

EESTI HOLSTEINI TÕUGU SUGUPULLIDE SPERMIDE MORFOLOOGIA, SEDA MÕJUTAVAD TEGURID JA SEOS EMASLOOMADE TIINESTUMISEGA

P. Padrik, Ü. Jaakma

ABSTRACT. *Sperm morphology in Estonian Holstein Dairy Bulls, factors affecting it and relation to fertility. Effective milk production does not depend only on valuable genetics of dairy cows but also on many other factors including optimal calving interval. Conception of cows after calving is significantly influenced by the quality of frozen bull semen.*

The aim of the current study was to evaluate sperm morphology of Estonian Holstein bulls, the factors influencing it and the correlation between the percentage of normal spermatozoa in fresh semen and bulls' in vivo fertility expressed as non-return rate (NRR) of dairy cows and heifers.

The results of the study showed that increase in bulls' age was accompanied by the significant increase in the incidence of sperm abnormalities. The highest incidence of sperm abnormalities was detected in the semen of 6–7 years old bulls. Frequency of sperm abnormalities in fresh semen varied also between the seasons. The incidence of abnormal spermatozoa was the highest in the ejaculates collected in summer, from June to August. The bulls with the CVM-carriers in their pedigree during previous three generations had more abnormal spermatozoa in the fresh semen than control bulls.

The study of sperm morphology dynamics in young dairy bulls revealed that the frequency of sperm abnormalities was high in the first ejaculates. The improvement in sperm morphology was observed after 6–8 semen collections and the percentage of sperm abnormalities stabilised after 10–12 collections.

A weak positive correlation was detected between the incidence of morphologically normal spermatozoa in the fresh semen and results of the hypo-osmotic test of frozen/thawed semen but not between the morphology and motility of spermatozoa in fresh or frozen/thawed semen.

The positive correlation was obtained between the percentage of normal spermatozoa in the fresh semen and 60-days NRR of cows and heifers both on ejaculate and bull level ($r=0.51$ and $r=0.49$, respectively, $P<0.01$).

Key words: dairy bull, sperm morphology, age, season, fertility.

Sissejuhatus

Efektiivne piimatootmine ei sõltu ainult väärtusliku geneetilise materjali olemasolust, vaid ka paljudest teistest faktoritest, mille hulgas on tähtsal kohal lehmade optimaalne poegimisvahemik. Lehmade edukat tiinestamist pärast poegimist mõjutab oluliselt sügavkülmutatud pullisperma kvaliteet.

Aastaid on Eesti seemendusjaamades pullispermat hinnatud selle mahu, kontsentratsiooni ja spermide liikuvuse järgi. Paraku on sügavkülmutatud pullisperma kvaliteedi hindamine nende näitajate põhjal väga subjektiivne ning ei anna täpset informatsiooni ei konkreetse pulli ega ka ejakulaadi viljastamisvõime kohta. Seepärast on oluline välja töötada ja rakendada uusi sperma hindamise meetodeid, mis annaksid objektiivse ülevaate sperma kvaliteedist ja mille tulemused korreleeruksid hästi emasloomade tiinestumisega. Oluline on, et hindamismeetodid sobiksid sealjuures oma lihtsuse ja hinna poolest kasutamiseks seemendusjaamades.

Viimastel aastatel on maailmas intensiivselt uuritud pullide viljakust mõjutavaid tegureid ja sperma viljastamisvõime hindamist laboratoorsete meetoditega. Nende uuringute eesmärgiks on välja töötada praktikas rakendatavad sperma funktsionaaltendid, mis võimaldaksid valida noorpulle sperma kvaliteedi alusel ja prognoosida nende *in vivo* viljakust. On juba kindlaks tehtud spermide spetsiifiliste liikumiskarakteristikute (Saacke, 1983; Amann, 1989; Söderquist, 1991a; Januskauskas, 1995), akrosoomi seisundi (Saacke, White, 1972; Saacke jt, 1980), spermimembraani intaktsuse (Revell, Mrode, 1994; Januskauskas jt, 1996; Correa jt, 1996), munaraku läbipaistva tsooniga seostumisvõime ja munarakkude *in vitro* viljastamistulemuste (Kruip jt, 1992; Shamsuddin ja Larsson, 1993; Bredbacka jt, 1997; Zhang jt, 1997) otsene seos pulli viljakusega *in vivo*.

Üheks võimalikuks meetodiks sugupullide sperma kvaliteedi hindamisel on spermide morfoloogiliste tunnuste määramine. Mitmed autorid on leidnud, et spermide morfoloogiline kvaliteet on oluliselt seotud emasloomade tiinestumisega (Linford jt, 1979; Söderquist jt, 1991b; Barth, 1992; Correa jt, 1997; Zhang jt, 1998; Cranfield, Revell, 2000). Eriti oluline on hinnata noorpullide spermide morfoloogiat, sest see võib otseselt mõjutada testseemenduste tulemusi ning seeläbi uue geneetilise materjali kasutuselevõttu aretustöös.

Käesoleva töö eesmärgiks on välja selgitada, millised faktorid mõjutavad eesti holsteini tõugu pullide spermide morfoloogilist kvaliteeti, milline on seos värske pullisperma morfoloogia ja emasloomade tiinestumise vahel ning kas ja kuidas oleks võimalik aretustöös kasutada sugupulle, kelle aretusindeks on kõrge, kuid patoloogiliste spermide osakaal värskes spermas suur. Selleks uuriti patoloogiliste spermide esinemissagedust pullispermas olenevalt pulli vanusest, aastaajast, päritolust ja CVM-geeni kandvate eellaste esinemisest pulli sugupuus; noorpullide spermide morfoloogilise kvaliteedi muutumise dünaamikat; spermide morfoloogilise kvaliteedi ja emasloomade tiinestumise vahelist seost ning spermide morfoloogilise kvaliteedi ja funktsionaalsete parameetrite vahelist seost.

Materjal ja meetodika

Kokku uuriti 111 sugupulli 3681 ejakulaati, mis koguti ajavahemikus veebruar 1998 kuni märts 2002. Selle perioodi vältel võeti hinnatud pullidelt keskmiselt 5–8 ning noorpullidelt 2–5 ejakulaati kuus.

1. Selgitamiseks sugupulli vanuse mõju spermide morfoloogiale jagati pullid kolme gruppi: 1–3-aastased (87 pulli), 4–5-aastased (16 pulli) ja 6–7-aastased (18 pulli).

2. Sperma varumise aastaaja mõju selgitamiseks uuriti spermide morfoloogilist kvaliteeti talvel (detsember, jaanuar, veebruar; 111 pulli), kevadel (märts, aprill, mai; 110 pulli), suvel (juuni, juuli, august; 106 pulli) ja sügisel (september, oktoober, november; 109 pulli) varutud ejakulaatides.

3. Pulli päritolumaa mõju väljaselgitamiseks jagati pullid nelja rühma vastavalt sellele, kust nad ise imporditi elusloomana või embrüona või kust imporditi nende emad tiinetena. Moodustatud rühmad olid järgmised: Eesti (36 pulli), Holland (34 pulli), Saksamaa (19 pulli) ja USA (17 pulli).

4. Seose selgitamiseks spermide morfoloogia ja CVM-geeni kandvate eellaste esinemise vahel pulli sugupuus uuriti 40 CVM-geeni kandvat esivanemat omava pulli ja 66 mitteomava pulli ejakulaate.

5. Noorpullide spermide morfoloogia muutumise dünaamika väljaselgitamiseks uuriti 41 noorpulli 820 ejakulaati. Jälgiti, kuidas muutub noorpulli sperma morfoloogiline kvaliteet esimese 20 ejakulaadi varumise jooksul, kui noorpullilt varutakse kuus 2–5 ejakulaati.

6. Spermide morfoloogilise kvaliteedi ja tiinestumise vahelise seose kindlakstegemiseks uuriti 29 sugupulli 91 ejakulaati. Nendest ejakulaatidest saadud seemendusdoosidega tehti 6220 katseseemendust (keskmiselt 206 seemendust pulli kohta ja 70 seemendust ejakulaadi kohta). Tulemusi hinnati tiinete emasloomade protsendi järgi 60 päeva möödudes.

7. Spermide morfoloogiliste ja funktsionaalsete parameetrite vahelise seose väljaselgitamiseks uuriti 10 pulli 40 ejakulaati. Jälgiti, kas ja milline on korrelatsioon spermide morfoloogia ja nende liikuvuse ning membraanide terviklikkuse vahel, hinnatuna osmoresistentsuse alusel.

Spermide morfoloogiliseks uurimiseks valmistati äigepreparaat, mis fikseeriti etanoolis ja värviti SPERMACTM (Stain Enterprises, Lõuna-Aafrika Vabariik) värvidega, kasutades tootjafirma soovitatud meetodikat. Värvitud preparaati uuriti valgusmikroskoobi abil 1000-kordse suurendusega, analüüsides igast preparaadist 100 spermi. Spermidel fikseeriti morfoloogilised defektid pea-, saba-, keha-, akrosoomi- ja kaelaosas ning proksimaalse ja/või distaalse tsütoplasma tilgakese olemasolu (joonised 1, 2, 3).

Spermide liikumisaktiivsust ja -kiirust uuriti visuaalselt valgusmikroskoobis 100-kordse suurenduse abil värskes ja sügavkülmutatud spermas. Vastavalt liikumise iseloomule jagati spermid nelja erinevasse rühma:

A₁ – spermid, mille liikumistrajektor oli otsesuunaline ja sirgjooneline läbi uuritava vaatevälja ja liikumiskiirus kaks või rohkem spermi pikkust sekundis;

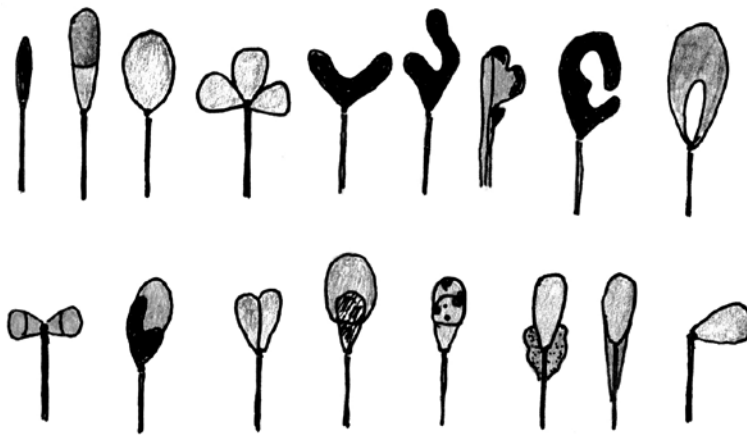
A₂ – spermid, mille liikumistrajektor oli samuti otsesuunaline, kuid liikumiskiirus oli alla kahe spermi pikkuse sekundis;

B – ringjoonelise liikumistrajektoriga (maneežliikumise) spermid;

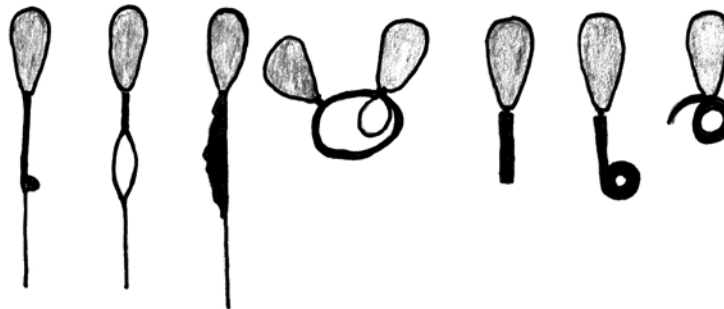
C – pendeldavad spermid;

D – liikumatud spermid.

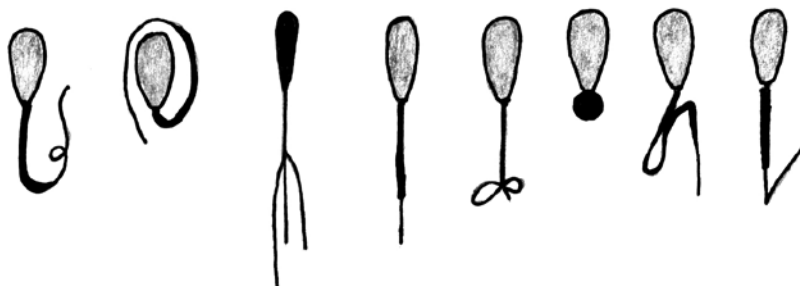
Intaktse (funktsionaalselt tervikliku) membraaniga spermide osakaalu määramiseks kasutati hüpoosmootseid teste (HOT). Traditsioonilise hüpoosmootse testi HOT-1 (Jeyendran jt, 1984) puhul sulatati spermakõrreke +35 °C juures vesivannil 20 sekundi jooksul ja tühjendati katseklaasi (värske sperma puhul pipeteeriti katseklaasi 0,2 ml pullispermat) 1 ml HOT lahusesse (0,735 g naatriumtsitraati, 1,351 g fruktoosi, 100 ml destilleeritud vett; lahuste osmootne rõhk 150 mOsm/kg). Pärast 60-min inkubeerimist +37 °C juures lisati 0,3 ml eosini, valmistati märgpreparaat ja loendati pundunud sabaga spermid 1000-kordsel suurendusel faaskontrastmikroskoobis. Igast preparaadist loendati 100 spermi ning pundunud spermide osakaal avaldati protsentides kahe preparaadi keskmisena.



Joonis 1. Patoloogilise pea, akrosoomi ja kaeladefektidega spermid värskes pullispermas
Figure 1. Bull sperm head, neck and acrosome abnormalities



Joonis 2. Patoloogilise keskosaga spermid värskes pullispermas
Figure 2. Bull sperm midpiece abnormalities



Joonis 3. Patoloogilise sabaga spermid värskes pullispermas
Figure 3. Bull sperm tail abnormalities

HOT-2 test viidi läbi vastavalt varem meie poolt avaldatud metoodikale (Padrik, 1999). Selle abil selgitati, kuidas muutub pundunud spermide osakaal erinevates hüpotoonilistes NaCl-lahustes (osmootne rõhk 66; 97; 130 ja 161 mOsm/kg). Igast preparaadist uuriti 100 spermide 1000-kordsel suurendusel ning pundunud sabaga spermide osakaal avaldati protsentides kahe preparaadi keskmisena (joonis 4). Iga ejakulaadi jaoks arvutati Δ HOT, mille saamiseks pundunud spermide osakaal 0,2%-lise NaCl lahuses (66 mOsm/kg) lahutati samalaadsest näidust, mis oli saadud 0,4%-lise NaCl lahuses (130 mOsm/kg) ning avaldati vastavalt kas pluss- või miinusmärgiga.

HOT-3 testi (Padrik, Jaakma, 2000) sulatati kolm spermakõrt, mis tühjendati 3 ml 2,9% naatriumsitraadi lahusesse (Tallinna Farmaatsiatehas). Kohe pärast seda pipeteeriti 0,1 ml spermide suspensiooni katseklaasidesse erineva osmootse rõhuga NaCl lahusesse (66; 97; 130 ja 161 mOsm/kg). Igast preparaadist loendati 100 spermide (1000-kordsel suurendusel) ning pundunud sabaga spermide osakaal avaldati protsentides kolme preparaadi keskmisena. Δ HOT arvutati samasugusel viisil nagu HOT-2 testi puhul. Ülejäänud spermide suspensioon naatriumsitraadi lahuses asetati termostaati +37 °C juurde kuueks tunniks ning pärast seda korraldati kirjeldatud katset inkubeeritud spermidega, selgitamaks spermimembraanide funktsionaalsete omaduste muutumist säilitusaja jooksul.

Tulemuste statistilises analüüsis kasutati erinevuste olulisuse hindamiseks t-testi ja dispersioonanalüüsi. Tunnustevahelised erinevused loeti oluliseks, kui $P \leq 0,05$ (* kui $P < 0,05$; ** kui $P < 0,01$; *** kui $P < 0,001$).

Tunnustevaheliste seoste hindamiseks kasutati Pearsoni korrelatsioonikordajat. Tunnustevahelist seost loeti järgnevalt: nõrk seos, kui $|r| \leq 0,3$; keskmine seos, kui $0,3 < |r| < 0,7$; tugev seos, kui $|r| \geq 0,7$.

Uurimistulemused

Uuringud näitasid, et patoloogiliste spermide esinemissagedus värskes pullispermas suurenes sugupulli vanuse kasvades (tabel 1).

Tabel 1. Pulli vanuse mõju spermide morfoloogilisele kvaliteedile
Table 1. Influence of the bulls' age on the incidence of sperm abnormalities

Morfoloogiline tunnus (%) <i>Sperm abnormalities (%)</i>	Pulli vanus aastates / <i>Age of the bulls (years)</i>		
	1–3	4–5	6–7
Pulle/ Bulls	87	16	18
Ejakulaate / <i>Ejaculates</i>	2439	569	473
1. Patoloogiline pea / <i>Abnormal head</i>	3,2	3,3	3,0
2. Sabata sperm / <i>Detached head</i>	2,1***	3,0***	3,8***
3. Patoloogiline akrosoom / <i>Abnormal acrosome</i>	0,5	0,5	0,6
4. Kaela defekt / <i>Abnormal neck</i>	0,7	0,7	0,8
5. Proksimaalne ja/või distaalne tsütoplasma tilk <i>Proximal&distal cytoplasmic droplets</i>	0,9*	0,8*	1,2*
6. Patoloogiline keskosa / <i>Abnormal midpiece</i>	3,1***	3,5***	3,9***
7. Patoloogiline saba / <i>Abnormal tail</i>	0,9	1,1	1,1
8. Patoloogilisi sperme kokku / <i>Total abnormalities</i>	11,3**	13,6**	14,3**

Kõige enam patoloogilisi sperme leidis 6–7-aastaste pullide spermas – keskmiselt 14,3%. Suurimat muutust täheldati sabata spermide esinemises: pulli vananedes suurenes nende esinemissagedus ligi 2 korda. Oluliselt suurenes ka keskosa defektide ning tsütoplasmatilgakeste esinemissagedus (vastavalt 1,2 ja 1,3 korda). Erinevusi ei olnud spermide pea-, kaela-, saba- ja akrosoomipiirkonna defektide osas.

Erinevatel aastaaegadel kogutud spermat uurides selgus, et kõige enam esines patoloogilisi sperme suvel ning kõige vähem talvel (keskmiselt vastavalt 13,3% ja 9,9%; tabel 2) ning kõigi meie uuritud spermide morfoloogiliste tunnuste osas esinesid olulised erinevused.

Lisaks pullide vanusele ja sperma varumise aastaajale sõltus patoloogiliste spermide esinemissagedus värskes spermas ka pullide päritolumaast (tabel 3). Kõige rohkem esines patoloogilisi sperme USA ja Hollandi pullidel. Nii Saksa kui ka Eesti pullide spermas jäi patoloogiliste spermide esinemissagedus tervikuna ühesugusele tasemele. Olulisi erinevusi täheldati sabata spermide ning patoloogilise keskosa ja -peaga spermide esinemissageduses, kusjuures esimest nimetatud defekti esines rohkem Eesti ja USA pullide spermas ning teist saksa pullide spermas. Patoloogilise peaga sperme oli kõige rohkem USA pullide spermas.

Tabel 2. Aastaaegade mõju pullisperma morfoloogilisele kvaliteedile**Table 2.** Incidence of sperm abnormalities in different seasons

Morfoloogiline tunnus (%) <i>Sperm abnormalities (%)</i>	Aastaaeg / Season			
	Talv <i>Winter</i>	Kevad <i>Spring</i>	Suvi <i>Summer</i>	Sügis <i>Autumn</i>
Pulle / Bulls	111	110	106	109
Ejakulaate / Ejaculates	904	1038	535	1204
1. Patoloogiline pea / <i>Abnormal head</i>	2,2***	3,3***	3,5***	3,3***
2. Sabata sperm / <i>Detached head</i>	1,9**	2,5**	3,0**	2,3**
3. Patoloogiline akrosoom / <i>Abnormal acrosome</i>	0,5*	0,6*	0,6*	0,4*
4. Kaela defekt / <i>Abnormal neck</i>	0,4**	0,7**	0,8**	0,7**
5. Proksimaalne ja/või distaalne tsütoplasma tilk <i>Proximal&distal cytoplasmic droplets</i>	0,8***	1,2***	1,0***	0,9***
6. Patoloogiline keskosa / <i>Abnormal midpiece</i>	3,2***	3,4***	3,6***	3,1***
7. Patoloogiline saba / <i>Abnormal tail</i>	0,9**	1,0**	0,8**	0,7**
8. Patoloogilisi sperme kokku / <i>Total abnormalities</i>	9,9***	12,7***	13,3***	11,4***

Tabel 3. Sugupulli päritoluma ja sperma morfoloogiline kvaliteet**Table 3.** Relationships between the incidence of sperm abnormalities and country of origin of the bulls

Morfoloogiline tunnus (%) <i>Sperm abnormalities (%)</i>	Pulli päritolu / Country of origin of the bulls			
	Eesti <i>Estonia</i>	Holland <i>Holland</i>	Saksamaa <i>Germany</i>	USA <i>USA</i>
Pulle / Bulls	36	34	19	17
Ejakulaate / Ejaculates	892	1295	644	596
1. Patoloogiline pea / <i>Abnormal head</i>	2,7*	3,1*	3,1*	3,6*
2. Sabata sperm / <i>Detached head</i>	2,9***	2,5***	1,5***	2,7***
3. Patoloogiline akrosoom / <i>Abnormal acrosome</i>	0,5	0,5	0,5	0,6
4. Kaela defekt / <i>Abnormal neck</i>	0,7	0,7	0,6	0,8
5. Proksimaalne ja/või distaalne tsütoplasma tilk <i>Proximal&distal cytoplasmic droplets</i>	1,0	1,0	1,1	1,0
6. Patoloogiline keskosa / <i>Abnormal midpiece</i>	3,2**	3,3**	3,7**	3,0**
7. Patoloogiline saba / <i>Abnormal tail</i>	0,8	1,0	1,1	0,4
8. Patoloogilisi sperme kokku / <i>Total abnormalities</i>	11,8*	12,0*	11,6*	12,1*

Eesti holsteini tõugu sugupulle pole seni uuritud CVM-geeni esinemise suhtes, kuid on teada, et paljudel neist esineb sugupuus nimetatud geeni kandvaid eellasi. Meie uuringutes selgus, et sugupullidel, kellel esines CVM-geeni kandvaid eellasi eelneva kolme põlvkonna jooksul, oli spermide morfoloogiline kvaliteet oluliselt madalam kui pullidel, kel selliseid eellasi polnud (tabel 4).

Pullidel, kelle eellaste hulgas oli CVM-geeni kandjaid, esines peadefektiga, sabatuid, patoloogilise kaela ja keskosaga sperme oluliselt rohkem kui pullidel, kellel CVM-geeniga eellasi polnud. Muutused patoloogiliste spermide esinemissageduses sõltusid sellest, kas CVM-geen ilmnis isa- või emapoolses liinis või mõlemas (tabel 5).

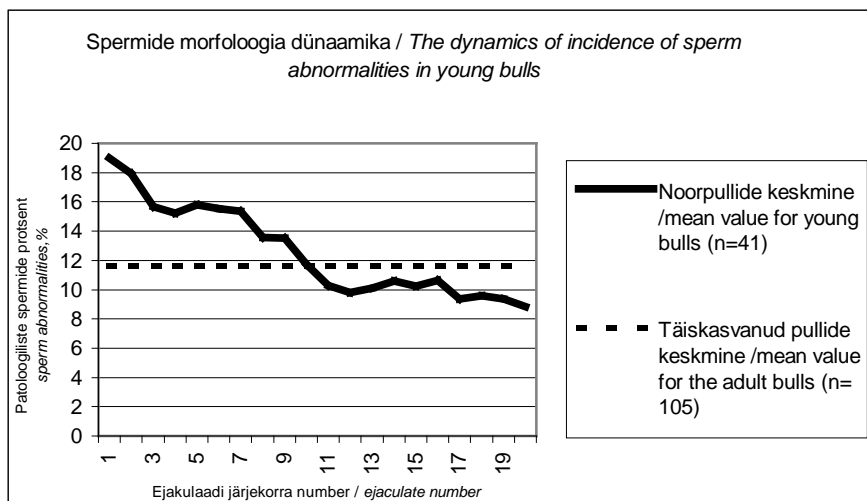
Kõige vähem esines pullispermas patoloogilisi sperme juhul, kui CVM-geeni kandev eellane oli emapoolses liinis. Patoloogiliste spermide esinemissagedus oli suurim nende pullide spermas, kelle põlvnemises esinesid CVM-geeni kandvad eellased mõlemas liinis.

Tabel 4. Spermi morfoloogiline kvaliteet sõltuvalt CVM-geeni kandvate eellaste esinemisest pulli sugupuus
Table 4. Relationships between the incidence of the sperm abnormalities and presence of CVM-gene carriers in bull's pedigree

Morfoloogiline tunnus (%) <i>Sperm abnormalities (%)</i>	CVM-geeni kandjad eelneva 1–3 põlvkonna jooksul <i>CVM-gene carriers during 1–3 previous generation</i>	
	ei esinenud <i>no</i>	esines <i>yes</i>
Pulle / <i>Bulls</i>	66	40
Ejakulaate / <i>Ejaculates</i>	1845	1793
1. Patoloogiline pea / <i>Abnormal head</i>	2,9***	4,3***
2. Sabata sperm / <i>Detached head</i>	1,8***	3,1***
3. Patoloogiline akrosoom / <i>Abnormal acrosome</i>	0,5	0,6
4. Kaela defekt / <i>Abnormal neck</i>	0,6**	0,7**
5. Proksimaalne ja/või distaalne tsütoplasma tilk <i>Proximal&distal cytoplasmic droplets</i>	0,9	0,9
6. Patoloogiline keskosa / <i>Abnormal midpiece</i>	3,1**	3,4**
7. Patoloogiline saba / <i>Abnormal tail</i>	0,8	0,9
8. Patoloogilisi sperme kokku / <i>Total abnormalities</i>	10,6***	13,9***

Tabel 5. Spermi morfoloogiline kvaliteet sõltuvalt CVM-geeni kandja esinemisest sugupulli isa- või emaliinis
Table 5. Relationships between the incidence of the sperm abnormalities and the presence of the paternal or maternal carriers of CVM-gene

Morfoloogiline tunnus (%) <i>Sperm abnormalities (%)</i>	CVM-geeni kandja 1–3 põlvkonnas <i>CVM gene carriers in the 1–3 generation(s)</i>		
	Isaliinis <i>Paternal</i>	Emaliinis <i>Maternal</i>	Nii isa kui emaliinis <i>Paternal and maternal</i>
Pulle / <i>Bulls</i>	22	13	5
Ejakulaate / <i>Ejaculates</i>	939	613	241
1. Patoloogiline pea / <i>Abnormal head</i>	5,4***	2,8***	4,2***
2. Sabata sperm / <i>Detached head</i>	3,1***	2,3***	4,7***
3. Patoloogiline akrosoom / <i>Abnormal acrosome</i>	0,6	0,5	0,8
4. Kaela defekt / <i>Abnormal neck</i>	0,7*	0,6*	0,9*
5. Proksimaalne ja/või distaalne tsütoplasma tilk <i>Proximal&distal cytoplasmic droplets</i>	0,9	0,9	1,0
6. Patoloogiline keskosa / <i>Abnormal midpiece</i>	3,5***	3,0***	4,2***
7. Patoloogiline saba / <i>Abnormal tail</i>	0,9	0,9	1,0
8. Patoloogilisi sperme kokku / <i>Total abnormalities</i>	15,1***	11,0***	16,8***



Joonis 4. Noorpullide spermide morfoloogilise kvaliteedi dünaamika

Figure 4. *The dynamics of the incidence of sperm abnormalities in young bulls*

Noorpullide spermide morfoloogia dünaamika uuringud esimestel spermakogumise kuudel näitasid, et kui kõige esimestes ejakulaatides oli patoloogilisi sperme keskmiselt 19,0% ning sperma morfoloogiline kvaliteet kõikus erinevates ejakulaatides suhteliselt suure amplituudiga, siis pärast 6.–8. ejakulaati morfoloogilised näitajad stabiliseerusid ja keskmine patoloogiliste spermide esinemissagedus noorpullidel võrdsustus täiskasvanud pullide hooaja keskmisega (joonis 4). Pärast 9.–10. ejakulaati vähenes patoloogiliste spermide esinemissagedus veelgi ning jäi alla täiskasvanud pullide hooaja keskmisele näitajale.

Tabel 6. Pullisperma morfoloogilise kvaliteedi ja spermide funktsionaalsete omaduste vaheline seos
Table 6. *Correlations between sperm morphology and functional characteristics*

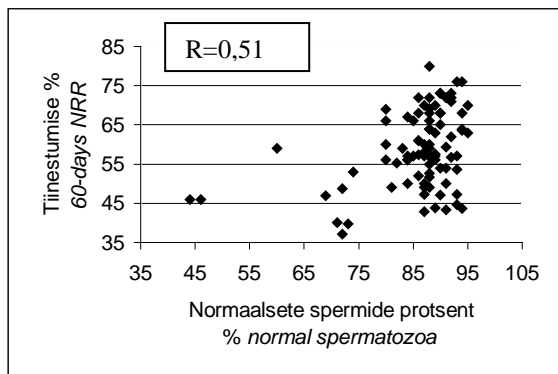
Spermide funktsionaalsed omadused <i>Sperm functional characteristics</i>	Korrelatsioon morfoloogiliselt normaalsete spermide esinemissagedusega <i>Correlations between normal morphology and functional characteristics</i>
	r
Värskes pullispermas / Fresh semen	
a) otseliikuvad spermid A1, % / <i>Progressive motility, %</i>	0,056
b) intaktse membraaniga spermid, % (HOT-1 test) / <i>Membrane integrity, HOT-1 test</i>	-0,046
Sügavkülmutatud pullispermas / Frozen-thawed semen	
a) otseliikuvad spermid A1, % / <i>Progressive motility, %</i>	0,23
b) intaktse membraaniga spermid, % / <i>Membrane integrity, HOT-1 test</i>	0,24
c) intaktse membraaniga spermid, % / <i>Membrane integrity, HOT-2 test</i>	0,26*
d) intaktse membraaniga spermid, % / <i>Membrane integrity, HOT-3 test</i>	0,28*

Edasi uuriti spermide morfoloogilise kvaliteedi ja spermide funktsionaalsete omaduste (liikuvus, membraanide seisund) vahelisi seoseid. Selgus, et spermide morfoloogia ja liikuvuse vahel ei ole olulist korrelatsiooni ei värskes ega ka sügavkülmutatud spermas (tabel 6). Nõrk positiivne korrelatsioon ilmnes intaktse membraaniga spermide ja normaalse morfoloogiaga spermide esinemissageduse vahel sügavkülmutatud/sulatatud spermas (HOT-1 test, $r=0,24$; HOT-2 test, $r=0,26^*$; HOT-3 test, $r=0,28^*$).

Värskes sperma morfoloogiliselt normaalsete spermide esinemissageduse ja tiinestumise vahel leiti keskmine positiivne korrelatsioon nii ejakulaatide ($r=0,51^*$, joonis 5) kui ka pullide lõikes ($r=0,49^*$, joonis 6).

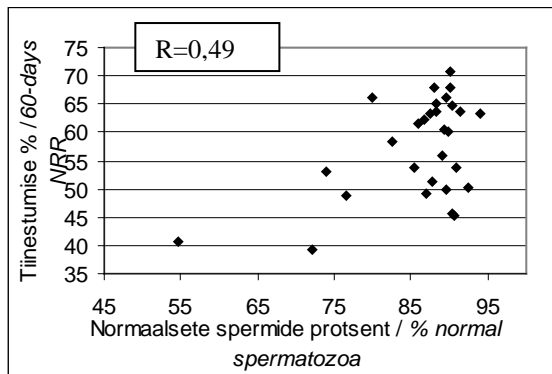
Seega, mida rohkem on pullispermas morfoloogiliselt normaalseid sperme, seda parem on lehmade ja mullikate tiinestumine.

Samas selgus, et noorpullide (1–2-aastased) spermide morfoloogilise kvaliteedi ja emasloomade tiinestumise vahel on korrelatsioon tugevam kui vanade pullide (3–6-aastased) puhul nii ejakulaatide kui ka pullide arvestuses (joonised 7, 8, 9 ja 10).



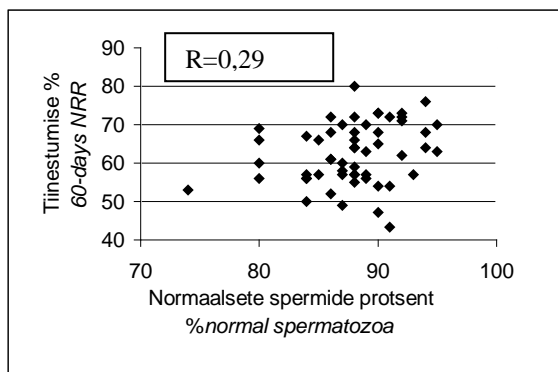
Joonis 5. Spermide morfoloogilise kvaliteedi ja tiinestumise vaheline seos ejakulaatide lõikes (n=91)

Figure 5. Relationship between the percentage of normal spermatozoa in fresh semen and NRR (91 ejaculates)



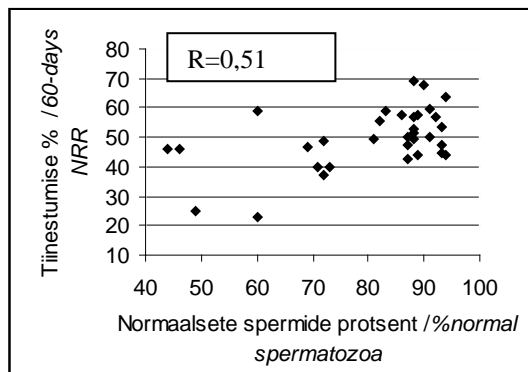
Joonis 6. Spermide morfoloogilise kvaliteedi ja tiinestumise vaheline seos pullide lõikes (n=29)

Figure 6. Relationship between the percentage of normal spermatozoa in fresh semen and NRR (29 bulls)



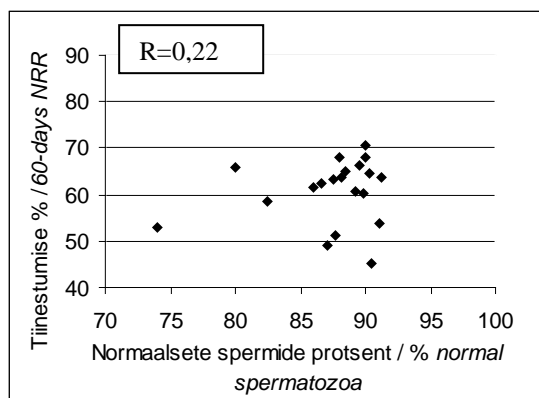
Joonis 7. Spermide morfoloogilise kvaliteedi ja tiinestumise vaheline seos 3–6-aastastel pullidel ejakulaatide lõikes (n=57)

Figure 7. Relationship between the percentage of normal spermatozoa in fresh semen of old bulls (3–6 years) and NRR (57 ejaculates)



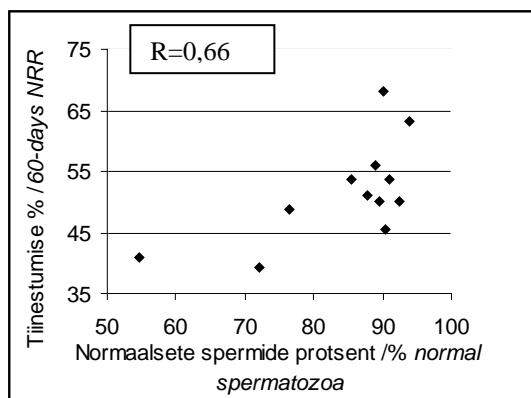
Joonis 8. Spermide morfoloogilise kvaliteedi ja tiinestumise vaheline seos 1–2-aastastel pullidel ejakulaatide lõikes (n= 34)

Figure 8. Relationship between the percentage of normal spermatozoa in fresh semen of young bulls (1–2 years) and NRR (34 ejaculates)



Joonis 9. Spermide morfoloogilise kvaliteedi ja tiinestumise vaheline seos 3–6-aastastel pullidel (n=17)

Figure 9. Relationship between the percentage of normal spermatozoa in fresh semen of old bulls (3–6 years) and NRR (n=17)



Joonis 10. Spermide morfoloogilise kvaliteedi ja tiinestumise vaheline seos 1–2-aastastel pullidel (n=12)

Figure 10. Relationship between the percentage of normal spermatozoa in fresh semen of young bulls (1–2 years) and NRR (n=12)

Katsetes selgitasime, kas on võimalik kehva spermide morfoloogiaga pulle aretustöös kasutada juhul, kui spermide kontsentratsiooni seemenduskõrres suurendada (tabel 7).

Pulli B värskes spermas oli patoloogiliste spermide osakaal 42,5%. Tema spermaga seemendamisel saadi tiinestumiseks 43,4%, kui spermide arv seemenduskõrres oli tavapärase 40 miljoni asemel 65 miljonit. Pulli C värskes spermas oli patoloogilisi sperme 81,8% ja tema puhul sama suur spermide arv doosis efekti ei andnud: tiinestus vaid 10,9% seemendatud lehmadest. Pulli A puhul, kelle värskes spermas patoloogiliste spermide osakaal ei ületanud 20,0%, spermide arvu suurendamine seemendusdoosis 10 miljoni spermide võrra lehmade tiinestumist oluliselt ei parandanud.

Tabel 7. Spermide morfoloogiline kvaliteet, spermide arv seemendusdoosis ja lehmade tiinestumine
Tabel 7. Sperm morphology, number of sperms per insemination dose and 60-days-NRR in cows

Pull / Bull	A	B	C	
Ejakulaate / Ejaculates	4	1	6	4
1. Morfoloogiline tunnus (%) / Sperm abnormalities (%)				
Patoloogiline pea / Abnormal head	2,3***	3,0***	16,2***	70,8***
Sabata sperm / Detached head	1,2**	1,0**	10,5**	4,8***
Patoloogiline akrosoom / Abnormal acrosome	–	–	2,0	–
Kaela defekt / Abnormal neck	1,3	2,0	2,0	–
Proksimaalne ja/või distaalne tsütoplasma tilk Proximal & distal cytoplasmic droplets	1,3	–	2,3	0,8
Patoloogiline keskosa / Abnormal midpiece	3,5	10,0	9,3	5,5
Patoloogiline saba / Abnormal tails	1,0	4,0	0,2	–
Patoloogilisi sperme kokku / Total abnormalities	11,4***	20,0***	42,3***	81,8***
2. Spermide kontsentratsioon kõrres No of sperms per straw (10 ⁶)				
	40	50	65	65
3. Tiinestumine % / NRR %				
	64,6**	69,0**	43,4**	10,9**

Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida eesti holsteini tõugu pullide spermide morfoloogiat mõjutavaid tegureid ja spermide morfoloogia seost emasloomade tiinestumisega.

Sugupulli vanus avaldas olulist mõju sperma morfoloogilistele näitajatele. Selgus, et 6–7-aastaste pullide sperma morfoloogiline kvaliteet oli halvem kui noortel, 1–3-aastastel pullidel. Sugupulli vanuse kasvades suurenes spermas sabata spermide esinemissagedus, ilmnes rohkem kaela- ja keskosadefekte ning tsütoplasmatilgakesi. Sellised muutused viitavad spermatogeneesi häiretele, mille üheks põhjuseks võib olla spermatogeneesi reguleerivate hormoonide tasakaalu muutumine sugupulli vananedes (Foote jt, 1979). Viimastest väärib märkimist hüpofüüsi eessagaras toodetav luteiniseeriv hormoon (LH), mis reguleerib sugurakkude meiosisprotsessi, lissugunäärmete sekretsiooni ja pulli sugulist käitumist mõjutava testosterooni produktsiooni munandite Leydigi rakkudes (Forsberg, 1996). Teine, samuti hüpofüüsi hormoon, on folliikuleid stimuleeriv hormoon (FSH), mis reguleerib munandite Sertoli rakkude võimet toota seemnetorukeste iduepiteelirakkude paljunemiseks ja arenguks vajalikke faktoreid (Parvinen, 1993). Vananemisel võib langeda ka pulli munandimanuste võime fagotsüteerida ebanormaalseid sperme. Munandimanuste võimet spermide morfoloogiat modifitseerida on demonstreeritud spermatogeneesihäiretega pullide uurimisel (Ramamohana Rao jt, 1980).

Pullisperma morfoloogia sõltus oluliselt ka sperma kogumise aastaajast. Spermide morfoloogiline kvaliteet oli kõige halvem suvel (13,3% patoloogilisi sperme) ning kõige parem talvel (9,9% patoloogilisi sperme), kevadel ja sügisel olid tulemused nimetatud kahe vahepealsed. Suvel suurenesid eriti sabata ja patoloogilise keskosaga, aga ka patoloogilise pea ja tsütoplasmatilgaga spermide esinemissagedused. Patoloogiliste spermide arvu suurenemist pullispermas suvel on varem täheldanud ka teised autorid (Slaweta, 1986; Söderquist jt, 1996). L. Söderquist seletas patoloogiliste spermide arvu suurenemist kuumastressiga. Mitmed uurijad on oma töödes leidnud, et temperatuuri tõus munandites mõjutab spermigeneesi ja halvendab pullisperma kvaliteeti (Vogler jt, 1991, 1993; Barth, Bowman, 1994; Malmgren, Söderquist, 1998). A. D. Barhi ja P. A. Bowmani (1994) katses suurendas juba 4-päevane munandite soojalt kinnikatmine oluliselt spermidefektide esinemissagedust järgnenud 6-nädalase spermakogumise perioodi jooksul. Samasugust mõju võivad avaldada suvised kuumalained, isegi kui nende kestus on lühike.

Erinevused spermide morfoloogilises kvaliteedis esinesid ka erineva päritoluga pullidel. Uurimistulemused näitasid, et kõige rohkem esines patoloogilisi sperme USA ja Hollandi päritoluga pullidel, sealjuures morfoloogilisi kõrvalekaldeid esines keskmisest sagedamini pea kuju osas. Nii Saksa kui ka Eesti pullide spermas jäi patoloogiliste spermide esinemissagedus tervikuna ühesugusele tasemele. Sellised erinevused spermide morfoloogilise kvaliteedi osas võivad olla tingitud nii inbriidingust (Genetic Edge, 1999; High Lights, Dec 2000), sest holsteini tõu aretuses kasutatavate tipp-pullide põlvnemine muutub üha homogeensemaks, kui ka erinevate riikide aretusprogrammide strateegiat pullide valikul. On selge, et laialdasem geneetilise materjali liikumine riikide vahel tingib tulevikus erinevuste kadumise spermide morfoloogiliste tunnuste osas.

Noorpullide sperma morfoloogilist kvaliteeti uurides ilmnes selle paranemistendents varutavate ejakulaatide järgarvu suurenedes. Kui noorpullidelt varutud esimestes ejakulaatides oli patoloogiliste spermide osakaal ligi 20%, siis pärast viiendat ejakulaati hakkas see vähenema ning stabiliseerus pärast 10.–12. ejakulaati, võrdsustades kõigi pullide hooaja keskmise näitajaga. L. Söderquist jt (1996) näitasid, et noorpulli vanuse suurenedes 14–36 kuuni vähenes patoloogiliste spermide esinemissagedus pullispermas 2,6% võrra. N. Madrid jt (1988) leidsid, et patoloogiliste spermide vähenemine noorpulli spermas korreleerub pulli munandikoti ümbermõõdu suurenemisega, mis omakorda on seotud noorpulli arengu ja kehakaalu tõusuga. Pullisperma morfoloogilise kvaliteedi paranemise ja pulli kehakaalu suurenemise vahelist seost on täheldanud ka P. H. Coe (1999). Ta tõestas, et noorpulli kasvades ning munandite massi suurenedes tõusis normaalsete spermide osakaal vähemalt 70%-ni. D. D. Lunstra ja S. E. Echterncamp (1982) täheldasid oma uurimuses, et lihatõugu noorpullidel ja nende ristanritel suurenes normaalsete spermide osakaal pullispermas 4 kuu jooksul pärast sperma varumise algust. Pullisperma morfoloogilise kvaliteedi paranemist noorpulli arenedes võib seostada munandikoti ümbermõõdu ja Leydigi rakkude suurenemisega, mis mõjutavad testosterooni taset (Forsberg, 1996).

Uuringutest selgus, et normaalsete spermide esinemissageduse ja spermide funktsionaalsete omaduste vahel värskes spermas olulist seost ei ole. See võib olla tingitud esiteks sellest, et uurimisel olnud pullide ja ejakulaatide arv oli väike ning teiseks, nii pea-, akrosoomi- kui ka kaeladefektidega spermid võivad liikuda ja nende membraanid võivad olla terved. Sügavkülmutatud/sulatatud spermide otseliikuvuse ja membraanide intaktsuse ning värske sperma morfoloogilise kvaliteedi vahel leiti nõrk positiivne korrelatsioon. Seega ejakulaatides, kus morfoloogiliselt normaalsete spermide osakaal on suur, mis viitab hormonaalselt tasakaalustatud spermatogeneesile, säilib spermide funktsionaalne täisväärtuslikkus hästi ka pärast sügavkülmutamist ja sulatamist.

Peab märkima, et pullidel, kelle sugupuus 1–3 eelneva põlvkonna jooksul esinesid CVM-geeni kandvad eellased, oli spermide morfoloogiline kvaliteet oluliselt halvem kui nendel pullidel, kellel CVM-geeni kandvad eellased puudusid. Seda fenomeni on praegu raske seletada. On teada, et CVM-geen võib põhjustada järglaste surnultsüüde ja raskeid väärarenguid (Milchrind 2000; Nautra 2001; 2, Press release from NAAB and Holstein

Association USA, February 16, September 28, 2001; Holstein International. Volume 8, 2001). Seni pole aga kirjanduses andmeid CVM-geeni mõjust spermatogeneesile ja sperma kvaliteedile. Meie uuringus kasutatud pullid ise on CVM-geeni olemasolu suhtes seni kontrollimata, seega on CVM-geeni ja spermide morfoloogia seose olemasolu praegu veel spekulatiivne ning vajab edasisi uuringuid.

Läbiviidud katsete tulemusena selgus, et spermide morfoloogilise kvaliteedi ja emasloomade tiinestumise vahel on oluline keskmine korrelatsioon ($r=0,51^{**}$ ejakulaatide arvestuses). Mitmed autorid on ka varem leidnud, et mida parem on pullisperma morfoloogiline kvaliteet, seda parem on emasloomade tiinestumine (Söderquist jt, 1991b; Correa jt, 1997; Zhang jt, 1998). Võrreldes teiste uurijate andmetega on meie töös leitud korrelatsioon oluliselt tugevam, mis on tingitud sellest, et katseseemendusi õnnestus teha suure arvu pullide spermaga, milles normaalsete spermide osakaal oli väga erinev. Samuti selgus, et noorpullide spermide morfoloogilise kvaliteedi ja emasloomade tiinestumise vahel oli tugevam seos kui täiskasvanud, üle 3 a vanustel pullidel. See võis olla tingitud asjaolust, et noorpullide spermas polnud normaalsete spermide osakaal veel stabiliseerunud ning seega oli variatsioon ühe pulli erinevate ejakulaatide vahel keskmisest suurem.

Katsetulemustele tuginedes võib väita, et pulle, kelle spermas patoloogiliste spermide osakaal on üle 25%, kuid pulli aretusväärtus on kõrge, saab mõningatel juhtudel aretustöös kasutada, ilma et emasloomade tiinestumine oluliselt langeks. See on võimalik juhul, kui tõsta spermide arvu seemendusdoosis nii, et see sisaldaks viljastamiseks vajaliku arvu normaalsete sperme. Patoloogiliste spermide osakaalu suurenemisel pullispermas üle 50% kaotab kirjeldatud meetod siiski majandusliku efekti, sest spermide arvu suurendamisel üle 150×10^6 ühes seemendusdoosis saadakse pullilt liiga vähe spermadoose, mis läbi ühe pulli katseseemendusteks vajalikku kogust tuleb varuda kauem kui aasta. Aastaga sellise geneetilise materjali väärtus ja nõudlus aga langeb. Praegune seemendusjaamades kehtiv standard näeb ette, et kunstlikuks seemenduseks väljastatava sperma morfoloogiliselt normaalsete spermide sisaldus on vähemalt 75% ning otseliikuvaid sperme on vähemalt 40%. Samas võivad nõuded pullisperma morfoloogilisele kvaliteedile tulevikus karmistuda seoses väikese spermadoosiga tehtava süvaseemenduse osatähtsuse suurenemisega.

Kokkuvõte

Uurimistöö tulemustele tuginedes võib järeldada, et sugupulli vanus, sperma kogumise aasta-aeg ja pulli päritolu mõjutavad oluliselt spermide morfoloogiat. Kuue- kuni seitsmeaastaste pullide spermas esines rohkem patoloogilisi sperme kui nooremate pullide spermas ning kevadsuvisel perioodil oli patoloogiliste spermide esinemissagedus oluliselt suurem kui sügistasvisel perioodil. USA päritolu pullide spermas esines patoloogilisi sperme enam kui Euroopast imporditud pullidel. Noorpullide sperma morfoloogiline kvaliteet paranes pullilt varutud ejakulaatide arvu suurenedes, stabiliseerudes kolmandal sperma varumise kuul. CVM-geeni kandvate eellaste esinemisele sugupulli põlvnemises kaasneb suure tõenäosusega keskmisest madalam spermide morfoloogiline kvaliteet. Spermide morfoloogilise kvaliteedi ja liikuvuse vahel olulist seost ei leitud. Nõrk positiivne korrelatsioon ilmnes värske sperma normaalse morfoloogiaga spermide esinemissageduse ja sügavkülmutatud/sulatatud spermas intaktse membraaniga spermide sisalduse vahel. Sugupullilt varutud värske sperma morfoloogilise kvaliteedi ja emasloomade tiinestumise vahel esines oluline korrelatsioon: mida rohkem oli normaalsete sperme värskes pullispermas, seda parem oli tiinestumine.

Pulle, kelle spermas on 25–50% patoloogilisi sperme, kuid pulli aretusväärtus kõrge, saab aretustöös erandkorras kasutada juhul, kui spermide kontsentratsiooni seemenduskõrres suurendada.

Uurimistööd toetasid Eesti teadusfond (grant 4807) ja Eesti Tõuloomakasvatajate Ühistu.

Kirjandus

- Amann, R. P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.*, 10, p. 89–98, 1989.
- Barth, A. D. The relationship between sperm abnormalities and fertility. *Proc 14th Tech Conf. Artif. Insem. Reprod. Nat. Assoc. Breeders*, p. 47–60, 1992.
- Barth, A. D., Bowman, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. *Can. Vet. J.*, 35, 2, p. 93–102, 1994.
- Bredbacka, K., Andersson, M., Bredbacka, P. The use of in vitro fertilization and sperm assay to evaluate field fertility of bulls. *Theriogenology*, 47, p. 253, 1997.
- Coe, P. H. Associations among age, scrotal circumference, and proportion of morphologically normal spermatozoa in young beef bulls during an initial breeding soundness examination. *Journal of Am. Vet. Med. Assoc.*, 214, 11, p. 1664–1667, 1999.
- Complex Vertebral Malformation (CVM) update. Press release from NAAB and Holstein Association USA, February 16, 2001.

- Correa, J. R., Heerche, G. Jr., Zavos, P. M. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at various temperatures. *Theriogenology*, p. 715–721, 1996.
- 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.
- Cranfield, N., Revell, S. Assessment of post-thaw live bovine sperm morphology and its relationship to raw whole population morphology. 14th International Congress on Animal Reproduction, Abstracts, Stockholm, 2–6 July, 2000, Vol. 2, p. 5.
- Foote, R. H., Munkenbeck, N., Green, W. A. Testosterone and libido in Holstein bulls of various ages. *Journal of Dairy Sci.*, 1979, 59, 11, p. 2011–2013, 1979.
- Forsberg, M. Hormonal control of male reproductive function. Nordic Research Course in Diagnostic and Experimental Animal Andrology, May 1996, Uppsala, Sweden.
- Genetic Edge, Let AltaMate Control Inbreeding in Your Herd! Spring 1999, p. 3.
- Genetic Edge What does inbreeding mean for the commercial dairy producer., Spring 1999, p. 4.
- Genetic profit and inbreeding. *Balance. High Lights*, Dec 2000, No 4, p. 8–9.
- Januskauskas, A. Studies on the assessment of post-thaw sperm viability in Swedish dairy AI bulls. Licentiate thesis, Uppsala, SLU, 28, 1995.
- Januskauskas, A., Söderquist, L., Håård, M. G., Håård, M. Ch., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H. Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility of Swedish red and white A.I. bulls. *Acta Vet. Scand.*, 34, p. 461–470, 1996.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., Zaneveld, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reprod. Fertil.*, 70, p. 219–225, 1984.
- Kruip, T. A. M., Wurth, Y. A., den Daas, N. Homologous oocyte penetration in vitro: a reliable parameter for the fertilizing potency of bull semen. *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod.*, 2, The Hague, p. 653–655, 1992.
- Linford, E., Glover, F. A., Bishop, C., Stewart, D. L. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J. Reprod. Fertil.*, 7, p. 283–291, 1979.
- Lunstra, D. D., Echterncamp, S. E. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. *Journal of Anim. Sci.*, Sep; 55 (3), p. 638–648, 1982.
- Madrid, N., Ott, R. S., Veeramachaneni, D. N., Parrett, D. F., Vanderwert, W., Willms, C. L. Scrotal circumference, seminal characteristics, and testicular lesions of yearling Angus bulls. *Am. J. Vet. Res.*, 49, 4, p. 579–585, 1988.
- Malmgren, L., Söderquist, L. Effects of scrotal insulation on the viability of fresh, cooled stored, and frozen/thawed stallion semen. *Gametes: Development and Functions, Serono Symposia*, 1998, p. 570.
- Milchhind 4/2000 Neuer Gendefekt CVM: Alle warten auf weitere Testergebnisse. S. 36–37.
- Padrik, P., Jaakma, Ü. Sügavkülmutatud pullisperma viljastamisvõime prognoosimine hüpoosmootse testi abil. *Veterinaarmeditsiin* 2000, Tartu, lk 58–63, 2000.
- Padrik, P. Modified hypoosmotic swelling (HOS) test as a method for prediction of bull sperm fertilising ability. *Dairy Production in Estonia Today and Tomorrow. Proceedings from a symposium at the Estonian Agricultural University, Tartu, June 7*, p. 75–76, 1999.
- Parvinen, M. Cyclic function of the Sertoli cells. In: Russel L. D., Griswold, M. D. (Eds), *The Sertoli Cell*. Clearwater, F. L., Cache River Press, p. 331–347, 1993.
- Ramamohana Rao, A., Bane, A., Gustafsson, B. K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology*, 14, 1, p. 1–12, 1980.
- Revell, S. G., Mrode, R. A. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36, p. 77–86, 1994.
- Saacke, R. G. Semen quality in relation to semen preservation. *Journal of Dairy Sci.*, 66, p. 2635–2644, 1983.
- Saacke, R. G., White, J. M. Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proc 4th National Assoc. Animal Breeders Tech. Conf. Animal Reprod. Artif. Insem.*, Milwaukee, p. 22–27, 1972.
- 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. Insem.*, 5, p. 75–78, 1980.
- Shamsuddin, M., Larsson, B. In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. *Reproduction in Domestic Animals*, 28, p. 77–84, 1993.
- Slaweta, R. Morphological changes in the acrosome of bull spermatozoa during various seasons of the year, *Pol. Arch. Weter.*, 1986, 26 (3–4), p. 67–73, 1986.

- Söderquist, L., Janson, L., Håård, M., Einarsson, S. Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy A.I. bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, 44, p. 91–98, 1996.
- Söderquist, L. ATP content and sperm motility of extended bovine semen under different storage conditions. *Acta Vet. Scand.*, 32, p. 511–518, 1991a.
- Söderquist, L., Jansson, L., Larsson, K., Einarsson, S. Sperm morphology and fertility in dairy AI bulls. *J. Vet. Med.*, vol. 38, p. 534–543, 1991b.
- 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*, 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. *International Journal of Andrology*, 21, p. 1–10, 1998.
- Vogler, C. J., Saacke, R. G., Barne, J., DeJarnette, J. M., McGilliard, M. L. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Sci.*, 74, p. 3827–3835, 1991.
- Vogler, C. J., Barne, J., DeJarnette, J. M., McGilliard, M. L., Saacke, R. G. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. *Theriogenology*, 40, p. 1207–1220, 1993.

Sperm Morphology in Estonian Holstein Dairy Bulls, Factors Affecting It and Relation to Fertility.

P. Padrik, Ü. Jaakma

Summary

The aim of the current study was to evaluate sperm morphology of Estonian Holstein bulls, the factors influencing it and the correlations between the results of laboratory tests and bulls' in vivo fertility.

To evaluate the morphology of fresh semen, 3681 ejaculates from 111 bulls collected during the period of March 1998 to March 2002 in Kehtna AI station were studied. During that period, 5–8 ejaculates from each proven bull and 2–5 ejaculates from young bulls were collected per month on an average.

Air dried smears of fresh semen were fixed in ethanol and stained with SPERMACTM (Stain Enterprises, South Africa) according to the recommendations of the manufacturer. One hundred spermatozoa in each preparation were examined under the phase contrast microscope ($\times 1000$). Different morphological abnormalities (detached heads, abnormal heads, abnormal necks, proximal and distal cytoplasmic droplets, abnormal midpieces and abnormal tails; Figures 1, 2, 3) were registered in each preparation as a percentage of the total number of counted spermatozoa.

Frozen/thawed semen from 91 ejaculates of 29 bulls was used to inseminate 6229 cows and heifers (70 inseminations per ejaculate and 323 inseminations per bull on an average) in different herds. Bulls' in vivo fertility estimation was based on 60-days non-return rates of inseminated females (NRR).

Analysis of variance was used to evaluate the differences between the bulls obtained in frequency of sperm abnormalities. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$. Pearson correlation analysis was used to study the relationships between the laboratory tests values and 60-days NRR.

The results of the study showed that increase in the bulls' age had a significant effect on the incidence of sperm abnormalities. The gradual increase was detected for the frequency of detached heads, abnormal necks, proximal and distal cytoplasmic droplets and abnormal midpieces (Table 1).

Frequency of sperm abnormalities in fresh semen varied between the seasons (Table 2). The incidence of abnormal spermatozoa was the highest in the ejaculates collected in summer (13.3%) and the lowest in those collected in winter (9.9%).

Country of origin of the bulls influenced significantly the frequency of sperm abnormalities (Table 3). The American Holstein bulls had more sperm abnormalities than the Dutch, German and Estonian bulls.

The bulls with the CVM-gene carriers during previous 1–3 generations of their pedigree had significantly more sperm abnormalities in fresh semen than the bulls without above mentioned defect (Table 4). The incidence of sperm abnormalities was highest when the bulls had CVM-carriers both in dam and sire line (Table 5). As the bulls themselves in our study were not been tested for the presence of CVM-gene, we cannot conclude that the higher incidence of sperm abnormalities is directly caused by the CVM-gene. Further studies are necessary to clarify the phenomenon.

The study of sperm morphology dynamics in young dairy bulls revealed that the frequency of sperm abnormalities was relatively high in the first ejaculates collected at the age of 12–14 months (Figure 4). In the first collection the average incidence of sperm abnormalities reached 19,0% while the average of the period calculated for adult bulls was 11,5%. The improvement in sperm morphology was observed after 6–8 semen collections and the percentage of sperm abnormalities stabilised after 10–12 collections and reached the average of the season for all bulls.

We did not find any significant correlation between the percentage of morphologically normal spermatozoa in the fresh semen and sperm motility both in fresh or frozen/thawed semen (Table 6). Weak positive correlation was detected between the percentage of morphologically normal spermatozoa in the fresh semen and Δ HOS-2 of frozen/thawed semen ($r=0.26$, $P<0.05$).

A strong positive correlation was obtained between the percentage of normal spermatozoa in the fresh semen and 60-days NRR of cows and heifers both on ejaculate and bull level ($r=0.51$ and 0.49 , respectively, $P<0.01$; Figures 5,6). The positive correlation was much stronger expressed in 1–2 years old young bulls than in 3–6 years old bulls (Figures 7, 8, 9, 10).

In our study the incidence of normal sperms in fresh semen was generally in a range of 80.0–95.0%. Besides that we had some exceptions (Table 7). Fresh semen of bull B contained 42.3% of normal sperms in our experiment and was characterized by the high incidence of abnormal heads, detached heads and abnormal midpieces. Increasing the total sperm number up to 65×10^6 per A.I. dose enabled to achieve NRR of cows 43.4%. On a contrary, such effect was not gained with bull C, yielding only 18.2% of normal sperm in his ejaculate. Insemination of cows with 65×10^6 spermatozoa resulted only in 10,9% NRR and further increase of sperm number per dose is not feasible in A.I. practice.