

EESTI HOLSTEINI TÕUGU SEEMENDUSPULLIDE VÄRSKE SPERMA KVALITEET

P. Padrik, Ü. Jaakma, I. Mürsepp

SUMMARY: *Quality of fresh semen collected from Estonian Holstein A.I. bulls. From February to December 1998 twenty nine dairy A.I. Holstein bulls were used to study the effects of age, breed and season on sperm concentration, the incidence of morphological abnormalities, sperm motility and intactness of plasma membrane in fresh semen. The highest percentage value of sperm abnormalities was recorded for bulls imported from Germany (12.8%), however if compared to the corresponding values for the bulls imported from the Netherlands (10.6%) or raised in Estonia (9.8%), these differences were nonsignificant ($P>0.1$). The incidence of sperm abnormalities was not significantly affected by age of the bulls and the season of semen collection. The tendency was recorded for higher incidence of sperm abnormalities during summer season (13.8%).*

The intactness of sperm plasma membrane assessed by HOS-test was affected by country of origin and age of the bull, and season of semen collection. Differences in sperm motility were caused by country of origin and age of the bull. The season effect was not detected.

These results indicated that bull age, breed and season of semen collection can influence sperm characteristics and must be considered in evaluation of bulls for breeding and planning semen collection.

Lehmade õigeaegne tiinestamine pärast poegimist on üks tähtsamaid tegureid piimatootmise efektiivsuse suurendamisel. Lehmade hea tiinestumise oluliseks eelduseks kunstlikul seemendusel on sügavkülmutatud sperma kõrge kvaliteet. Aastate jooksul on spermide liikuvuse visuaalne hindamine spermide kontsentratsiooni määramise kõrval olnud Eesti seemendusjaamades ainsaks parameetriks, mida on kasutatud sperma kvaliteedi üle otsustamisel. Vaatamata spermide sarnastele liikuvusomadustele on aga seemendustulemused erinevate pullide spermaga seemendamisel varieeruvad.

Viimastel aastatel on maailmas intensiivselt uuritud pullide fertiilsust mõjutavaid tegureid ja pullide fertiilsuse hindamist laboratoorsete meetoditega. Nende uuringute eesmärgiks on välja töötada praktikas rakendatavad sperma funktsionaaltendid, mis võimaldaksid suure tõenäosusega prognoosida pullide *in vivo* fertiilsust ja seega valida noorpulle sperma kvaliteedi alusel. On juba kindlaks tehtud spermide spetsiifiliste liikumiskarakteristikute (Hobson *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998), anormaalsete spermide esinemissageduse (Söderquist *et al.*, 1991), akrosoomi seisundi (Saacke *et al.*, 1980), munaraku *zona pellucida*'ga seostumisvõime (Fazeli *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998) ja munarakude *in vitro* viljastustulemuste (Zhang *et al.*, 1997) otsene seos pullide fertiilsusega *in vivo*.

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli selgitada spermide morfoloogiat, liikuvust ja membraanide seisundit eesti holsteini tõugu seemenduspullide värskes spermas ja nende näitajate seost pullide päritolu, vanuse ja aastaajaga, mil sperma on kogutud. Need uuringud on Eestis uudsed ja moodustavad ühe osa pikemaajalisest projektist, mille eesmärgiks on välja selgitada, kas ja milliseid pullisperma laboratoorseid funktsionaalteste on võimalik kasutada pullide fertiilsuse prognoosimisel.

Materjal ja meetodika

Töös uuriti kokku 29 eesti holsteini tõugu seemenduspulli värsket spermat veebruarist kuni detsembrini 1998. Kokku analüüsiti 74 ejakulaati, keskmiselt 2,5 ejakulaati pulli kohta.

Sugupullidelt varuti spermat 2 korda nädalas 2 ejakulaati korraga. Et esimese ja teise ejakulaadi kvaliteet võib olla erinev, siis uuriti alati esimest ejakulaati. Ühe ja sama pulli ejakulaate uuriti kahekuulise intervalliga.

Uuritud pullid jagati vanuse ja päritolu järgi rühmadesse (tabelid 1 ja 2).

Tabel 1. Pullide jaotumine vanuse järgi
Table 1. Distribution of bulls according to the age

Jrk. nr. No	6–7 aastat 6–7 years	5 aastat 5 years	3 aastat 3 years	< 3 aastat <3 years
1.	Meldo EHF 5552	Stiller-Red-ET EHF 5703	Jaap EHF 5840	Blastar EHF 5885
2.	Haiko EHF 5580	Lenker-ET EHF 5704	Jaco-ET EHF 5841	Blaag EHF 5886
3.	Martini EHF 5578	Nils EHF 5706	Lambro-ET EHF 5842	Sungar EHF 5890
4.	Hanter EHF 5579	Bert-ET EHF 5707	Lamberg-ET EHF 5843	Suntol EHF 5893
5.	Mainor EHF 5590	Adam-ET EHF 5708	Lutz-ET EHF 5844	Jimmy EHF 5892
6.	Hirvo EHF		Cedric-ET EHF 5845	Casimir EHF 5891
7.			Cels-ET EHF 5846	Erotic EHF 5888
8.				Enrico EHF 5894
9.				Bengal EHF 5908
10.				Brix EHF 5909
11.				Pildo EHF 5895

Tabel 2. Pullide jaotumine päriolu järgi
Table 2. Distribution of bulls according to the country of origin

Jrk. nr. No	Eesti HF Estonia	Saksa HF Germany	Hollandi HF Holland
1.	Meldo EHF 5552	Stiller-Red-ET EHF 5703	Jaap EHF 5840
2.	Haiko EHF 5580	Lenker-ET EHF 5704	Jaco-ET EHF 5841
3.	Martini EHF 5578	Nils EHF 5706	Lambro-ET EHF 5842
4.	Hanter EHF 5579	Bert-ET EHF 5707	Lamberg-ET EHF 5843
5.	Mainor EHF 5590	Adam-ET EHF 5708	Lutz-ET EHF 5844
6.	Hirvo EHF	Neil EHF 5001	Cedric-ET EHF 5845
7.	Blastar EHF 5885		Cels-ET EHF 5846
8.	Blaag EHF 5886		Sungar EHF 5890
9.	Bengal EHF 5908		Suntol EHF 5893
10.	Brix EHF 5909		Jimmy EHF 5892
11.	Pildo EHF 5895		Casimir EHF 5891
12.			Erotic EHF 5888
13.			Enrico EHF 5894

Käesolevas töös uuriti järgmisi pullisperma kvantitatiivseid ja kvalitatiivseid näitajaid: ejakulaadi maht, spermide kontsentratsioon, spermide liikuvus ja selle iseloom, aktiivsete spermide osakaal, spermimembraani terviklikkus (intaktsus) ja spermide morfoloogia.

1. Ejakulaadi maht määrati gradueeritud klaaskogujaga, mille ühe jaotuse väärtus oli 1 ml, ning avaldati täpsusega 0,5 ml.

2. Spermide kontsentratsioon määrati fotoelektrilise kolorimeetri abil. Selleks võeti 0,1 ml värsket spermat, millest tehti 100-kordne lahendus 2,9% naatriumtsitraadi lahuses. Valmistatud lahus valati küvetti ning asetati fotoelektrokolorimeetri kambrisse. Võrdluslahusena kasutati 2,9% naatriumtsitraadi lahust. Kasutatud fotoelektrokolorimeetri täpsus oli $0,1 \times 10^9$. Rakuloenduri ja fotoelektrokolorimeetri abil määratud spermide kontsentratsioonide erinevus ei ületanud 10%.

3. Spermide liikumisaktiivsust ja -kiirust määrati visuaalselt valgusmikroskoobis 100-kordse suurenduse abil. Vastavalt liikumise iseloomule jagati spermid nelja erinevasse rühma:

A₁-spermid, mille liikumistrajektor oli otsesuunaline ning sirgjooneline läbi uuritava vaatevälja ja liikumiskiirus kaks või rohkem spermatoosoidi pikkust sekundis;

A₂-spermid, mille liikumistrajektor oli samuti otsesuunaline, kuid liikumiskiirus oli alla kahe spermatoosoidi pikkuse sekundis;

B – ringjoonelise liikumistrajektoriga (maneežiliikumine) spermid;

C – pendeldava liikumisega spermid;

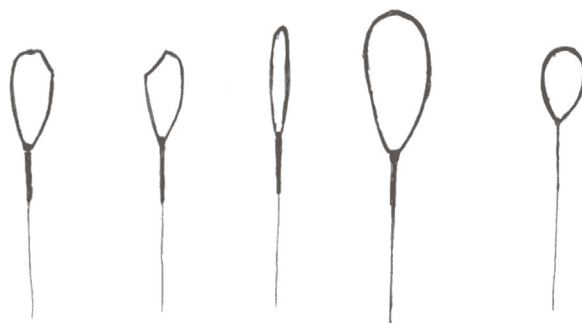
D – liikumatud spermid.

4. Lahuses aktiivselt ülesjuvate spermide hulk värskes spermas määrati *swim-up*-testi abil. Selleks võeti 15 mm läbimõelduga katseklaasi 1,5 ml toatemperatuuril (20...22 °C) olevat 2,9% naatriumtsitraadi lahust, mille alla pipeteeriti ettevaatlikult 0,1 ml värsket spermat, vältides kihtide segunemist. Katseklaas asetati termostaati 45° nurga alla ning inkubeeriti 60 minutit +37 °C juures. Seejärel määrati lahuse ülemise 2/3 osa spermatoosidide kontsentratsioon fotoelektrikolorimeetri abil ning arvutati, kui suur osa katseklaasi põhja pipeteeritud spermas sisalduvatest spermatoosididest oli võimeline ülespoole liikuma.

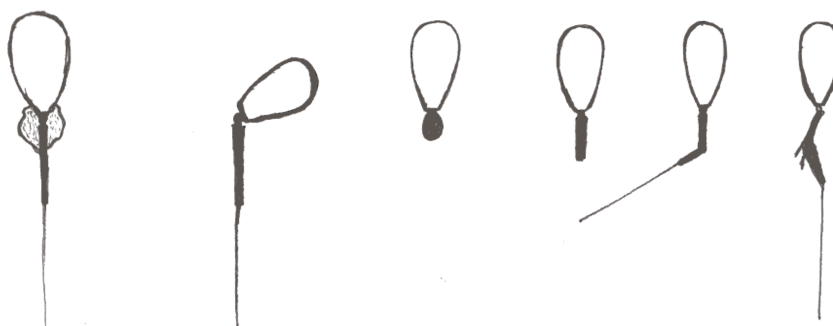
5. Intaktse membraaniga spermide osakaalu määramiseks spermaproovis kasutati hüpoosmootilist testi (HOT-testi). Katseklaasi pandi 1 ml HOT-lahust, mis koosnes 0,735 g naatriumtsitraadist, 1,351 g fruktoosist ja 100 ml destilleeritud veest (osmootne rõhk 150 mOsm/l) ning lisati 0,02 ml värsket spermat. Pärast hoolikat segamist asetati katseklaas termostaati ning inkubeeriti 60 minutit +37 °C juures. Seejärel lisati katseklaasi 0,3 ml eosini, valmistati märgpreparaat ja loendati, mitmel spermil 100-st on saba pundunud vee rakku sissevoolu tõttu. Pundunud spermatoosidide osakaal protsentides avaldati kahe preparaadi keskmisena.

6. Spermide morfoloogilise kvaliteedi hindamiseks valmistati äigepreparaat, mis fikseeriti etanoolis ja värviti SPERMAC™ (Stain Enterprises, South Africa) värvidega, kasutades tootjafirma soovitatud meetodikat. Uuringud teostati valgusmikroskoobi abil 1000-kordse suurendusega.

Iga vaateväljas oleva spermil registreeriti pea-, kaela-, keha- ja sabaosas esinevad morfoloogilised kõrvalekalded (joonised 1, 2, 3). Igas preparaadis uuriti kokku 100 spermil.



Joonis 1. Kõrvalekalded spermil pea morfoloogias
Figure 1. Bull sperm head abnormalities



Joonis 2. Spermil kaela ja keha patoloogia
Figure 2. Bull sperm neck and midpiece abnormalities



Joonis 3. Spermi saba patoloogia
Figure 3. Bull sperm tail abnormalities

Uuringu tulemuste statistilises analüüsis kasutati erinevuste olulisuse hindamiseks Studenti t-testi. Erinevused loeti usutavaks, kui $P < 0,05$. Tunnustevaheliste seoste hindamiseks kasutati Pearsoni korrelatsioonikordajat.

Uurimistulemused

Uurimistulemused näitasid, et morfoloogiliselt ebanormaalsete spermide esinemissagedus värskes pullispermias ei sõltunud oluliselt pulli päritolust (tabel 3). Siiski, mõnevõrra rohkem esines defektseid sperme saksa päritoluga pullidel, sealjuures olid morfoloogilised kõrvalekalded keskmisest sagedamad spermide kehaosas. Nii hollandi, saksa kui ka eesti pullide spermas jäi ebanormaalsete spermide esinemissagedus tervikuna normi piiridesse.

Tabel 3. Spermide morfoloogiliste kõrvalekallete esinemissagedus sõltuvalt sugupulli päritolust
Table 3. Relationship between the incidence of the sperm morphological abnormalities and country of origin of a bull

Morfoloogiline tunnus <i>Sperm abnormalities</i>	Päritolu <i>Country of origin of the bulls</i>		
	Eesti HF <i>Estonia</i> n=20	Hollandi HF <i>Holland</i> n=37	Saksa HF <i>Germany</i> n=17
1. Sabata spermid % / <i>Detached heads %</i>	2,3*	3,1*	2,1*
2. Peaosa defekte % / <i>Abnormal heads %</i>	1,8*	1,5*	2,4*
3. Kaeladefekte % / <i>Abnormal necks %</i>	1,4*	1,5*	1,8*
4. Kehadefekte % / <i>Abnormal midpieces %</i>	3,3*	2,9*	5,4*
5. Sabadefekte % / <i>Abnormal tails %</i>	1,0*	1,7*	1,4*
6. Ebanormaalseid sperme kokku % / <i>Total abnormalities %</i>	9,8*	10,6*	12,8*

n=ejakulaatide arv

* samas reas $P > 0,1$

Hollandi pullidel oli võimalik uurida keskmiselt 4,4 ejakulaati ühe pulli kohta. Selgus, et nii üksikute kõrvalekallete esinemissagedused eraldi kui ka defektsete spermide esinemissagedus kokku varieerusid erinevatel pullidel laiaades piirides. Nii oli pull Lambro puhul defektseid sperme ligi 2 korda vähem ja pull Lutzi puhul ligi 2,5 korda rohkem (vastavalt 6,5% ja 25,3%) kui hollandi päritolu pullidel keskmiselt (10,6%).

Tabel 4. Spermide morfoloogiliste kõrvalekallete esinemissagedus sõltuvalt aastaajast
Table 4. Relationship between the incidence of the sperm morphological abnormalities and the season of semen collection

Morfoloogiline tunnus <i>Sperm abnormalities</i>	Sperma varumise aeg / <i>Season of semen collection</i>			
	Talv <i>Winter</i>	Kevad <i>Spring</i>	Suvi <i>Summer</i>	Sügis <i>Autumn</i>
	n=23	n=21	n=15	n=12
1. Sabata spermid % / <i>Detached heads %</i>	3,1*	1,4*	3,7*	3*
2. Peaosa defekte % / <i>Abnormal heads %</i>	3,0*	0,4*	1,5*	3*
3. Kaeladefekte % / <i>Abnormal necks %</i>	1,1*	1,6*	2*	1,3*
4. Kehadefekte % / <i>Abnormal midpieces %</i>	3,7*	2,9*	4,6*	2,6*
5. Sabadefekte % / <i>Abnormal tails %</i>	0,7*	1,8*	2*	0,6*
6. Ebanormaalseid sperme kokku % / <i>Total abnormalities %</i>	11,6*	8,1*	13,8*	10,5*

n=ejakulaatide arv

* samas reas $P > 0,1$

Defektsete spermide esinemissagedus ei sõltunud sperma varumise aastaajast. Mõnevõrra suurem (13,8%) oli see suveperioodil (tabel 4), kuid erinevus ei osutunud oluliseks. Pullide vanuse suurenedes kuni 5 aastani oli spermidefektide esinemissagedusel spermas samuti kasvutendents, statistiliselt olulist erinevust aga vanusegruppide vahel siiski ei täheldatud (tabel 5).

Tabel 5. Spermide morfoloogiliste kõrvalekallete esinemissagedus sõltuvalt sugupullide vanusest
Table 5. Relationship between the incidence of the sperm morphological abnormalities and the age of a bull

Morfoloogiline tunnus <i>Sperm abnormalities</i>	Pullide vanus / <i>Age of the bulls</i>			
	<3 aastat <i><3 years</i>	3 aastat <i>3 years</i>	5 aastat <i>5 years</i>	6–7aastat <i>6–7 years</i>
	n=11	n=31	n=14	n=18
1. Sabata spermid % / <i>Detached heads %</i>	4,1*	6,5*	2,1*	2,0*
2. Peaosa defekte % / <i>Abnormal heads %</i>	2,3*	1,2*	2,4*	1,5*
3. Kaeladefekte % / <i>Abnormal necks %</i>	1,4*	1,5*	1,8*	1,5*
4. Kehadefekte % / <i>Abnormal midpieces %</i>	1,8*	3,2*	5,4*	3,9*
5. Sabadefekte % / <i>Abnormal tails %</i>	0,5*	2,0*	1,4*	0,5*
6. Ebanormaalseid sperme kokku % / <i>Total abnormalities %</i>	10,1*	11,1*	13,1*	8,9*

n=ejakulaatide arv

* samas reas $P > 0,1$

Pullidelt varutud ejakulaatide maht ja spermide kontsentratsioon ei sõltunud pullide päritolust (tabel 6).

Samal ajal täheldati mõningaid erinevusi spermide liikuvusomadustes: Eestist pärit pullidel oli spermas oluliselt rohkem A_1 -sperme kui Hollandist või Saksamaalt imporditud pullidel. D-sperme (liikumatuid sperme) oli saksa päritolu pullidel oluliselt rohkem kui eesti ja hollandi pullidel. HOT-testi ja *swim-up*-testi tulemused, mis väljendavad vastavalt spermide plasmamembraanide seisundit ja lahuses ülesujumise aktiivsust, olid eesti ja hollandi pullide sperma puhul oluliselt kõrgemad kui saksa pullidel. HOT-testi ja *swim-up*-testi tulemused korreleerusid positiivselt A_1 -spermide esinemissagedusega (tabel 7).

Tabel 6. Pullisperma kvantitatiivsed ja kvalitatiivsed omadused sõltuvalt pulli päritolust
Table 6. Relationship between the sperm characteristics and country of origin of the bulls

Näitaja <i>Sperm characteristic</i>	Pulli päritolu / <i>Country of origin of the bulls</i>		
	Eesti <i>Estonia</i> n=20	Holland <i>Holland</i> n=37	Saksamaa <i>Germany</i> n=17
1. Ejakulaadi maht ml / <i>Ejaculate volume (ml)</i>	7,1*	7,1*	6,7*
2. Kõnsentratsioon $n \times 10^9$ /ml / <i>Sperm concentration</i>	1,1*	1,0*	1,0*
3. Spermide liikuvus / <i>Sperm motility</i>			
A ₁ %	52,3 ^a	46,5 ^b	43,5 ^b
A ₂ %	21,0*	23*	23,7*
B %	6,7*	7,5*	5,5*
C %	4,5*	3*	3,1*
D %	16,0 ^a	20 ^a	25 ^b
4. HOT %	56,5 ^a	49,9 ^a	39 ^b
5. <i>Swim-up</i> %	45,5 ^a	45,6 ^a	35,8 ^b

n=ejakulaatide arv

reas A₁ on a ja b väärtused oluliselt erinevad, P<0,05

reas D on a ja b väärtused oluliselt erinevad, P<0,01

HOT reas on a ja b väärtused oluliselt erinevad, P<0,01

swim-up reas on a ja b väärtused oluliselt erinevad, P<0,02

* samas reas statistiliselt oluline erinevus tulemuste vahel puudub, P>0,1

Tabel 7. Sperma kvaliteedinäitajate vaheline korrelatsioon
Table 7. Correlation between semen qualitative characteristics

Näitajad <i>Sperm characteristics</i>	P	r
A ₁ /HOT	<0,1	0,57
HOT/ <i>Swim-up</i>	<0,001	0,65
A ₁ / <i>Swim-up</i>	<0,001	0,53

Peab märkima, et erinevate pullide sperma kvantitatiivsed ja kvalitatiivsed omadused varieerusid suhteliselt suurtes piirides. Nii kõikus ejakulaadi maht 5,5 ml-st 8,8 ml-ni, A₁-spermide esinemissagedus 22,5 kuni 51,0%, D-spermide esinemissagedus 15,0 kuni 50,2%, HOT-testi tulemus 20,0 kuni 58,0% ja *swim-up* tulemus 12,5 kuni 46,0%.

Sperma hulgas ja kvaliteedis statistiliselt olulist erinevust sõltuvalt aastaajast ei esinenud. Siiski võib märkida, et kevadel ja suvel oli spermide kontsentratsioon ejakulaadis mõnevõrra suurem kui sügisel ja talvel, kuid spermide liikuvus oli halvem – A₁-sperme oli vähem ja D-sperme rohkem kui sügisel-talvel (tabel 8). Liikumatus, s.o. D-spermide esinemissagedus oli kõrgeim suvel. HOT-testi ja *swim-up*-testi tulemused olid kevadel oluliselt madalamad kui sügiskuu perioodil.

Pullide vanuse suurenedes kuni 5 aastani sperma kvaliteet halvenes mõnevõrra, eriti ilmnes see liikuvusomaduste, membraanide seisundi (HOT-test) ja ülesliikumiskõnnakute (*swim-up*) puhul (tabel 9). Kuue-seitsmeaastaste pullide sperma kvaliteet osutus aga paremaks kui viieaastastel pullidel ning oli võrreldav kolmeaastaste ja nooremate pullide sperma kvaliteediga.

Tabel 8. Pullisperma kvantitatiivsete ja kvalitatiivsete omaduste sõltuvus aastaajast
Table 8. Relationship between the sperm characteristics and the season of semen collection

Näitaja <i>Sperm characteristic</i>	Sperma varumise aeg / <i>Season of semen collection</i>			
	Talv <i>Winter</i> n=23	Kevad <i>Spring</i> n=21	Suvi <i>Summer</i> n=15	Sügis <i>Autumn</i> n=12
1. Ejakulaadi maht ml / <i>Ejaculate volume ml</i>	7,0*	6,7*	7,1*	7,7*
2. Kontsentratsioon $n \times 10^9$ /ml / <i>Sperm concentration</i>	0,8*	1,1*	1,1*	1,0*
3. Spermide liikuvus / <i>Sperm motility</i>	49,3*	44,0*	44,0*	50,4*
A ₂ %	18,0*	26,0*	22,0*	24,0*
B %	9,0*	6,4*	5,6*	5,0*
C %	5,0*	2,4*	2,3*	1,6*
D %	18,7*	20,0*	26,0*	19,0*
4. HOT %	55,0 ^a	44,0 ^b	46,0 ^{ab}	53,0 ^a
5. <i>Swim-up</i> %	48,4 ^a	38,9 ^b	41,0 ^{ab}	46,0 ^{ab}

n=ejakulaatide arv

HOT reas on a ja b väärtused oluliselt erinevad, $P < 0,001$

swim-up reas on a ja b väärtused oluliselt erinevad, $P < 0,02$

* samas reas statistiliselt oluline erinevus tulemuste vahel puudub, $P > 0,1$

Tabel 9. Sperma kvantitatiivsete ja kvalitatiivsete näitajate sõltuvus pullide vanusest
Table 9. Relationship between the sperm characteristics and the age of the bulls

Näitaja <i>Sperm characteristic</i>	Pullide vanus / <i>Age of the bulls</i>			
	<3 aastat <i><3 years</i> n=11	3 aastat <i>3 years</i> n=31	5 aastat <i>5 years</i> n=14	6–7 aastat <i>6–7 years</i> n=15
1. Ejakulaadi maht ml / <i>Ejaculate volume ml</i>	8,8*	7,0*	6,7*	7,1*
2. Kontsentratsioon $n \times 10^9$ /ml / <i>Sperm concentration</i>	0,8*	1,0*	1,0*	1,1*
3. Spermide liikuvus / <i>Sperm motility</i>				
A ₁ %	48,2 ^b	46,1 ^b	41,0 ^c	53,8 ^a
A ₂ %	22,2*	24,0*	24,0*	21,0
B %	8,1*	7,3*	5,5*	6,1*
C %	4,6*	2,4*	3,1*	2,0*
D %	16,0 ^a	21,3 ^{ab}	25,0 ^b	17,0 ^a
4. HOT %	59,5 ^a	47,1 ^b	40,5 ^b	54,8 ^a
5. <i>Swim-up</i> %	52,0 ^a	43,0 ^b	35,0 ^c	48,6 ^{ab}

n=ejakulaatide arv

A₁ reas on a ja b väärtused oluliselt erinevad, $P < 0,1$; a ja c väärtused on oluliselt erinevad, $P < 0,01$

D reas on a ja b väärtused oluliselt erinevad, $P < 0,05$

HOT reas on a ja b väärtused oluliselt erinevad, $P < 0,01$

swim-up reas on a ja b väärtused oluliselt erinevad, $P < 0,01$; a ja c väärtused on oluliselt erinevad, $P < 0,002$

* samas reas statistiliselt oluline erinevus puudub, $P > 0,1$

Arutelu

Uuritud ejakulaatide arv sugupulli kohta kõikus ühest kuni viieni. Selline erinevus oli tingitud kas pulli aretusväärtusindeksi langusest, millega kaasnes sugupulli prakeerimine, või füüsilistest vigastustest, mille tagajärjel sperma varumine polnud teatud ajavahemikul võimalik, aga samuti noorpullide pidevast võtmisest põhikarja aasta jooksul. Hollandist pärit pullide puhul oli võimalik uurida keskmiselt 4,4 ejakulaati pulli kohta, sest nendelt pullidelt varuti spermat uurimisperioodil kõige intensiivsemalt.

Spermide morfoloogilisel hindamisel selgus, et ebanormaalsete spermide esinemissagedus ei sõltunud oluliselt pulli päritolust ja vanusest ega ka sperma varumise aastaajast. Kõige sagedamini täheldati spermide pea- ja kehaosa defekte. Saksamaalt pärit pullidel oli defekti-

dega sperme suhteliselt rohkem kui eesti või hollandi pullidel, kuid nende esinemissagedus jäi siiski lubatud normi piiridesse. L. Söderquist jt.(1996) on samuti oma uuringutes näidanud pulli tõust olenevaid erinevusi morfoloogiliselt defektsete spermide esinemissageduses.

Spermidefektide hulga suurenemistendentsi täheldati suveperioodil, sealjuures olid suurimad üksikute peade, ebanormaalsete keha- ja sabaosadega spermide esinemissagedused. Samasuguseid tulemusi on saanud Söderquist jt. (1996), R. Slaweta (1986), Sekoni ja Gustafsson (1987). L. Söderquist jt. (1996) on seletanud defektsete spermide suuremat hulka kuumusest põhjustatud stressiga. Samuti on teada, et isasloomade munandite temperatuuri tõus avaldab otsest mõju spermatogeneesi kulgemisele ning halvendab sperma kvaliteeti (Malmgren, Söderquist, 1998). On raske seletada spermide morfoloogiliste kõrvalekallete hulga suhtelist suurenemist pullide vanuse kasvades 5 aastani ja sellele järgnevat vähenemist 6–7-aastaste pullide puhul. Tõenäoliselt on testitud ejakulaatide hulk veel liiga väike ja erineva päritoluga pullide jaotus vanuserühmadesse ebahühtlane, et anda vastust sellele küsimusele, kas pulli vanusel ja defektsete spermide esinemissagedusel on statistiliselt olulist seost. Peab märkima, et värskes spermas defektsete spermide esinemissageduse ja pulli fertiilsuse vahel on mitmed autorid leidnud olulise korrelatsiooni (Barth, 1992; Söderquist *et al.*, 1991). Pärast külmutamist ja sulatamist registreeritud morfoloogilised kõrvalekalded on enamasti sperma käsitlemise tulemus ja korreleeruvad harva pulli üldise fertiilsusega, küll aga võivad mõjutada konkreetse seemendusdoosi kvaliteeti (Rodriguez-Martinez, 1998).

Sperma teistest kvaliteedinäitajatest arvestatakse seni aretustöös kõige rohkem spermide kontsentratsiooni ja liikuvust. Kehtna KSJ-s on sperma kontsentratsiooni ja spermide liikuvuse alusel aretustöökõlmatuks tunnistatud 15% noorpullidest (P. Padriku avaldamata andmed).

Kontsentratsiooniga alla $0,7 \times 10^9$ spermililliitri kohta pole võimalik spermat efektiivselt lahjendada ja sügavkülmutada. Kontsentratsiooni olulisust sügavkülmutamisel on märkinud Rowson ja Polge (1953), Eibl ja Zober (1955), Erickson ja Graham (1959). Nende andmetel taluvad sügavkülmutamist paremini keskmise tihedusega ejakulaadid. Oluliseks sperma kontsentratsiooni mõjutavaks teguriks on õige sugupullide kasutamise režiim. Elliott jt. (1956) ja Iljinskaja (1963) täheldasid, et spermatoosidide aktiivsus on suurem, kui spermat varutakse viiepäevase intervalliga.

Seemendusjaama igapäevases praktikas arvestatakse spermide liikuvuse all otseliikuvate spermide üldhulka. Nagu näitavad käesoleva uurimistöö tulemused, tuleks suuremat tähelepanu pöörata A_1 -spermidele ehk otseliikuvatele kiiretele spermidele, mille hulgaga korreleeruvad intaktsete membraanidega ja aktiivselt ülesjuvate spermide (A_1/HOT $P < 0,1$, $r = 0,57$; $A_1/swim-up$ $P < 0,001$, $r = 0,53$) esinemissagedused ejakulaadis. Ehkki visuaalselt hinnatud spermide liikuvusel ja pulli *in vivo* fertiilsusel pole tihti leitud statistiliselt olulist seost (Januskauskas, 1995), on kompuuteranalüüsi abil saadud spetsiifiliste liikumiskarakteristikute ja külmutatud/sulatatud spermaga saadud seemendustulemuste positiivset korrelatsiooni näidatud mitme uurija poolt (Hobson *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998).

Väga oluliseks sperma kvaliteedinäitajaks tuleks pidada intaktse membraaniga spermatoosidide esinemissagedust spermas, mis tehakse kindlaks hüpoosmootse testiga. HOT-testi abil on võimalik kindlaks teha vigastamata ja normaalselt funktsioneeriva membraaniga spermide hulka nii värskes kui ka sügavkülmutatud/sulatatud spermas. Hüpoosmootse tingimustes suurendab rakku tunginud vesi spermil mahtu ja spermil plasmamembraan venib välja (Malmgren, 1997). Seega, plasmamembraani väljavenimine sarnaselt täispuhutava õhupalliga annab tunnistust intaktsest membraanist. Meie uuringud demonstreerisid selgelt, et A_1 -spermide hulga ja HOT-testi tulemuste vahel uuritud ejakulaatides esineb positiivne korrelatsioon ($r = 0,57$): mida rohkem on ejakulaadis A_1 -sperme, seda kõrgem on ka HOT-testi tulemus. Mida rohkem on A_1 -sperme värskes spermas, seda suurem on tõenäosus, et nende hulk jääb suureks ka pärast külmutamist, mis on väga oluline tegur viljastumisprotsessis. Correa jt. (1997) on demonstreerinud HOT-testi tulemuste ja pullide fertiilsuse tihedat seost.

HOT-testi ja A_1 -spermide esinemissagedus oli tihedas seoses ka *swim-up*-testi tulemustega (*Swim-up*/ A_1 $P < 0,001$, $r = 0,53$; *Swim-up*/HOT $P < 0,001$, $r = 0,65$). *Swim-up*-testi abil on võimalik kindlaks teha spermide populatsiooni suurust, mis on võimeline aktiivseks lahuse ülemistesse kihtidesse ujumiseks. *Swim-up*-testi tulemuste ja pullide *in vivo* fertiilsuse vahelist seost on demonstreerinud oma uuringutes Zhang jt. (1998).

Meie uurimistulemused näitasid, et kõige rohkem A_1 -sperme, parim HOT ja *swim-up* tulemus oli eesti päritolu pullidel. Üksikute pullide sperma analüüs Hollandist pärit pullide

rühmas demonstreeris aga küllalt suuri erinevusi seemenduspullide hulgas, mistõttu on tulevikus hädavajalik lehmade seemendustulemuste ja konkreetsete pullide sperma kvaliteedinäitajate, eriti A₁-spermide osatähtsuse, HOT ja *swim-up* tulemuste võrdlemine nende analüüsimetodite sobivuse üle otsustamiseks pulli fertiilsuse prognoosimisel.

Nii nagu spermide morfoloogiat, mõjutas sperma varumise aastaaeg mõningal määral ka spermide liikuvust, plasmamembraanide intaktsust ja ülesujumise aktiivsust. Tulemused olid suhteliselt paremad sügise-talveperioodil ja halvemad kevadel ja suvel. Nii nagu spermide morfoloogia puhul, saab seda seletada põhiliselt välistemperatuurist tingitud muutustega, sest söötmis- ja pidamistingimused on seemenduspullidel stabiilsed.

Kokkuvõte

Uurimistööst saadud andmetest selgus, et olulist erinevust värske sperma morfoloogilises kvaliteedis sõltuvalt pulli päritolumaast ei ole. Eestist pärit seemenduspullide sperma oli aga parem Saksa HF ja Hollandi HF tõugu pullide spermast liikuvusomaduste ja membraanide seisundi osas.

Aastaaeg ei avaldanud olulist mõju spermide morfoloogilisele kvaliteedile. Siiski võis täheldada defektsete spermide suurimat esinemissagedust suvel, kusjuures kasvas nii spermi pea-, keha- kui ka sabaosa defektide esinemissagedus. Spermide liikuvus ja membraanide seisund olid sügisel ja talvel mõnevõrra paremad kui kevade- ja suveperioodil. Sügisel ja talvel oli spermas rohkem A₁-sperme, intaktse membraaniga ja aktiivselt ülesujuvaid sperme. Seda arvestades tuleks töö seemendusjaamas organiseerida nii, et intensiivsemalt varutaks sugupullidelt spermat nimelt sügistalvisel perioodil.

Uurimistööd tuleb jätkata selgitamaks pulli vanuse mõju sperma kvaliteedile. Käesolevas töös analüüsitud ejakulaatide hulk oli suhteliselt väike ja erineva päritoluga pullide jaotus vanuserühmadesse ebahütlane selleks, et anda kindlat vastust küsimusele, kas pulli vanus mõjutab oluliselt sperma kvaliteeti.

Uurimistööd toetas Eesti Teadusfond, uurimistoetus 3559.

Kirjandus

- Barth, A. D. The relationship between sperm abnormalities and fertility. – In: Proc. 14th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. Nat. Assoc. Anim. Breeders, p. 47...63, 1992.
- Correa, J. R., Pace, M. M., Zavos, P. M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. – Theriogenology, vol. 48, p. 721...731, 1997.
- Eibl, K., Zober, H. F. Zur Technik der Samentiefkühlung. Dtsch. Tierärztl. Wschr., 62, 31, 1955.
- Elliott, F. I., Elliott, E. J., Ohms, J. I., Willett E. L. The effect of collection interval upon some characteristics of bovine spermatozoa and their survival through freezing. Dairy Sci., 39, 921, 1956.
- Ericson, W. E., Graham, E. F. Factors affecting the fertility of frozen bovine spermatozoa. Dairy Sci., 42, 5, 20, 1959.
- Fazeli, A. R., Zhang, B. R., Steenweg, W., Larsson, B., Bevers, M. M., Van der Broek, J., Rodriguez-Martinez, H., Colenbrander, B. Relation between sperm-zona pellucida binding assay and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. – Theriogenology, vol. 48, p. 853...863, 1997.
- Hobson, S., Roe, H., Houghton, A. Relationships between sperm motion and the achievement of fertility. In: Proc. Meet. "Techniques for Gamete Manipulation and Storage", Hamilton, New Zealand, June 22–25:55, 1996.
- Пјинская: Ильинская Т. П. О результатах замораживания семени быков в Белоруссии. Новое в племенном деле и искусственном осеменении сельскохозяйственных животных. Из-во сельхоз. литер. журналов и плакатов. Москва, стр. 389...397, 1963.
- Januskauskas, A. Studies on the assessment of post-thaw sperm viability in Swedish dairy AI bulls. – Thesis, Uppsala, 28 pp., 1995.

- Malmgren, L., Söderquist, L. Effects of scrotal insulation on the viability of fresh, cooled stored, and frozen-thawed stallion semen. – In: *Gametes: Development and functions*, Serono Symposia, p. 570, 1998.
- Malmgren, L. Assessing the quality of raw semen: a review. – *Theriogenology*, vol. 48, p. 523...530, 1997.
- Rodriguez-Martinez, H. Optimization of Sperm Quality in AI bulls. – *Reprod. Dom. Anim.*, vol. 33, p. 233...237, 1998.
- Rowson, L. E. A., Polge, C. Storage of bull semen at -79°C and fertility results for up to 12 months, *Vet. Rec.*, 65, 677-679, 1953.
- Saacke, R. G., Marshall, C. E., Vinson, W. E., O'Connor, M. L., Chandler, J. E., Mullins, K. J., Amann, R. P., Wallace, R. A., Vincel, W. N., Kellgren, H. C. Semen quality and heterospermic insemination in cattle. – *Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insemin.* vol. 5, p. 75...78, 1980.
- Sekoni, V. O., Gustafsson, B. K. Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial used for artificial insemination. – *Br. Vet. J.*, vol. 143, No. 4, p. 312...317, 1987.
- Slaweta, R. Morphological changes in the acrosome of bull spermatozoa during various seasons of the year, *Pol Arch Weter*, 26(3-4):67-73, 1986.
- Söderquist, L., Jansson, L., Larsson, K., Einarsson, S. Sperm morphology and fertility in dairy AI bulls. – *J. Vet. Med.*, vol. 38, p. 534...543, 1991.
- Söderquist, L., Jansson, L., Håård, M., Einarsson, S. Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy AI bulls. – *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 44, p. 91...98, 1996.
- Zhang, B. R., Larsson, B., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez H. Relationship between embryo development in vitro and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. – *Theriogenology*, vol. 48, p. 221...231, 1997.
- Zhang, B. R., Larsson, B., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. – *Int. J. Andrology*, 21, 1-10, 1998.