2,50	1,00	9,00	23,50	20,50
12%		30	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
12%		60	1,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
12%		90	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
12%		120	0,00	0,00	*	9,00	46,00	3,00	2,50	13,50	30,00	5,00	
2	Lake	(1:4)	0	80,38	75,07	85,00	89,50	12,00	1,50	2,50	30,00	2,50	51,50
		(1:4)	30	84,11	74,88	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	77,63	65,01	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	69,93	60,48	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	62,47	51,24	80,00	83,00	17,00	3,00	1,00	38,00	4,00	37,00
	DMA	4%	0	67,17	53,07	*	86,00	20,00	4,50	1,00	19,00	12,50	43,00
		4%	30	62,30	47,74	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	53,40	41,85	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	43,71	28,05	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	40,00	29,59	*	69,00	31,00	2,00	1,00	17,00	16,50	32,50

Fortsetzung

Probe	Kryo- protekt- ivum	Ck	Zeit- punkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen					Normal
								Kopf	Akro- som	VB	Schwanz	Multi- pel	
2	DMSO	4%	0	31,35	20,81	*	77,00	20,50	2,00	0,50	23,50	17,50	36,00
		4%	30	40,84	26,40	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	39,14	25,06	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	32,99	21,71	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	28,67	18,20	*	69,50	24,50	1,00	0,50	11,50	32,50	30,00
	Glyzerin	4%	0	0,00	0,00	*	12,00	36,50	0,50	1,00	9,00	16,00	37,00
		4%	30	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	0,00	0,00	*	6,00	44,00	0,00	1,50	10,00	17,50	27,00
3	Lake	(1:4)	0	74,81	64,18	79,00	84,00	17,00	1,00	2,50	38,50	6,50	34,50
		(1:4)	30	62,59	48,56	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	48,14	33,34	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	51,83	36,41	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	45,88	33,70	65,00	69,00	13,00	2,50	1,00	45,50	6,50	31,50
	DMA	12%	0	62,29	24,64	*	75,00	36,00	0,00	1,00	8,50	18,00	36,50
		12%	30	47,25	22,74	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	44,54	18,04	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	32,06	8,54	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	25,36	7,30	*	56,00	48,00	1,00	1,00	11,50	24,00	14,50
	DMSO	12%	0	54,40	34,71	*	70,00	26,50	1,00	2,00	21,50	15,00	34,00
		12%	30	43,08	24,59	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	41,81	30,05	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	32,76	21,22	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	26,89	18,37	*	55,50	42,00	3,50	1,50	23,50	10,00	19,50
Glyzerin	12%	0	0,00	0,00	*	55,00	35,00	1,00	2,00	12,00	22,50	27,50	
	12%	30	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
	12%	60	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
	12%	90	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
	12%	120	0,00	0,00	*	2,00	46,00	1,50	1,50	13,00	29,00	9,00	
4	Lake	(1:4)	0	84,46	77,12	86,00	92,00	13,50	1,50	2,00	28,00	3,50	51,50
		(1:4)	30	83,49	77,45	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	82,70	75,79	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	82,29	75,50	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	80,69	62,48	85,00	89,50	14,50	3,00	1,50	37,50	4,50	39,00
	DMA	8%	0	71,25	49,39	*	75,00	14,50	1,00	0,50	39,50	9,00	35,50
		8%	30	67,22	47,55	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	60,26	40,05	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	52,38	34,45	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	48,77	29,97	*	69,00	19,00	3,00	1,50	35,00	12,00	29,50
	DMSO	8%	0	71,72	56,17	*	73,00	30,00	0,00	0,50	12,50	18,00	39,00
		8%	30	65,09	51,83	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	64,29	43,95	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	62,04	41,55	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	59,43	36,50	*	64,00	40,00	3,50	0,00	15,50	12,50	28,50
Glyzerin	8%	0	3,28	0,00	*	21,00	35,50	2,50	1,00	9,00	24,50	27,50	
	8%	30	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
	8%	60	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
	8%	90	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
	8%	120	0,00	0,00	*	10,00	47,50	0,00	1,50	9,00	30,00	12,00	

## Fortsetzung

Probe	Kryo- protekt- ivum	Ck	Zeit- punkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen					Normal
								Kopf	Akro- som	VB	Schwanz	Multi- pel	
5	Lake	(1:4)	0	77,45	67,85	94,00	96,00	7,50	0,50	1,00	21,00	6,00	64,00
		(1:4)	30	80,62	74,08	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	78,68	67,95	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	73,98	66,87	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	70,85	52,94	93,00	94,50	11,50	1,00	0,00	32,00	6,50	49,00
	DMA	12%	0	41,99	19,25	*	87,00	31,00	2,00	1,00	14,50	17,00	34,50
		12%	30	36,14	19,89	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	35,12	13,88	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	32,33	11,38	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	28,81	8,15	*	62,00	42,00	1,50	0,00	14,50	21,00	21,00
	DMSO	12%	0	44,70	27,36	*	88,00	35,50	0,50	0,50	8,50	18,50	36,50
		12%	30	45,89	28,60	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	35,99	21,39	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	33,83	16,95	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	30,65	8,79	*	61,50	46,50	1,00	1,00	11,50	24,50	15,50
	Glyzerin	12%	0	0,00	0,00	*	29,00	35,50	2,00	2,00	12,00	26,00	22,50
		12%	30	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	0,01	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	0,00	0,00	*	3,00	41,50	2,50	2,00	13,00	33,50	7,50
6	Lake	(1:4)	0	81,53	76,25	82,50	84,50	11,50	1,00	0,00	19,00	6,50	62,00
		(1:4)	30	74,17	62,59	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	71,56	61,32	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	69,60	59,01	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	65,77	49,43	76,00	80,00	19,00	1,00	1,00	21,00	3,00	55,00
	DMA	8%	0	69,07	46,83	*	84,00	8,00	2,50	0,00	31,00	7,50	51,00
		8%	30	67,82	43,25	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	62,42	40,97	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	53,35	37,14	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	51,56	32,99	*	78,50	10,00	1,00	2,00	38,50	12,00	36,50
	DMSO	8%	0	67,18	46,29	*	85,00	19,00	3,50	1,00	21,50	19,50	35,50
		8%	30	61,71	43,56	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	50,08	33,32	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	42,38	28,22	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	40,85	27,75	*	70,50	27,00	2,00	0,00	29,00	15,50	26,50
	Glyzerin	8%	0	1,98	0,65	*	43,00	35,00	1,50	1,50	12,00	25,50	24,50
		8%	30	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	0,00	0,00	*	12,00	45,00	2,00	0,50	15,00	23,50	14,00
7	Lake	(1:4)	0	71,68	45,65	85,50	81,00	14,50	0,50	3,00	38,50	7,00	36,50
		(1:4)	30	78,29	54,65	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	73,83	53,38	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	69,74	51,32	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	63,41	41,71	67,00	72,50	13,50	3,00	1,50	44,50	6,50	31,00
	DMA	12%	0	44,02	16,85	*	78,00	33,50	3,00	1,00	12,50	17,00	33,00
		12%	30	44,05	10,28	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	41,89	10,33	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	36,08	9,64	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	35,83	9,19	*	60,50	33,00	2,50	2,00	20,50	18,00	24,00

Fortsetzung

Probe	Kryo- protekt- ivum	Ck	Zeit- punkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen					Normal
								Kopf	Akro- som	VB	Schwanz	Multi- pel	
7	DMSO	12%	0	53,72	27,87	*	77,50	30,00	0,00	1,50	21,00	12,50	35,00
		12%	30	31,68	23,13	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	39,71	16,85	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	38,20	19,10	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	36,35	18,02	*	59,00	40,50	2,00	0,50	23,50	11,00	22,50
	Glyzerin	12%	0	3,11	2,11	*	25,00	50,00	1,50	0,50	23,00	13,50	11,50
		12%	30	1,11	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	0,00	0,00	*	4,00	49,50	2,00	0,00	19,00	21,50	8,00
8	Lake	(1:4)	0	81,19	71,93	93,50	95,00	14,00	3,50	0,00	20,00	12,50	50,00
		(1:4)	30	81,22	74,74	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	79,04	72,24	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	75,63	65,23	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	72,85	62,88	90,00	91,50	20,50	2,50	0,00	23,50	8,50	45,00
	DMA	8%	0	59,57	44,59	*	78,50	19,00	0,50	1,00	27,50	6,00	46,00
		8%	30	56,16	41,93	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	57,52	44,88	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	52,35	37,49	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	48,12	33,18	*	70,00	16,50	1,00	0,00	32,00	12,00	38,50
	DMSO	8%	0	44,50	37,85	*	66,00	29,00	1,00	1,00	20,50	16,00	32,50
		8%	30	47,09	41,23	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	42,89	33,88	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	39,32	30,10	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	38,41	27,15	*	56,50	34,50	1,50	0,00	27,50	22,00	14,50
	Glyzerin	8%	0	1,52	0,00	*	20,00	41,00	1,50	1,00	11,00	25,00	20,50
		8%	30	0,69	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	1,19	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
8%		90	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
8%		120	0,00	0,00	*	5,00	46,00	2,00	2,50	14,50	30,00	5,00	
9	Lake	(1:4)	0	70,28	61,95	87,00	93,50	7,00	1,00	1,00	25,00	6,00	59,50
		(1:4)	30	67,81	61,22	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	62,34	56,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	56,80	50,18	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	54,32	47,05	78,00	86,00	8,00	1,00	0,00	28,00	10,50	52,50
	DMA	4%	0	67,39	45,30	*	70,50	21,00	3,00	1,00	17,00	11,50	46,50
		4%	30	62,60	41,40	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	59,25	33,32	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	55,41	28,01	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	48,43	23,49	*	64,00	34,00	1,00	1,50	15,00	15,00	33,50
	DMSO	4%	0	53,57	45,65	*	79,00	16,50	3,50	1,00	19,00	14,50	45,50
		4%	30	52,66	39,23	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	50,63	39,59	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	48,84	37,03	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	45,85	31,52	*	66,00	24,50	2,00	0,00	25,50	16,00	32,00
	Glyzerin	4%	0	21,88	8,05	*	55,00	26,00	2,50	1,00	10,50	24,00	36,00
		4%	30	19,78	9,22	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	16,26	5,82	*	*	*	*	*	*	*	*
4%		90	11,08	4,19	*	*	*	*	*	*	*	*	
4%		120	7,86	3,33	*	40,00	34,50	2,00	1,00	14,50	20,50	27,50	

## Fortsetzung

Probe	Kryo- protekt- ivum	Ck	Zeit- punkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen					Normal
								Kopf	Akro- som	VB	Schwanz	Multi- pel	
10	Lake	(1:4)	0	79,63	74,17	82,50	87,00	19,00	3,50	1,00	15,00	16,00	45,50
		(1:4)	30	71,30	59,52	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	71,15	60,50	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	67,25	56,22	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	62,89	52,22	79,00	82,00	24,00	1,00	0,00	18,50	11,00	45,50
	DMA	8%	0	66,75	58,13	*	82,00	10,50	1,00	3,50	34,50	15,00	35,50
		8%	30	67,13	61,39	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	60,78	55,97	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	58,92	50,53	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	54,52	47,88	*	68,00	20,00	2,50	1,00	32,50	19,00	25,00
	DMSO	8%	0	67,42	47,53	*	80,00	21,50	0,00	0,00	11,00	23,50	44,00
		8%	30	67,79	39,99	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	57,91	34,05	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	52,32	33,05	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	50,32	26,83	*	68,00	37,50	2,50	0,00	13,50	19,50	27,00
	Glyzerin	8%	0	20,08	10,21	*	61,00	30,50	0,00	0,50	8,50	21,00	39,50
		8%	30	16,38	5,07	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	8,43	3,07	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	8,34	3,40	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	7,26	2,93	*	12,00	38,00	1,00	1,00	12,50	24,00	23,50
11	Lake	(1:4)	0	81,98	77,00	87,50	94,00	12,00	3,50	0,00	18,50	13,50	52,50
		(1:4)	30	79,78	70,03	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	74,23	62,02	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	69,16	60,02	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	64,42	50,57	79,00	81,50	12,00	3,00	0,00	22,50	12,00	50,50
	DMA	4%	0	71,22	60,71	*	81,50	21,50	0,50	0,50	20,50	17,00	40,00
		4%	30	68,57	57,88	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	60,69	50,73	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	53,56	42,56	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	51,95	41,52	*	67,50	29,50	2,00	0,50	14,00	20,50	33,50
	DMSO	4%	0	67,11	53,82	*	78,00	28,00	0,00	1,00	8,50	14,00	48,50
		4%	30	65,18	55,27	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	60,51	49,43	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	56,64	48,14	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	53,95	44,98	*	64,00	31,50	1,50	2,00	12,50	20,00	32,50
	Glyzerin	4%	0	8,51	5,58	*	23,50	40,50	2,50	1,00	10,50	18,00	27,50
		4%	30	4,79	2,29	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	4,33	0,91	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	1,82	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	1,25	0,00	*	9,00	47,50	2,00	2,50	12,50	23,50	12,00
12	Lake	(1:4)	0	80,11	75,32	89,00	90,00	11,50	1,00	2,50	27,50	6,00	51,50
		(1:4)	30	78,73	71,72	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	77,35	71,54	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	72,22	64,21	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	69,16	61,69	82,00	86,00	14,50	3,00	1,00	38,50	5,00	38,00
	DMA	8%	0	70,64	63,91	*	84,00	28,50	1,00	0,00	22,50	6,50	41,50
		8%	30	69,50	59,95	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	67,14	56,47	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	66,59	55,58	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	64,48	50,63	*	78,00	31,50	1,00	1,00	20,00	13,00	33,50

Fortsetzung

Probe	Kryo- protekt- ivum	Ck	Zeit- punkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen					Normal	
								Kopf	Akro- som	VB	Schwanz	Multi- pel		
12	DMSO	8%	0	70,91	60,94	*	77,00	26,50	2,00	0,50	16,00	17,00	38,00	
		8%	30	68,65	59,54	*	*	*	*	*	*	*	*	
		8%	60	67,04	57,46	*	*	*	*	*	*	*	*	
		8%	90	66,85	54,66	*	*	*	*	*	*	*	*	
		8%	120	63,81	50,05	*	72,00	30,50	1,00	0,50	15,50	31,00	21,50	
	Glyzerin	8%	0	5,67	2,67	*	64,50	39,00	2,00	0,50	17,50	16,50	24,50	
		8%	30	2,86	2,29	*	*	*	*	*	*	*	*	
		8%	60	3,56	1,38	*	*	*	*	*	*	*	*	
		8%	90	0,65	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
		8%	120	0,00	0,00	*	7,00	41,50	1,00	1,00	19,50	19,00	18,00	
13	Lake	(1:4)	0	74,15	69,80	83,00	85,50	17,00	2,50	1,00	22,00	12,50	45,00	
		(1:4)	30	71,15	65,70	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	60	66,03	59,33	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	90	65,06	57,25	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	120	60,34	49,07	73,00	77,50	18,50	1,00	0,00	17,50	14,50	48,50	
	DMA	12%	0	63,87	58,36	*	72,50	27,00	1,00	0,50	16,00	21,50	34,00	
		12%	30	60,54	52,21	*	*	*	*	*	*	*	*	
		12%	60	57,53	47,82	*	*	*	*	*	*	*	*	
		12%	90	50,25	40,24	*	*	*	*	*	*	*	*	
		12%	120	45,80	30,26	*	60,00	16,50	2,50	0,00	24,50	28,00	28,50	
	DMSO	12%	0	57,71	50,06	*	65,50	36,00	0,50	1,00	12,50	18,50	31,50	
		12%	30	50,67	42,72	*	*	*	*	*	*	*	*	
		12%	60	48,70	36,19	*	*	*	*	*	*	*	*	
		12%	90	43,43	32,94	*	*	*	*	*	*	*	*	
		12%	120	41,43	26,29	*	59,00	37,00	1,00	1,00	20,50	25,00	15,50	
		Glyzerin	12%	0	1,29	0,65	*	20,00	42,50	1,50	1,00	13,00	30,50	11,50
			12%	30	2,71	0,67	*	*	*	*	*	*	*	*
			12%	60	0,63	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
12%	90		1,38	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*		
12%	120		0,00	0,00	*	4,00	47,50	1,50	1,00	14,00	31,50	4,50		
14	Lake	(1:4)	0	78,03	72,20	83,00	86,00	6,50	2,00	1,00	23,00	6,00	61,50	
		(1:4)	30	75,02	68,09	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	60	69,47	62,56	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	90	67,32	61,07	*	*	*	*	*	*	*	*	
		(1:4)	120	64,17	57,12	78,00	83,50	11,00	1,00	0,00	28,00	9,50	50,50	
	DMA	4%	0	55,28	48,37	*	78,00	22,50	3,50	1,00	22,00	13,00	38,00	
		4%	30	53,01	46,25	*	*	*	*	*	*	*	*	
		4%	60	47,07	39,81	*	*	*	*	*	*	*	*	
		4%	90	41,04	30,29	*	*	*	*	*	*	*	*	
		4%	120	37,38	28,00	*	66,00	30,50	2,00	0,00	26,00	18,00	23,50	
	DMSO	4%	0	45,47	36,73	*	75,50	21,50	0,00	0,00	21,00	19,00	38,50	
		4%	30	41,57	32,16	*	*	*	*	*	*	*	*	
		4%	60	40,17	29,45	*	*	*	*	*	*	*	*	
		4%	90	33,29	24,40	*	*	*	*	*	*	*	*	
		4%	120	30,54	19,60	*	69,00	37,50	2,50	0,00	13,50	15,00	31,50	
	Glyzerin	4%	0	26,02	19,88	*	55,00	36,00	2,00	2,00	11,50	14,50	34,00	
		4%	30	23,67	16,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
		4%	60	22,38	14,07	*	*	*	*	*	*	*	*	
4%		90	20,37	11,73	*	*	*	*	*	*	*	*		
4%		120	14,33	8,50	*	40,00	36,50	1,50	1,50	13,00	24,50	23,00		

## Fortsetzung

Probe	Kryo- protekt- ivum	Ck	Zeit- punkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen					Normal
								Kopf	Akro- som	VB	Schwanz	Multi- pel	
15	Lake	(1:4)	0	79,06	74,34	84,50	87,00	19,00	4,50	0,50	28,00	9,50	38,50
		(1:4)	30	77,68	72,19	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	72,57	67,21	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	67,13	58,15	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	61,71	49,16	80,00	85,00	22,50	2,00	0,50	31,00	10,00	34,00
	DMA	8%	0	69,06	61,11	*	81,50	22,50	5,00	0,00	24,00	11,50	37,00
		8%	30	67,87	59,26	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	61,15	54,07	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	52,57	46,78	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	45,43	41,76	*	74,00	13,50	1,50	0,00	27,50	11,00	46,50
	DMSO	8%	0	65,46	56,47	*	83,00	30,50	0,50	0,50	8,50	19,50	40,50
		8%	30	62,52	54,94	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	52,01	45,47	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	47,47	39,24	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	41,18	33,43	*	72,50	38,50	1,00	1,00	12,50	21,50	25,50
	Glyzerin	8%	0	9,31	4,44	*	22,00	39,00	0,50	1,00	9,50	18,00	32,00
		8%	30	4,32	2,16	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	60	2,44	1,33	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	90	1,54	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*
		8%	120	0,00	0,00	*	11,00	49,00	0,00	1,50	10,00	23,00	16,50
16	Lake	(1:4)	0	83,39	76,16	92,00	93,00	15,00	0,50	2,50	38,50	8,50	35,00
		(1:4)	30	82,72	77,36	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	78,62	72,81	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	75,12	67,17	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	70,45	61,25	89,00	88,00	16,00	2,50	2,00	42,50	5,50	31,50
	DMA	12%	0	48,16	41,78	*	87,00	28,50	1,00	0,50	17,00	23,00	30,00
		12%	30	45,01	39,76	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	42,25	36,74	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	36,89	28,37	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	30,82	25,66	*	62,00	30,50	1,00	1,00	21,00	17,50	29,00
	DMSO	12%	0	46,33	39,50	*	84,00	20,50	0,00	0,00	12,50	20,50	46,50
		12%	30	43,85	37,36	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	60	38,32	32,61	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	90	33,87	26,43	*	*	*	*	*	*	*	*
		12%	120	30,19	22,99	*	59,00	34,00	2,50	0,50	17,50	20,50	25,00
	Glyzerin	12%	0	0,00	0,00	*	61,00	30,00	2,50	0,50	9,00	24,00	34,00
12%		30	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
12%		60	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
12%		90	0,00	0,00	*	*	*	*	*	*	*	*	
12%		120	0,00	0,00	*	12,50	37,00	4,50	0,50	12,00	35,00	11,00	
17	Lake	(1:4)	0	73,78	69,89	86,00	88,50	6,50	2,50	0,00	31,00	5,50	54,50
		(1:4)	30	79,06	74,33	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	60	73,51	65,84	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	90	65,02	52,93	*	*	*	*	*	*	*	*
		(1:4)	120	58,26	42,66	80,50	82,00	10,00	1,00	2,00	38,50	9,00	39,50
	DMA	4%	0	53,29	46,07	*	69,00	21,50	2,00	1,00	21,00	17,00	37,50
		4%	30	44,18	37,42	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	40,98	30,90	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	36,59	26,82	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	33,88	21,31	*	63,50	24,00	1,50	0,00	28,00	19,50	27,00

Fortsetzung

Probe	Kryo- protekt- ivum	C <sub>k</sub>	Zeit- punkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität Eosin B [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen					Normal
								Kopf	Akro- som	VB	Schwanz	Multi- pel	
17	DMSO	4%	0	50,48	44,06	*	72,00	20,00	3,00	0,50	17,50	11,00	48,00
		4%	30	47,75	39,77	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	42,29	32,75	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	39,26	31,07	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	36,32	29,25	*	62,00	32,00	1,00	1,00	16,00	14,50	35,50
		4%	0	31,76	18,20	*	48,00	33,50	1,00	2,00	12,00	23,50	28,00
	Glyzerin	4%	30	27,97	13,68	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	60	21,45	9,15	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	90	17,09	7,48	*	*	*	*	*	*	*	*
		4%	120	14,86	6,91	*	36,50	36,00	1,00	2,00	12,50	28,00	20,50

Konzentration (C<sub>k</sub>); Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT); Verbindungsstück (VB)

9.6.3 Evaluierung der Kühlrate

Tabelle 30: Detaillierte Ergebnisdarstellung ausgewählter Spermaparameter von Nymphensittichen vor und nach dem Einfrieren mit verschiedenen Kühlraten im Zuge der der Kühlratenevaluierung (n =31)

Probe	Kühl- rate	Zeitpunkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen [%]					Normal
						Kopf	Akro- som	VB	Schwanz	Multi- pel	
K1		vor Einfrieren	77,29	56,90	77,5	11,50	1,00	2,50	29,00	8,50	47,50
		nach Auftauen	22,45	7,35	48,5	23,00	0,50	1,00	33,50	11,50	30,50
K2		vor Einfrieren	79,38	72,33	86,5	22,50	5,00	0,00	24,00	11,50	37,00
		nach Auftauen	9,38	2,87	21	21,50	1,50	0,00	27,50	10,50	39,00
K3		vor Einfrieren	52,94	22,62	80	18,00	0,00	0,50	18,50	17,50	45,50
		nach Auftauen	23,66	2,87	27	25,50	2,50	0,50	18,00	16,00	37,50
K4		vor Einfrieren	64,91	18,21	78,5	28,50	1,00	0,00	22,50	6,50	41,50
		nach Auftauen	30,52	8,67	57	33,50	1,00	1,00	20,00	13,00	31,50
K5		vor Einfrieren	79,91	66,86	82	14,50	1,00	0,50	39,50	9,00	35,50
		nach Auftauen	39,35	13,84	37	20,50	3,00	1,50	35,00	12,00	28,00
K6		vor Einfrieren	79,15	58,12	81,5	10,50	1,00	3,50	34,50	15,00	35,50
		nach Auftauen	37,39	17,92	42	21,50	2,50	1,00	32,50	19,00	23,50
K7		vor Einfrieren	65,98	51,96	81,5	8,00	2,50	0,00	31,00	7,50	51,00
		nach Auftauen	30,24	16,64	37,5	12,50	1,00	2,00	38,50	12,00	34,00
K8	lang- sam	vor Einfrieren	74,19	65,53	86,5	19,00	0,50	1,00	27,50	6,00	46,00
		nach Auftauen	11,80	6,43	25	20,00	1,00	0,00	32,00	12,00	35,00
K9		vor Einfrieren	49,24	27,00	79,5	20,50	5,00	0,00	24,00	15,50	35,00
		nach Auftauen	11,04	7,69	23,5	24,50	1,50	0,00	27,50	17,00	29,50
K10		vor Einfrieren	83,75	69,69	78	26,50	1,00	0,00	27,00	7,00	38,50
		nach Auftauen	17,28	7,98	27,5	33,50	1,00	1,00	21,00	13,50	30,00
K11		vor Einfrieren	93,56	85,47	93,5	10,50	1,00	3,50	34,50	15,00	35,50
		nach Auftauen	18,06	9,06	34	20,50	2,50	1,00	32,50	19,00	24,50
K12		vor Einfrieren	76,79	61,09	86	19,50	0,50	0,50	20,00	16,00	43,50
		nach Auftauen	5,22	2,51	13	29,50	2,00	0,50	26,00	21,00	21,00
K13		vor Einfrieren	69,17	54,19	85,5	9,00	2,50	0,00	30,00	10,50	48,00
		nach Auftauen	26,22	16,02	1,5	18,00	1,00	2,00	37,00	13,50	28,50
K14		vor Einfrieren	53,47	22,67	60,5	17,00	5,00	0,50	26,00	18,50	33,00
		nach Auftauen	11,83	7,83	17	28,00	2,00	1,50	25,50	14,00	29,00
K15		vor Einfrieren	70,36	41,50	72,5	11,00	1,00	2,50	34,50	17,00	34,00
		nach Auftauen	38,47	32,82	36	19,00	3,00	2,00	32,50	19,50	24,00

## Fortsetzung

Probe	Kühlrate	Zeitpunkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität SYBR-14 [%]	Veränderungen [%]					
						Kopf	Akrosom	VB	Schwanz	Multipel	Normal
QF1		vor Einfrieren	44,50	37,85	66,00	30,50	0,00	0,50	13,50	7,00	48,50
		nach Auftauen	4,77	0,80	17,00	47,00	3,50	0,00	14,00	22,00	13,50
QF2		vor Einfrieren	57,00	53,82	70,50	35,50	0,50	0,50	8,50	18,50	36,50
		nach Auftauen	3,46	1,75	13,50	49,00	1,00	1,00	11,50	28,50	9,00
QF3		vor Einfrieren	78,57	58,11	68,00	15,50	4,50	0,00	23,00	19,00	38,00
		nach Auftauen	0,95	0,00	1,50	26,00	1,00	1,00	18,00	28,00	26,00
QF4		vor Einfrieren	77,86	56,45	71,00	21,50	1,00	0,50	20,00	16,00	41,00
		nach Auftauen	0,71	0,00	1,00	35,00	0,50	1,50	23,50	22,50	17,00
QF6		vor Einfrieren	27,64	1,40	78,00	35,50	0,50	0,50	8,50	18,50	36,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	14,50	30,50	1,50	1,50	22,00	36,00	8,50
QF7	schnell	vor Einfrieren	28,35	5,32	81,00	30,00	0,00	1,50	21,00	12,50	35,00
		nach Auftauen	0,00	0,00	12,00	39,50	1,00	1,00	27,50	23,00	8,00
QF8		vor Einfrieren	59,34	47,90	73,00	30,50	0,50	0,50	8,50	19,50	40,50
		nach Auftauen	4,48	1,58	15,00	40,50	1,00	1,00	12,50	26,00	19,00
QF9		vor Einfrieren	58,79	46,20	62,00	30,00	0,00	0,50	12,50	18,00	39,00
		nach Auftauen	6,42	2,11	10,00	44,50	3,50	0,00	15,50	28,00	8,50
QF10		vor Einfrieren	1,52	0,00	20,00	45,00	0,50	1,00	9,00	20,00	24,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	3,00	44,00	1,00	1,00	9,50	23,00	21,50
QF11		vor Einfrieren	1,29	0,00	18,00	52,50	3,00	0,50	8,00	20,50	15,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	1,00	47,00	0,50	1,50	16,50	25,50	9,50
QF12		vor Einfrieren	1,03	0,00	53,00	35,00	1,00	2,00	12,00	22,50	27,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,50	50,00	1,50	0,50	23,00	14,50	10,50
QF13		vor Einfrieren	0,65	0,00	29,00	35,50	2,00	2,00	12,00	26,00	22,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	1,00	51,00	2,00	0,00	19,00	21,5	6,50
V1		vor Einfrieren	96,30	89,58	92,50	17,50	0,00	1,00	9,50	20,00	52,00
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,50	47,00	1,00	1,50	16,00	25,50	9,00
V2		vor Einfrieren	91,43	84,21	89,00	23,50	3,00	0,50	10,00	9,50	53,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,50	51,00	3,00	1,50	8,50	21,50	14,50
V3		vor Einfrieren	65,86	38,70	79,00	22,00	1,00	2,00	12,00	16,50	46,50
		nach Auftauen	0,56	0,00	1,50	46,00	1,50	1,50	13,00	29,00	9,00
V4	Vitrifikation	vor Einfrieren	80,82	67,61	87,50	39,00	1,00	1,00	9,50	20,00	29,50
		nach Auftauen	0,91	0,00	0,88	47,00	1,00	1,50	16,00	25,50	9,00
V5		vor Einfrieren	89,94	84,90	89,00	22,50	1,00	1,50	15,00	16,00	44,00
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,50	33,50	0,50	1,00	18,50	27,00	19,50
V6		vor Einfrieren	92,83	86,72	95,50	5,50	2,50	0,50	26,00	5,50	60,00
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,00	46,00	2,00	0,00	22,00	14,00	16,00
V7		vor Einfrieren	83,46	73,59	89,50	23,50	3,00	0,50	8,00	17,50	47,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,75	53,50	3,00	1,50	8,50	24,50	9,00
V8		vor Einfrieren	80,78	70,03	87,00	32,50	1,50	0,50	20,00	8,50	37,00
		nach Auftauen	0,53	0,00	0,88	49,50	2,00	0,00	19,00	21,50	8,00

Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT), Verbindungsstück (VB)

### 9.6.4 Evaluierung der Auftaumethoden nach Vitrifikation

Tabelle 31: Detaillierte Ergebnisdarstellung ausgewählter Spermaparameter von Nymphensittichen vor und nach dem Auftauen mit verschiedenen Auftaumethoden im Zuge der Auftaumethodenevaluierung (n = 28)

Probe	Auftaumethode	Zeitpunkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität SYBR-14 [%]
1	4 °C Wasserbad	vor Einfrieren	65,86	38,70	79,00
		nach Auftauen	0,56	0,00	1,50
2		vor Einfrieren	80,82	67,61	87,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	1,00
3		vor Einfrieren	83,46	73,59	89,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	1,00
4		vor Einfrieren	80,78	70,03	87,00
		nach Auftauen	0,00	0,00	1,00
1	37 °C Wasserbad	vor Einfrieren	96,30	89,58	92,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,50
2		vor Einfrieren	91,43	84,21	89,00
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,00
3		vor Einfrieren	89,94	84,90	89,00
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,50
4		vor Einfrieren	92,83	86,72	95,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,00
1	Raumtemperatur	vor Einfrieren	96,30	89,58	92,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,00
2		vor Einfrieren	91,43	84,21	89,00
		nach Auftauen	0,00	0,00	1,00
3		vor Einfrieren	89,94	84,90	89,00
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,00
4		vor Einfrieren	92,83	86,72	95,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,00
1	37 °C Brutschrank	vor Einfrieren	96,30	89,58	92,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,50
2		vor Einfrieren	91,43	84,21	89,00
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,00
3		vor Einfrieren	89,94	84,90	89,00
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,50
4		vor Einfrieren	92,83	86,72	95,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,00

Fortsetzung

Probe	Auftaumethode	Zeitpunkt [min]	MOT [%]	PMOT [%]	Vitalität SYBR-14 [%]
1	4 °C + Raumtemperatur	vor Einfrieren	65,86	38,70	79,00
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,50
2		vor Einfrieren	80,82	67,61	87,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	1,00
3		vor Einfrieren	83,46	73,59	89,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	1,00
4		vor Einfrieren	80,78	70,03	87,00
		nach Auftauen	0,00	0,00	1,00
1	4 °C + 37 °C	vor Einfrieren	65,86	38,70	79,00
		nach Auftauen	1,40	0,71	1,00
2		vor Einfrieren	80,82	67,61	87,50
		nach Auftauen	0,91	0,00	1,50
3		vor Einfrieren	83,46	73,59	89,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	1,00
4		vor Einfrieren	80,78	70,03	87,00
		nach Auftauen	0,53	0,00	1,00
1	Vit Kit® -Thaw	vor Einfrieren	85,72	78,56	93,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	0,50
2		vor Einfrieren	85,72	78,56	93,50
		nach Auftauen	0,56	0,00	1,00
3		vor Einfrieren	85,72	78,56	93,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	1,50
4		vor Einfrieren	85,72	78,56	93,50
		nach Auftauen	0,00	0,00	1,00

Gesamtmotilität (MOT); Vorwärtsmotilität (PMOT)

### 9.6.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Tabelle 32: Vorkommen von Plasmamembranveränderungen von Nymphensittichspermien vor der Kryokonservierung (n = 25) und nach dem Auftauen (n = 25) in vier transmissionselektronenmikroskopisch untersuchten Spermienabschnitten (Akrosom, Kopf, Verbindungsstück, Schwanz)

Membran- abschnitt	Veränderung vor Kryokonservierung				Membran- abschnitt	Veränderung nach Kryokonservierung			
	Akrosom	Kopf	Verbindungs- stück	Schwanz		Akrosom	Kopf	Verbindungs- stück	Schwanz
1	nein	nein	nein	nein	1	nein	ja	nein	nein
2	nein	nein	nein	nein	2	nein	ja	ja	nein
3	nein	nein	nein	nein	3	nein	ja	nein	nein
4	nein	ja	nein	nein	4	ja	nein	nein	nein
5	nein	nein	ja	nein	5	ja	nein	ja	nein
6	nein	nein	nein	nein	6	nein	nein	nein	ja
7	ja	nein	nein	nein	7	nein	ja	nein	nein
8	nein	ja	nein	nein	8	nein	ja	nein	nein
9	nein	nein	nein	nein	9	nein	ja	nein	nein
10	nein	ja	nein	nein	10	nein	nein	nein	ja
11	ja	nein	nein	nein	11	nein	nein	nein	nein
12	nein	nein	nein	nein	12	nein	nein	nein	nein
13	nein	ja	ja	nein	13	nein	ja	ja	nein
14	nein	nein	nein	nein	14	nein	nein	nein	nein
15	nein	nein	nein	nein	15	ja	ja	nein	nein
16	ja	nein	nein	nein	16	nein	ja	nein	nein
17	nein	nein	nein	nein	17	nein	nein	nein	nein
18	nein	nein	nein	ja	18	nein	nein	ja	nein
19	nein	nein	nein	nein	19	nein	nein	nein	nein
20	nein	ja	nein	nein	20	ja	ja	nein	nein
21	nein	nein	ja	nein	21	nein	nein	nein	nein
22	ja	nein	nein	ja	22	nein	ja	nein	nein
23	nein	nein	nein	nein	23	ja	ja	nein	nein
24	nein	nein	nein	nein	24	nein	nein	nein	nein
25	nein	ja	nein	nein	25	nein	nein	nein	nein

### 9.6.6 Fertilisationsversuch

Tabelle 33: Ergebnisse der beiden Inseminationsexperimente von Nymphensittichen mit Frischsperma und Tiefgefriersperma

Variable	Experiment 1				
	Eier gesamt [n]	Eier befruchtet [n]	Eier unbefruchtet [n]	Nestlinge [n]	Befruchtungs- rate [%]
Gruppe 1 Frischsperma	27	25	2	9	92,59
Gruppe 2 TG-Sperma	26	8	18	6	30,77
Variable	Experiment 2				
	Eier gesamt [n]	Eier befruchtet [n]	Eier unbefruchtet [n]	Nestlinge [n]	Befruchtungs- rate [%]
Gruppe 1 TG-Sperma	50	9	41	6	18,00
Gruppe 2 Frischsperma	34	23	11	12	67,65

## 9.7 Geräte

- Arbeitskanal (5 Charr.) Karl Storz GmbH & Co. KG
- Arcadia 20 W Fluorescent Bird Lamp Arcadia Products plc  
2,4 % UVB / 12 % UVA
- Assistent® Counter AC-8 Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG
- Brutschrank Cellstar Nunc GmbH
- Bunsenbrenner LABOGAZ® Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG
- Digital Egg Monitor „Buddy“ Avitronics, Avian Biotech International
- Einfrierautomat IceCube 14S SY-LAB Geräte GmbH
- Erlenmeyerkolben, 100 ml Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG
- Feinwaage SI-234 Denver Instruments GmbH
- flexible Biopsiezange Karl Storz GmbH & Co. KG  
(5 Charr, Länge 34 cm)
- flexible Fasszange Karl Storz GmbH & Co. KG  
(5 Charr, Länge 34 cm)
- Hettich Rotanta/T Kühlzentrifuge 4300 Andreas Hettich GmbH & Co. KG
- Karl Storz Endoskop Karl Storz GmbH & Co. KG  
starre Hopkins®Optik 30°, Ø 2,7 mm,  
Länge 18 cm
- Karl Storz scb image 1 hub 222000 20 Karl Storz GmbH & Co. KG
- Karl Storz xenon nova 201315 20 175 Karl Storz GmbH & Co. KG
- Kirsch Kältemaschine Bosch Froster-720 Phillip Kirsch GmbH
- Köttermann Wasserbad Köttermann GmbH & Co. KG
- LED Lenser H7R.2 Zweibrüder Optoelectronics GmbH & Co. KG
- Leica Reichert-Jung Mikrotom Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
- Leica Reichert-Jung Ultrastainer Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
- Liebherr Gewerbekühlschrank GKV 4310 Liebherr-Internation Deutschland GmbH
- Löser Osmometer Typ 6 Löser Messtechnik

- 
- Magnetrührer Ika® Ret basic Ika®-Werke GmbH & Co. KG
  - Mikroskop Leica DM2500 Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
  - Mikroskopkamera Leica DFC425 C Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
  - Nasenspekulum nach Hartmann-Halle Henry Schein VET GmbH  
Schenkellänge 30 mm, 150 mm
  - Neubauer improved-Zählkammer LO Laboroptik GmbH
  - pH Messgerät S20 SevenEasy™ pH Mettler Toledo GmbH
  - PIPETMAN Classic™ P10 Gilson Inc.
  - PIPETMAN Classic™ P100 Gilson Inc.
  - PIPETMAN Classic™ P20 Gilson Inc.
  - PIPETMAN Classic™ P200 Gilson Inc.
  - Samsung LCD Monitor Samsung Electronics GmbH
  - Stickstoffcontainer TW CX 100 Taylor-Wharton Germany GmbH
  - Telecam Ein-Chip-Kamerakopf Karl Storz GmbH & Co. KG
  - Transmissionselektronenmikroskop Carl Zeiss AG  
Zeiss EM 109
  - Vitrification Unit Minitüb GmbH
  - Vogel-Untersuchungsschiff Karl Storz GmbH & Co. KG  
(14,5 Charr., Nutzlänge 14 cm)
  - Objektiv (10x) Leica ∞/-/  
B N PLAN 10x/0,25 526260 Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
  - Objektiv (40x) Leica 506099∞/  
0.17/0 N PLAN 40x/0,65 PH2 Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
  - Objektiv (100x) Leica Germany 506132 Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH  
∞/-/D N PLAN 100x/1.25-0,60 OIL

## 9.8 Verbrauchsmaterialien

- Assistent® Deckgläser 18 x 18 mm Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG
- Assistent® Deckgläser 60 x 24 mm Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG
- Assistent® Hämatokrit Verschlusswachs Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG
- Assistent® Objektträger Elka 76 x 26 mm Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG
- BD Discardit® Einmalspritzen Becton Dickinson GmbH
- Big Parakeets Prestige Versele-Laga
- Bola Schläuche, PTFE, Innen-Ø 0,5 mm Bohlender GmbH
- Braunol® B. Braun Melsungen AG
- CELLSTAR® TUBES 10 ml Greiner Bio-One GmbH
- CHIPSI EXTRA Small Vollholz-Granulat J. RETTENMAIER & SÖHNE GmbH & Co. KG
- Eppendorf® Safe-Lock Tubes 0,5 ml Eppendorf AG
- Eppendorf® Safe-Lock Tubes 1,5 ml Eppendorf AG
- Eppendorf® Safe-Lock Tubes Amber 0,5 ml Eppendorf AG
- Ethicon® Vicryl Plus 4-0 Johnson & Johnson Medical GmbH
- Isothesia® 1000 mg/g Henry Schein VET GmbH
- Kleenex® Original Kimberly-Clark GmbH
- kodan® Tinktur forte farblos Schülke & Mayr GmbH
- Korvimin® ZVT & Reptil WDT
- Lidocain-HCl B. Braun Melsungen AG
- Meloxivet 1,5 mg/ml Elanco Deutschland GmbH
- Millex® GP Filtereinheit 0,22 µm Merck Millipore, Merck KGaA
- MiniPaillette, transparent, 0,25 ml Minitüb GmbH
- Mini-Spike® Entnahmekanüle B. Braun Melsungen AG
- Pipettenspitzen 10 µl Sarstedt AG & Co.
- Pipettenspitzen 100 µl Sarstedt AG & Co.
- Pipettenspitzen 20 µl Sarstedt AG & Co.

- 
- Pipettenspitzen 200  $\mu$ l Sarstedt AG & Co.
  - Spezial-Indikatorpapier pH 5,4 – 7,0 Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
  - Spezial-Indikatorpapier pH 5,5 – 9,0 Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
  - Spezial-Indikatorpapier pH 6,4 – 8,0 Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
  - Vasofix® Braunüle® 24 G 0.7 x 19 mm B. Braun Melsungen AG
  - Verschlusskugel Metall Minitüb GmbH  
für 0,25 ml Pailletten
  - Wiretrol® II 1 -5  $\mu$ l Kapillaren Drummond Scientific Co.

## 9.9 Chemikalien

- Adenosintriphosphat (Dinatriumsalz)  $C_{10}H_{14}N_5Na_2O_{13}P_3 \cdot xH_2O$ , MW 541,14 Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
- AHK Spiritus, 94 % Vol. Walter Schmidt Chemie GmbH
- Betainhydrochlorid  $(CH_3)_3N^+CH_2COOH \cdot Cl^-$ , MW 153,61 Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
- Bleizitrat-Trihydrat  $(C_6H_5O_7)_2Pb_3 \cdot 3H_2O$ , MW 1053,85 Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
- CryoSOfree™ DMSO-free Cryopreservation Medium Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
- D-(-)-Fruktose,  $\geq 99$  %  $C_6H_{12}O_6$ , MW 180,16 Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
- Dialysis tubing cellulose membrane avg. flat width 25 mm (1.0 in.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
- Dikaliumhydrogenphosphat,  $\geq 98$  %  $K_2HPO_4$ , MW 174,18 Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
- DMA, 99,8 %  $CH_3CON(CH_3)_2$ , MW 87,12 Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
- DMSO,  $\geq 99$ %  $(CH_3)_2SO$ , MW 78,13 Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
- Entellan® Neu Merck KGaA
- Ethanol 100 %  $CH_3CH_2OH$ , MW 46,07 Carl Roth GmbH & Co. KG
- Glukose 5% B. Braun Infusionslösung B. Braun Melsungen AG
- Glutaraldehyd 6 %  $OHC(CH_2)_3CHO$ , MW 100,12 Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
- Glycerin,  $\geq 99$  %  $HOCH_2CH(OH)CH_2OH$ , MW 92,09 Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA

- 
- Glycidether 100 (vormals EPON® 812)      SERVA Electrophoresis GmbH  
MW 306,0
  - Kaliumazetat, ≥ 99 %      Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA  
CH<sub>3</sub>COOK, MW 98,14
  - Kaliumzitat, ≥ 99 %      Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA  
HOC(COOK)(CH<sub>2</sub>COOK)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O,  
MW 324,41
  - Kaliumdihydrogenphosphat, ≥ 99%      Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MW 136,09
  - LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit      Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.
  - Magnesiumazetat-Tetrahydrat, ≥ 99 %      Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA  
(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg · 4H<sub>2</sub>O, MW 214,45
  - Magnesiumchlorid Hexahydrat, ≥ 99%      Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA  
MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, MW 203,30
  - Mononatriumglutamat, ≥ 98 %      Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA  
NaOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH · H<sub>2</sub>O,  
MW 187,13
  - Natriumazetat Trihydrat, ≥ 99,5%      Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA  
CH<sub>3</sub>COONa · 3 H<sub>2</sub>O, MW 136,08
  - Natrium-Cacodylatpuffer 0,1 M      Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
  - Natriumhydroxid, 1 M      Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA  
NaOH, MW 40
  - Osmiumtetroxid      Merck KGaA  
OsO<sub>4</sub>, MW 254,23
  - PBS      Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
  - Polyvinylpyrrolidon,  
(C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO)<sub>n</sub>, MW 10.000      Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
  - Ringer®-Infusionslösung B. Braun      B. Braun Melsungen AG
  - Salzsäure, 1 M      Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA  
HCl, MW 36,46

- 
- TES,  $\geq 99,5\%$   
C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub>S, MW 229,25  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
  - Uranylazetat  
C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>U, MW 388,12  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Merck KGaA
  - Wasser für Injektionszwecke  
Serumwerk Bernburg AG
  - Xylol  
C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>, MW 106,17  
Merck KGaA

## 9.10 Rezepte der verwendeten Medien

### 9.10.1 Rezepte der Verdüner

#### 9.10.1.1 1%ige Glukoselösung

- Ringer®-Infusionslösung 4 ml
- Glukose 5 %-Infusionslösung 1 ml

#### 9.10.1.2 Modifizierter Verdünner nach LAKE UND STEWART (1978)

- D-(-)-Fruktose 0,70 g
- Natriumglutamat 1,92 g
- Magnesiumazetat-Tetrahydrat 0,08 g
- Kaliumazetat 0,50 g
- Polyvinylpyrrolidon (MW 10.000) 0,30 g
- Wasser für Injektionszwecke ad 100 g

#### 9.10.1.3 Modifizierter Verdünner nach BLANCO U. A. (2008)

- D-(-)-Fruktose 0,575 g
- Natriumglutamat 2,00 g
- Kaliumazetat 0,25 g
- Betainhydrochlorid 0,1 M
- Polyvinylpyrrolidon (MW 10.000) 0,15 g
- ATP 30 mM
- Wasser für Injektionszwecke ad 100 g

**9.10.1.4 Modifizierter Verdüner nach SEXTON (1977)/ Beltsville-Poultry-Semen-Extender (BPSE)**

- D-(-)-Fruktose 0,3330 g
- Natriumglutamat 0,5780 g
- Natriumazetat Trihydrat 0,2870 g
- Kaliumzitat 0,0427 g
- Magnesiumchlorid Hexahydrat 0,0227 g
- Dikaliumhydrogenphosphat 0,8467 g
- Kaliumdihydrogenphosphat 0,0433 g
- TES 0,1950 g
- Wasser für Injektionszwecke ad 100 g

**9.10.2 Rezepte diverser Gebrauchsmedien****9.10.2.1 2%ige Eosin-B Färbelösung**

- 2 g Eosin B
- 3 g Natriumzitat
- ad 100 ml *Aqua dest.*

**9.10.2.2 Färbelösung für die Fluoreszenz-Viabilitätsanalyse: LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit  
(Invitrogen™ - Molecular Probes™)**

Herstellungsanweisung (nach Minitüb):

Die Komponenten der Färbelösung sind lichtempfindlich. Darauf sollte während der Herstellung und auch während der Lagerung Rücksicht genommen werden.

2,5 µl der Färbelösung bestehen aus:

- 1,2 µl Androhep®-Verdüner

- 0,05 µl SYBR-14
- 1,25 µl Propidiumiodid

Für die Herstellung werden 0,12 ml Androhep®-Verdünner mit 5 µl SYBR-14 und 0,125 ml Propidiumiodid gemischt. Das daraus entstehende Volumen von 0,25 ml wird anschließend auf 100 braune Eppendorf Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes, 0,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg) aufgeteilt, sodass sich in jedem Gefäß 2,5 µl der Färbelösung befinden. Bis zum Gebrauch sollte die Färbelösung bei -20 °C aufbewahrt werden.

### **9.10.3 Zusammensetzung des Vit Kit®-Thaw**

(Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA)

Thawing Solution:

- 1 M Sukrose
- 20 % 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS)
- Gentamicin
- in einem M-199 HEPES-gepufferten Medium

Dilution Solution:

- 0,5 M Sukrose
- 20 % 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS)
- Gentamicin
- in einem M-199 HEPES-gepufferten Medium

Washing Solution:

- 20 % 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS)
- Gentamicin
- in einem M-199 HEPES-gepufferten Medium

## 9.11 Herstellerangaben

Andreas Hettich GmbH & Co. KG  
Föhrenstr. 12  
78532 Tuttlingen, Deutschland

[www.hettichlab.com](http://www.hettichlab.com)

Arcadia Products plc  
8 io Centre, Salbrook Road  
Redhill, RH1 5GJ, UK

[www.arcadia-birds.com](http://www.arcadia-birds.com)

Avian Biotech International  
1336 Timberlane Road  
Tallahassee, FL 32312-1766, USA

[www.avianbiotech.com](http://www.avianbiotech.com)

B. Braun Melsungen AG  
Carl-Braun-Str. 1  
34212 Melsungen, Deutschland

[www.bbraun.de](http://www.bbraun.de)

Becton Dickinson GmbH  
Tullastraße 8-12  
69126 Heidelberg, Deutschland

[www.bd.com](http://www.bd.com)

Bohlender GmbH  
Waltersberg 8  
97947 Grünsberg, Deutschland

[www.bola.de](http://www.bola.de)

Carl Roth GmbH & Co. KG  
Schoemperlenstraße 1-5  
76185 Karlsruhe, Deutschland

[www.carlroth.com](http://www.carlroth.com)

Carl Zeiss AG  
Carl-Zeiss-Straße 22  
73447 Oberkochen, Deutschland

[www.zeiss.de](http://www.zeiss.de)

Denver Instruments GmbH  
Robert-Bosch-Breite 10  
37079 Göttingen, Deutschland

[www.denverinstrument.com](http://www.denverinstrument.com)

Drummond Scientific Co.  
500 Parkway, Box 700  
Broomall, PA 19008, USA

[www.drummondsci.com](http://www.drummondsci.com)

---

Elanco Deutschland GmbH Werner-Reimers-Straße 2 – 4 61352 Bad Homburg	<a href="http://www.elanco.de">www.elanco.de</a>
Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22331 Hamburg, Deutschland	<a href="http://www.eppendorf.de">www.eppendorf.de</a>
Gilson Inc. P.O. Box 620027 Middleton, WI 53562-0027, USA	<a href="http://www.gilson.com">www.gilson.com</a>
Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH und Co KG Stettener Str. 22 – 24 97647 Sondheim, Deutschland	<a href="http://www.hecht-assistent.de">www.hecht-assistent.de</a>
Henry Schein VET GmbH Am Neumarkt 34 22041 Hamburg, Deutschland	<a href="http://www.henryschein-vet.de">www.henryschein-vet.de</a>
Ika®-Werke GmbH & Co. KG Janke & Kunkel-Str. 10 79219 Staufen	<a href="http://www.ika.de">www.ika.de</a>
Invitrogen™ - Molecular Probes™ 29851 Willow Creek Road Eugene, Oregon 97402, USA	<a href="http://www.lifetechnologies.com">www.lifetechnologies.com</a>
Irvine Scientific 1830 E. Warner Avenue Santa Ana, CA 92705-5505, USA	<a href="http://www.irvinesci.com">www.irvinesci.com</a>
J. RETTENMAIER & SÖHNE GmbH & Co. KG 73493 Rosenberg, Deutschland	<a href="http://www.chipsi-streu.de">www.chipsi-streu.de</a>
Johnson & Johnson Medical GmbH Robert-Koch-Straße 1 22851 Norderstedt, Deutschland	<a href="http://www.jnj.de">www.jnj.de</a>
Karl Storz GmbH & Co. KG Mittelstraße 8 78532 Tuttlingen, Deutschland	<a href="http://www.karlstorz.com">www.karlstorz.com</a>

---

Kimberly-Clark GmbH Carl-Spaeter-Straße 17 56070 Koblenz, Deutschland	<a href="http://www.kimberly-clark.de">www.kimberly-clark.de</a>
Köttermann GmbH & Co. KG Industriestr. 2–10 31311 Uetze/Hänigsen, Deutschland	<a href="http://www.koettermann.com">www.koettermann.com</a>
Leica Mikrosysteme GmbH Ernst-Leitz-Str. 17 – 37 35578 Wetzlar, Deutschland	<a href="http://www.leica-microsystems.com">www.leica-microsystems.com</a>
Liebherr-International Deutschland GmbH Hans-Liebherr-Str. 45 88400 Biberach an der Riß, Deutschland	<a href="http://www.liebherr.com">www.liebherr.com</a>
Merck KgaA Frankfurter Str. 250 64293 Darmstadt, Deutschland	<a href="http://www.merck.de">www.merck.de</a>
Mettler Toledo GmbH Ockerweg 3 Postfach 110840 35353 Gießen, Deutschland	<a href="http://de.mt.com">de.mt.com</a>
Minitüb GmbH Hauptstr. 41 84184 Tiefenbach, Deutschland	<a href="http://www.minitube.de">www.minitube.de</a>
Nunc GmbH & Co. KG Rheingastr. 32 65201 Wiesbaden	<a href="http://www..nunc.de">www..nunc.de</a>
Phillip Kirsch GmbH Postfach 1840 77608 Offenburg, Deutschland	<a href="http://www.kirsch-medical.de">www.kirsch-medical.de</a>
Reinhold Hackmann Mettinger Straße 75 49509 Recke, Deutschland	<a href="http://www.nisthoehlen.de">www.nisthoehlen.de</a>

---

Samsung Electronics GmbH Samsung House Am Kronberger Hang 6 65824 Schwalbach/Taunus	<a href="http://www.samsung.com">www.samsung.com</a>
Sarstedt AG & Co. Sarstedtstraße Postfach 1220 51582 Nürnbrecht, Deutschland	<a href="http://www.sarstedt.com">www.sarstedt.com</a>
Schülke & Mayr GmbH Robert-Koch-Str. 2 22851 Norderstedt	<a href="http://www.schuelke.com">www.schuelke.com</a>
Serumwerk Bernburg AG Hallesche Landstraße 105B 06406 Bernburg (Saale), Deutschland	<a href="http://www.serumwerk.com">www.serumwerk.com</a>
SERVA Electrophoresis GmbH Carl-Benz-Straße 7 69115 Heidelberg, Deutschland	<a href="http://www.serva.de">www.serva.de</a>
Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH Wunstorferstr. 40 30926 Seelze, Deutschland	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a>
Sigma-Aldrich Biochemie GmbH Georg-Heyken-Str. 14 21147 Hamburg, Deutschland	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a>
Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstr. 2 89555 Steinheim, Deutschland	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a>
SY-LAB Geräte GmbH Tullnerbachstr. 61-65 3011 Neupurkersdorf, Österreich	<a href="http://www.sylab.com">www.sylab.com</a>
Taylor-Wharton Germany GmbH Mildstedter Landstraße 1 25866 Mildstedt, Deutschland	<a href="http://www.taylorwharton.com">www.taylorwharton.com</a>

---

Trixie Heimtierbedarf GmbH & Co. KG Industriestr. 32 24963 Tarp, Deutschland	<a href="http://www.trixie.de">www.trixie.de</a>
Versele-Laga Kapellestraat 70 9800 Deinze, Deutschland	<a href="http://www.versele-laga.com">www.versele-laga.com</a>
Walter Schmidt Chemie GmbH Kurfürstendamm 119 10711 Berlin, Deutschland	<a href="http://www.avg-robbyrob.de">www.avg-robbyrob.de</a>
Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte (WDT) eG Siemensstraße 14 30827 Garbsen, Deutschland	<a href="http://www.wdt.de">www.wdt.de</a>
Zweibrüder Optoelectronics GmbH & Co. KG Kronenstraße 5 42699 Solingen, Deutschland	<a href="http://www.ledlenser.com">www.ledlenser.com</a>

## Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Helena Schneider



## Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Lierz für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit, sowie für unermüdliche und unverzichtbare Korrekturen derselbigen und anderer Veröffentlichungen. Ohne Ihre stetigen Erinnerungen wäre es mir manchmal sehr schwer gefallen die wissenschaftliche Arbeit zielgerichtet zu verfolgen.

Ganz besonders möchte ich auch Prof. Dr. Sabine Meinecke-Tillmann vom Institut für Reproduktionsbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover für die unglaublich hilfreichen Korrekturen der Veröffentlichungen danken. Frau Dr. Christine Ehling vom Friedrich-Loeffler-Institut gilt ebenfalls großer Dank für die praktische Unterweisung in die Kryokonservierung von Hahnensperma. Herrn Prof. Dr. Wehrend und Franziska Kotarski von der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz danke ich für die Bereitstellung diverser Arbeitsmaterialien und -geräte, sowie die Hilfe bei der Bedienung derselben. Herrn Prof. Dr. Bergmann und Frau Schubert-Porth vom Institut für Veterinär-Anatomie, -Embryologie und -Histologie der JLU Gießen danke ich für die Durchführung und Hilfe bei der Auswertung der Elektronenmikroskopie. Herrn Dr. Failing und Frau Sparenberg vom Institut für Biomathematik der JLU Gießen gilt ein herzlicher Dank für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Der Graduiertenförderung der JLU Gießen danke ich für das Graduiertenstipendium und der Loro Parque Fundación für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Für die Einarbeitung in die Spermatologie (von Vögeln), sowie für die stetige Hilfe und dafür dass er generell immer da ist danke ich Dominik Fischer. Generell darf natürlich das „Team Sperma“ nicht unerwähnt bleiben, die wohl ungewöhnlichste Arbeitsgruppe des Fachbereichs und ohne die nichts so geworden wäre, wie es letztendlich ist. Danke, Andreas Bublat, Svenja Funcke, Alex Hampe.

Den Nymphis der Klinik danke ich für ihre Mitarbeit, für schöne Stunden inmitten der Mini-Kakadus, aber hauptsächlich dafür, dass sie ihre Art so einzigartig für mich werden ließen. Nymphensittiche werden auch in Zukunft immer etwas Besonderes für mich sein.

---

Danke an Rocco, Hugenotte, Krüppelfüßchen, Captain Hook, den Polizist, Manfred, .... und so weiter. Vielen Dank auch an Samuel Strauch, der meine Vögelchen so gut versorgte und es schaffte selbst den wildesten Nymphi zu zähmen.

Meinen zahlreichen (ehemaligen) Kollegen der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der JLU Gießen möchte ich dafür danken, dass ich auch hier immer auf Unterstützung hoffen durfte, sei es in fachlicher oder persönlicher Hinsicht und dass es (fast) jeden Tag Spaß gemacht hat zur Arbeit zu kommen. Nicht umsonst hat man uns den Justus für das beste Arbeitsklima verliehen! Danke, Anne Schmidt, Susanne Paries, Kristina Maier-Sam, Lotti Parmentier, Julia Heckmann, Luisa Ziegler, Hannah Wünnemann, Lilli Schmidt, Christine Lange, Elisa Wüst, Franca Möller, Björn Oberländer, Anna Gartner, Bärbel Nachtigall, Dirk Enderlein, Bianca Görner, Antoinette Huhn, Ralf Dörr, Sandra David-Holl.

Insbesondere danke ich natürlich den Menschen, die mich auf der gesamten Reise oder aber auch nur Stationen meines wissenschaftlichen Weges auf die unterschiedlichsten Arten begleitet haben. Danke, kleine Sis, Mama und Papa, Oli, Oma, Hanna mit Family, restliche Familie dafür dass ihr einfach ihr seid. Danke, Arne, Änna, Eva, Indra für die gemeinsame Zeit in Gießen, die so unglaublich besonders für mich war und immer noch ist. Danke, Nico, Sebi, Ines dafür, dass es immer noch so ist wie früher – außer, dass wir immer älter werden und jetzt schon nicht mehr die jüngste Generation sind. Pepe, Phoebe, Phoenix, Emile, Momo – für euch lohnt sich jeder einzelne Tag.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6723-6



9 783835 196723 6