

EESTI PUNAST TÕUGU SUGUPULLIDE SPERMA KVALITEET PÄRAST ASUKOHAVAHETUST

P. Padrik, Ü. Jaakma

ABSTRACT. *Semen quality in Estonian Red dairy A.I. bulls after relocation.* The aim of the current study was to clarify how did a long interval between semen collections associated with bulls' transport and adaptation in a new location influence quality of the semen.

The results of the study showed that the ejaculate volume and sperm concentration were stable after the 54-days interval in semen collection. After recommencement of semen collection, the ratio of abnormal spermatozoa decreased during the 5-weeks study period from 13.9 % to 7.8 % ($P < 0.05$). The ratio of motile spermatozoa in fresh semen and in frozen/thawed semen increased for 3.4 % and 9.7%, respectively ($P < 0.05$). The progressive motility of spermatozoa, VCL, VAP, VSL, BFS and ALH increased significantly in frozen/thawed semen ($P < 0.05$). The same tendencies were observed for the fresh semen.

We conclude that the quality of semen of the Estonian Red A.I. bulls, previously transferred from one A.I. station to the another, improved significantly during 5 weeks after restart of semen collection.

Key words: dairy bull, semen quality, sperm morphology, computer-assisted sperm motion analysis (CMA).

Sissejuhatus

Varasemates uuringutes oleme näidanud aastaaegade (Padrik, Jaakma, 2002), pulli vanuse (Majas, 1972; Padrik, Jaakma, 2002) ja tõu (Majas, 1972) mõju eesti holsteini ja eesti punast tõugu pullide ejakulaadi mahule, spermide kontsentratsioonile, liikuvusele ja morfoloogilisele kvaliteedile.

Aeg-ajalt võib seemendusjaama töö ümberkorralduste tõttu tekkida vajadus pullide ümberpaigutamiseks. Lisaks stressile, mis tekib seoses transpordiga ja uue elupaigaga, lisanduvad teatud muutused söödaratsioonis ning võib tekkida pikem paus sperma kogumises. Just selline olukord tekkis eesti punast tõugu sugupullide ümberpaigutamisel Tartu seemendusjaamast Kehtna seemendusjaama 2003. aasta alguses.

Meie töö eesmärgiks oli uurida, milline on eesti punast tõugu pullide ejakulaadi mahu, spermide kontsentratsiooni ja sperma morfoloogia ning liikuvuse dünaamika pärast pullide ümberpaigutamist ja kaheksanädalast pausi ejakulaatide varumises.

Materjal ja meetodika

Ejakulaadi mahu, spermide kontsentratsiooni, morfoloogilise kvaliteedi, liikuvuse ja teiste spetsiifiliste liikumiskarakteristikute selgitamiseks uuriti kokku 19 eesti punast tõugu sugupulli 95 ejakulaati, mis koguti ajavahemikus veebruarist 2003 märtsini 2003, ja nendest ejakulaatidest valmistatud sügavkülmutatud spermat. Selle perioodi vältel koguti igalt hindamisel olevalt pullilt 5 ejakulaati (üks ejakulaat nädalas). Uuritud pullide keskmine vanus oli 27 kuud (20–48 kuud) ja keskmine mass 655 kg (508–680 kg).

Uurimisperioodile eelnes 54-päevane paus sperma kogumises. Selle perioodi vältel viidi pullid Tartu seemendusjaamast üle Kehtnasse (~160 km) ning pullide söödaratsioonile lisandusid silo ja päevalillekook. Pärast ligi 8-nädalast adaptatsiooni alustati uuesti sperma võtmist.

1. Ejakulaadi maht määrati gradueeritud spermakogujaga.

2. Spermide kontsentratsioon määrati fotoelektrilise kolorimeetri (SDM-5, Minitüb GmbH&CO, Germany) abil 1-miljonilise (1×10^6) täpsusega. Selleks võeti 0,04 ml värsket spermat, millest tehti 100-kordne lahjendus 0,9% naatriumkloriidilahuses. Valmistatud lahus valati küveti ning asetati fotoelektrokolorimeetri kambrisse. Võrdlusalahusena kasutati 0,9% naatriumkloriidi lahust.

3. Spermide morfoloogia hindamiseks valmistati ägepreparaat, mis fikseeriti etanoolis ja värviti SPERMACTM (Stain Enterprises, South Africa) värvidega, kasutades tootjafirma soovitatud meetodikat. Preparaati uuriti valgusmikroskoobi abil 1000-kordse suurendusega ning igast preparaadist analüüsiti kokku 100 sperm. Spermidel fikseeriti pea kuju, saba puudumine, akrosoomi- ja kaeladefektid, proksimaalse ja distaalse tsütoplasma tilgakese olemasolu, keha- ja sabaosa defektid (Padrik, Jaakma, 2002).

4. Spermide liikumiskarakteristikud värskes ja sügavkülmutatud pullispermas määrati kompuuteranalüüsi (CMA, Computer Assisted Cell Motion Analyser, Sperm Vision, Minitüb GmbH&CO, Germany) abil. Värske pullisperma lahjendati vahekorras 1:10 Triladyli (Minitüb GmbH&CO, Germany) ja munarebu lahjendiga.

Sügavkülmutatud sperma sulatati vesivannis +35 °C juures 20 sekundi jooksul. Nii värsket kui ka sügavkülmutatud spermat uuriti Makleri kambris. Iga proovi 4–5 väljal vaadeldi kokku ~400 spermi (400x suurendusel). Määrati järgmised näitajad (joonis 1):

liikuvate spermide % / *Motility %*

otseliikuvate spermide % / *Progressive Motility %*

spermide kiirus trajektooriga, SKT ($\mu\text{m}/\text{sek}$) / *Velocity Average Path, VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$)*

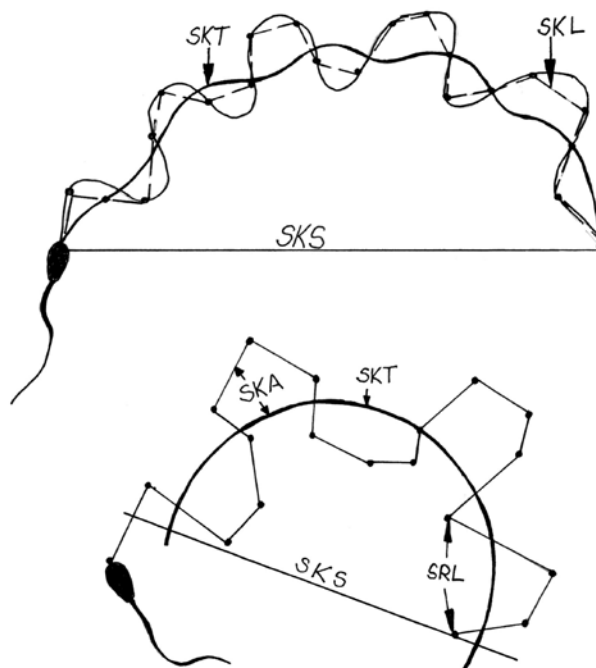
spermide kiirus liikumisteedekonnal, SKL ($\mu\text{m}/\text{sek}$) / *Velocity Curve Line, VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)*

spermide kiirus sirgjoonil, SKS ($\mu\text{m}/\text{sek}$) / *Velocity Straight Line, VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)*

spermide otseliikuvus SOL (SKS/SKL) / *Linearity LIN (VSL/VCL)*

spermide ristumissagedus liikumistrajektooriga, SRL (ristumisi/sek) / *Beat Cross Frequency BCF (per 1 sec)*

spermide kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektooriga, SKA (μm) / *Amplitude of Lateral Head Displacement ALH (μm)*



Joonis 1. Spermide liikumiskarakteristikud

Figure 1. Different patterns of sperm motility (Hafez, E.S.E., Hafez, B. *Reproduction in Farm Animals*. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins 2000, p 456)

5. Sperma külmutamine. Sperma lahjendamiseks kasutati Triladyli (*Minitüb GmbH&CO, Germany*) ja munarebu lahjendit. Värske sperma lahjendati pärast vieminutilist temperatuuride ühtlustamist lahjendi ja sperma vahel (+35 °C vesivannis) vahekorras 1:1. Teine lahjendamine toimus 15 minutit hiljem toatemperatuuril (+ 20 °C). Lahjendit lisati niipalju, et ühte seemendusdoosi jääks ~30 x 10⁶ spermi. Seejärel asetati lahjendatud sperma külmikusse (+4 °C). Kahetunnilise jahutamise järel pakendati sperma 0,25 ml spermakõrrekestesse (*Minitüb GmbH&CO, Germany*). Pärast kahetunnilist ekvilibreerumist spermakõrrekesed sügavkülmutati.

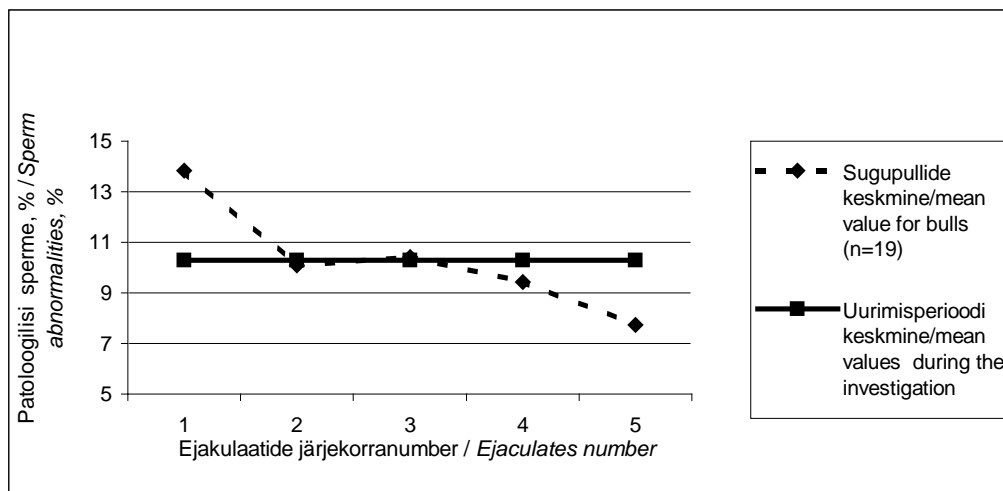
6. Uurimistulemuste statistilises analüüsis kasutati t-testi ja dispersioonanalüüsi. Tunnustevahelised erinevused loeti tõenäoseks, kui P<0,05.

Uurimistulemused

Ejakulaadi maht ja spermide kontsentratsioon ei muutunud oluliselt uurimisperioodi jooksul ning moodustasid keskmiselt vastavalt 5,9±1,6 ml (pullidevaheline varieeruvus 2,5–8,5 ml) ja 1,683±0,450x10⁹/ml (pullidevaheline varieeruvus 0,185–2,261x10⁹/ml).

Tabel 1. Ejakulaadi maht ja spermide kontsentratsioon
Table 1. Ejaculates' volume and sperm concentrations

Pulle / Bulls 19 Näitaja/Parameters	Ejakulaat / Ejaculate number				
	1	2	3	4	5
1. Sperma maht (ml) / Semen volume (ml)	6,1±1,6	5,8±1,7	6,1±1,6	5,6±1,2	5,4±1,7
2. Spermide kontsentratsioon (nx10 ⁹ /ml) Sperm concentration (nx10 ⁹ /ml)	1,56±0,50	1,74±0,36	1,69±0,34	1,72±0,38	1,71±0,49



Joonis 2. Patoloogiliste spermide dünaamika ejakulaadis
Figure 2. Sperm abnormalities after 54-days interval between semen collections

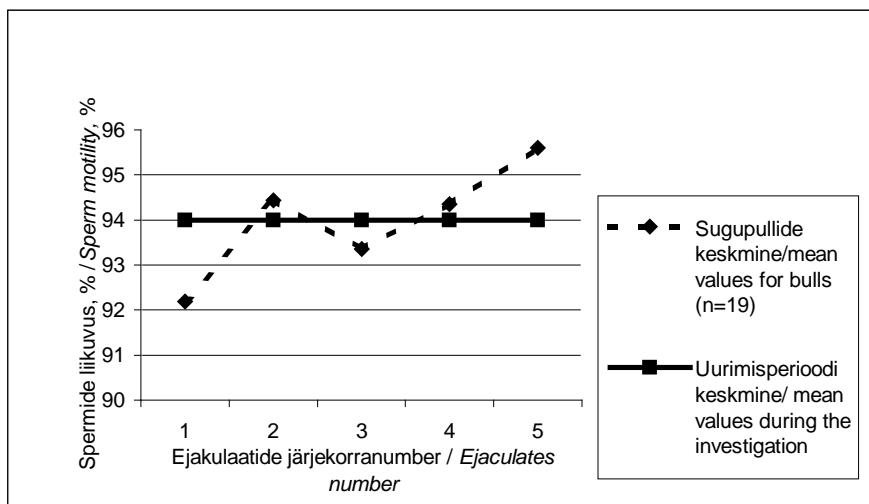
Selgus, et eesti punast tõugu sugupullide ejakulaatides esines uurimisperioodi kestel keskmiselt 10,3±6,6% patoloogilisi sperme. Patoloogiliste spermide esinemissagedus värskes pullispermis vähenes sugupullilt varutud ejakulaatide arvu suurenedes ja oli viiendas ejakulaadis võrreldes esimesega oluliselt väiksem (tabel 2). Kõige rohkem patoloogilisi sperme leidis pärast pausi kogutud esimeses ejakulaadis (13,9%), kusjuures enamasti oli tegemist sabatute ja patoloogilise keskosaga spermidega (vastavalt 4,1 ja 5,3%). Nimetatud patoloogiavormide esinemissageduse osas täheldati ka kõige suuremat muutust uurimisperioodil: võrreldes esimest ja viiendat ejakulaati vähenesid need näitajad vastavalt 2,6 ja 1,9 korda (tabel 2).

Tabel 2. Spermide morfoloogilised muutused ejakulaadis
Table 2. Sperm morphology after 54-days pause in semen collection

Pulle/Bulls 19	Ejakulaat / Ejaculate number		
	1	3	5
Morfoloogiline tunnus (%) / Sperm abnormalities (%)			
1. Patoloogiline pea / Abnormal heads	2,5±2,2	3,7±1,9	2,3±1,4
2. Sabata sperm / Detached heads	4,1±9,6	1,7±1,7	1,6±1,5
3. Patoloogiline akrosoom / Abnormal acrosomes	0,3±0,4	0,4±0,5	0,2±0,2
4. Kaela defekt / Neck defect	1,3±1,3	0,2±0,6	0,2±0,6
5. Proksimaalne ja/või distaalne tsütoplasma tilk Proximal&distal cytoplasmic droplets	0,2±0,2	0,4±0,6	0,4±0,4
6. Patoloogiline keskosa / Abnormal midpieces	5,3±6,9	4,4±5,6	2,8±2,3
7. Patoloogiline saba / Abnormal tails	0,3±0,6	0,1±0,1	0,3±0,6
8. Patoloogilisi sperme kokku / Total abnormalities	13,9±10,4 ^a	10,8±6,0 ^a	7,8±3,0 ^b

^{a, b} Erinevate ülaindeksitega väärtused samas reas on statistiliselt erinevad (P<0,05) / Values with different superscripts in a row are significantly different (P<0,05)

Eesti punast tõugu pulli spermide liikuvus pärast pikaajalist vahet sperma kogumises paranes sujuvalt, olles üldiselt igas järgmises ejakulaadis suurem kui eelmises (tabel 3, joonis 3). Viiendas ejakulaadis oli liikuvaid sperme keskmiselt 3,41% võrra rohkem kui esimeses ejakulaadis (P<0,05). Oluline paranemine oli jälgitav ka SKS ja SRL puhul (P<0,05, tabel 3), kuid mitte spermide otseliikuvuse, otseliikuvate spermide osakaalu, SKL, SKT ega SKA osas.



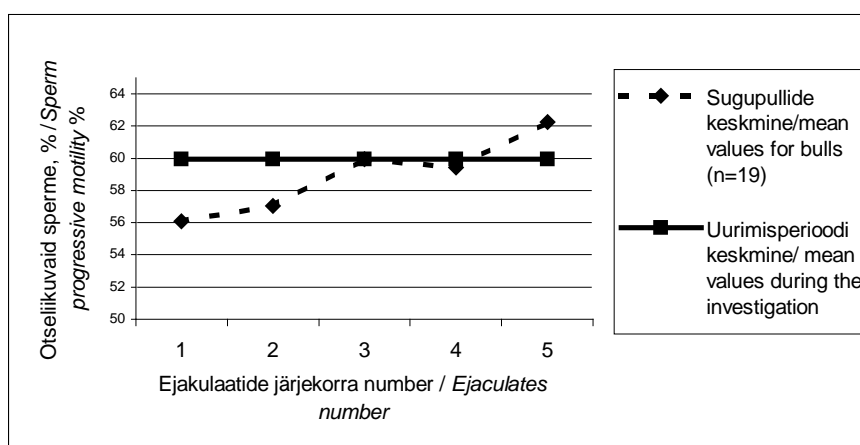
Joonis 3. Spermide liikuvuse dünaamika ejakulaadis
Figure 3. Sperm motility after the 54-days interval in semen collection

Tabel 3. Spermide liikumiskarakteristikud ejakulaadis
Table 3. Motility characteristic of spermatozoa in fresh semen after the 54-days interval between semen collections

Pulle/Bulls 19	Ejakulaat / Ejaculate number		
Spermide liikumiskarakteristikud Sperm motility characteristics	1	3	5
1. Liikuvate spermide % / Motility %	92,19±5,13 ^a	93,36±6,28 ^a	95,60±2,42 ^b
2. Otseliikuvate spermide % / Progressive motility %	80,88±4,02	83,16±4,44	83,88±2,79
3. SKL / VCL (µm/sec)	102,22±6,00	107,88±10,26	105,93±6,04
4. SKT / VAP (µm/sec)	66,10±4,05	69,25±5,23	68,57±3,58
5. SKS / VSL(µm/sec)	48,75±3,07 ^a	51,56±3,33 ^b	49,25±2,06 ^a
6. SOL/LIN	0,47±0,22	0,49±0,22	0,47±0,22
7. SRL/BFS (per second)	29,85±1,42 ^a	30,42±2,27 ^a	30,77±1,31 ^b
8. SKA/ALH (µm)	3,38±0,36	3,28±0,46	3,58±0,37

^{a, b} Erinevate ülaindeksitega väärtused samas reas on statistiliselt erinevad ($P<0,05$) / Values with different superscripts in a row are significantly different ($P<0,05$)

Spermide liikumiskarakteristikuid uuriti ka pärast sperma sügavkülmutamist ja sulatamist. Uuringutest selgus, et liikuvate ja otseliikuvate spermide osakaal suurenes viiendas ejakulaadis vastavalt 9,81 ja 5,61% võrra võrreldes esimese ejakulaadiga ($P<0,05$; joon 4, tabel 4).



Joonis 4. Spermide otseliikuvus sügavkülmutatud spermas
Figure 4. Sperm progressive motility in frozen/thawed semen after the 54-days interval in semen collection

SKL, SKT ja SKS osas ilmnis oluline paranemine juba kolmandal nädalal ($P<0,05$, tabel 4). Statistiliselt erinevad olid esimesest ning viiendast ejakulaadist pärit külmutatud/sulatatud spermide SRL ja SKA ($P<0,05$).

Tabel 4. Spermi liikumiskarakteristikud sügavkülmutatud spermas**Table 4.** Motility characteristic of spermatozoa in frozen/thawed semen after the 54-days interval between semen collections

Pulle/Bulls 19	Ejakulaat / Ejaculate number		
	1	3	5
<i>Spermi liikumiskarakteristikud</i>			
<i>Sperm motility characteristics</i>			
1. Liikuvate spermide % / Motility %	68,09±10,29 ^a	70,45±8,75 ^a	77,80±8,96 ^b
2. Otseliikuvate spermide % / Progressive Motility %	56,67±10,45 ^a	59,30±8,94 ^a	62,26±7,79 ^b
3. SKL / VCL (µm/sec)	84,44±6,71 ^a	92,94±6,18 ^b	93,37±7,86 ^b
4. SKT / VAP (µm/sec)	54,44±4,58 ^a	58,72±4,75 ^b	60,90±4,97 ^b
5. SKS / VSL(µm/sec)	42,11±4,29 ^a	46,40±3,34 ^b	47,68±4,39 ^b
6. SOL/LIN	0,49±0,04	0,49±0,03	0,51±0,03
7. SRL/BFS (per second)	28,64±0,82 ^a	29,04±1,53 ^a	30,58±2,44 ^b
8. SKA/ALH (µm)	2,48±0,28 ^a	2,65±0,43 ^a	2,78±0,340 ^b

^{a, b} Erinevate ülaindeksitega väärtused samas reas on statistiliselt erinevad ($P < 0,05$) / Values in a rows with a different superscripts are significantly different ($P < 0,05$)

Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, milline on eesti punast tõugu sugupullide ejakulaatide maht ja spermide kontsentratsioon, spermide morfoloogia ja liikuvus pärast pullide ümberpaigutamise seotud ligi 8-nädalast vahemikku sperma kogumises ja milline on nende näitajate dünaamika 5 nädala jooksul pärast spermakogumise taasalustamist.

Uuringutes selgus, et eesti punast tõugu sugupullide sperma keskmine maht uurimisperioodi jooksul oli 5,9 ml. L. Majase varasemad uuringud (1972) näitasid märksa väiksemat eesti punast tõugu pullide ejakulaatide keskmist mahtu – 4,24 ml. Selline erinevus võib olla põhjustatud kahest tegurist. Esiteks, meie uurimisobjektiks olnud pullide keskmine vanus oli 27 kuud. L. Majase uuring hõlmas erinevaid vanusegrupe 12 kuust kuni 7 aastani. B. Hafezi ja E. S. E. Hafezi (2000) andmetel mõjutab sugupulli vanus nii ejakulaadi mahtu kui ka spermide kontsentratsiooni selles. Seega võivad erinevused pullisperma mahus tuleneda pullide vanusest erinevates uurimisgruppides. Teine ja kindlasti olulisem põhjus, mis võis mõjutada pullisperma mahtu, on kolmekümne aasta jooksul eesti punast tõugu pullide aretuse tulemusena aset leidnud muutused. Meie uuritud pullide aretuses oli kasutatud eesti, taani ja norra punast tõugu, saksa ja ameerika punasekirju holsteini ning ameerika šviitsi tõugu pulle. L. Majase uurimisobjektiks olnud sugupullide põlvnemine oli homogeensem, nende aretuses kasutati põhiliselt eesti punast ja taani angleri tõugu pulle.

Pikaajalise vahemiku järel ejakulaatide kogumises oli stabiilne ka spermide kontsentratsioon, mille keskmine väärtus viies järjestikusel ejakulaadis oluliselt ei erinenud. Meie uuritud eesti punast tõugu pullide spermide kontsentratsioon kõikus sõltuvalt pullist vahemikus $0,185\text{--}2,263 \times 10^9$ /ml, mis ei erine varasematest, L. Majase (1972) poolt avaldatud tulemustest ($0,80\text{--}2,00 \times 10^9$ /ml).

Mitmed uurijad on leidnud, et spermide morfoloogiline kvaliteet annab hea ülevaate muutustest spermas, mis võivad olla tingitud sperma varumise aastaajast, pulli vanusest ja stressifaktoritest (Slaweta, 1986; Sekoni, Gustaffson, 1987; Vogler jt, 1991, 1993; Barth, Bowman, 1994; Malmgren, Söderquist, 1998; Söderquist jt, 1996), samas on leitud spermide morfoloogia ja pullide fertiilsuse vahel oluline positiivne korrelatsioon (Linford jt, 1979; Söderquist jt, 1991; Barth, 1992; Correa jt, 1997; Zhang jt, 1998; Cranfield, Revell, 2000; Padrik, Jaakma 2002). Selgus, et pikaajaline vahemik ejakulaatide varumises võib mõjutada spermide morfoloogiat. Pärast pausi sugupullilt kogutud ejakulaatides vähenes järk-järgult patoloogiliste spermide osakaal, kuigi erinevate üksikute morfoloogiliste tunnuste osas statistilist erinevust ei täheldatud. Pikaajaline vahemik ejakulaatide varumises võib põhjustada spermatogeneesi reguleerivate hormoonide – luteiniseeriva hormooni (LH), testosterooni ja folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) taseme kõikumist. Hüpofüüsi eessagaras toodetav luteiniseeriv hormoon (LH) reguleerib sugurakkude meiosisprotsessi, lisasugunäärmete sekretsiooni ja pulli sugulist käitumist mõjutava testosterooni produktsiooni munandite Leydigi rakkudes (Hafez ja Hafez, 2000). M. Forsbergi (1996) andmetel toimub suguliselt aktiivsetel loomadel LH vabanemine väiksema amplituudiga, kuid on pikemaajaline, seeläbi suureneb testosteroonisisaldus. Samast uurimisest selgus ka, et LH ja testosterooni baasiline sisaldus on suguliselt aktiivsetel loomadel suurem kui suguliselt inaktiivsetel loomadel. Seega võib 8-nädalane paus pullide spermavarumises toimida pärssivalt spermatogeneesi reguleerivate hormoonide produktsioonile.

Mitmete uuringute põhjal on selgunud, et spermide liikumiskarakteristikute uurimine kompuuteranalüüsi (CASA) abil annab hea ülevaate nii värske kui ka sügavkülmutatud sperma kvaliteedist (Wood jt, 1986; Januskauskas, Rodriguez-Martinez, 1995; Rodriguez-Martinez, 1998; Versteegen jt, 2002). Mitmed autorid on leidnud valgusmikroskoobi (Saacke, 1983; Budworth jt, 1988; Amann, 1989; Söderquist, 1991a; Januskauskas, 1995) ja kompuuteranalüüsi abil (Hobson jt, 1996; Zhang jt, 1997; Holt jt, 1997; Farell jt, 1998) hinnatud spermide spetsiifiliste liikumiskarakteristikute positiivse korrelatsiooni emasloomade tiinestumisega. Eesti

punast tõugu pullide spermide üldise liikuvuse, SKS ja SRL dünaamika esimeses viies ejakulaadis pärast pikaajalist vahet sperma varumises näitas tõusutendentsi. On teada, et nii üldine spermide liikuvus kui ka liikumiskiirus võivad olla seotud ATP-(adenosiintrifosfaat) sisaldusega spermaplasmas. Mitmed uurijad on leidnud positiivse korrelatsiooni spermide liikumisvõime ja ATP-sisalduse vahel (Foulkes, MacDonald 1979; Söderquist, Larsson, 1985; Söderquist, 1991b; Januskauskas, Rodriguez-Martinez, 1995), sügavkülmutatud sperma ATP-sisalduse ning spermide liikuvuse ja spermimembraanide terviklikkuse vahel (Januskauskas, 1995). Samas puuduvad kirjanduses viited sperma ATP-sisalduse võimaliku vähenemise kohta spermakogumise teatud ajaks katkestamise või stressi tõttu. Seepärast pole käesolevas uuringus võimalik püstitada ka põhjendatud hüpoteesi spermide liikumiskarakteristikute paranemise selgitamiseks uurimisperioodil.

Spermide liikumiskarakteristikute dünaamika sügavkülmutatud spermas pärast pikaajalist pausi spermakogumises näitas samuti tõusutendentsi. Üheks põhjuseks on kindlasti asjaolu, et paranes spermide liikuvus värskes spermas. Kuid spermide liikuvus ja liikumiskiirus värskes pullispermas suurenesid 0,50–3,41% võrra, samad näitajad sügavkülmutatud pullispermas paranesid aga 5,61–9,81% võrra. See viitab asjaolule, et sperma varumise taasalustamisel paranes järk-järgult ka spermide vastupidavus sügavkülmutamisele. See võib tuleneda spermimembraani ja spermaplasma proteiinide paranenud kaitsevõimest. P. Surai (2003) andmetel asub spermi keskosas kapsliline selenoproteiin, mis kuulub selenoproteiinide *GSH-Px* (glutatiooni peroksidaas) hulka, mille viimane liige, spermi tuuma *GSH-Px* (*sperm nuclear GSH-Px*; Behne jt, 2000; Pfeifer jt, 2001) määrati kindlaks alles hiljuti. See kapsliline selenoproteiin on suure tõenäosusega antioksüdatiivsete omadustega. Spermaplasma proteiinide kaitsvat mõju spermidele, nende liikuvusele ja viljastamisvõimele on leidnud mitmed uurijad (Vierula, 1997; Bellin jt, 1998; Henault, Killian, 1996; McCauley jt, 1999).

Kokkuvõte

Pärast pullide ümberpaigutamist ja 54-päevast vahemikku spermavarumises oli eesti punast tõugu sugupullide ejakulaadi maht ja spermide kontsentratsioon järgnenud viienädalase uurimisperioodi jooksul stabiilne.

Pärast spermakogumise taasalustamist vähenes igas järgmises ejakulaadis patoloogiliste spermide esinemissagedus, kuigi erinevate morfoloogiliste tunnuste osas statistilisi erinevusi järgnevate ejakulaatide vahel ei täheldatud.

Liikuvate spermide osakaal suurenes viie nädala jooksul oluliselt nii värskes kui ka sügavkülmutatud spermas. Paranemistendents oli jälgitav ka teiste uuritud liikumiskarakteristikute, otseliikuvuse, SKL, SKT, SKS, SRL ja SKA osas, kusjuures sügavkülmutatud sperma puhul olid muutused olulised kõigi parameetrite puhul, värskel spermal aga ainult SKS ja SRL osas.

Seega võime järeldada, et eesti punast tõugu pullide sperma kvaliteet ja krüoresistentsus pärast 54-päevast pausi spermavarumises ja kohanemist uute keskkonnatingimustega paranesid oluliselt 5 nädala jooksul pärast spermakogumise taasalustamist.

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

Kirjandus

- Amann, R. P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? – *J. Androl.* 10, p. 89–98.
- Barth, A. D. 1992. The relationship between sperm abnormalities and fertility. – *Proc 14th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. Nat. Assoc. Breeders*, p 47–60.
- Barth, A. D., Bowman, P. A. 1994. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. – *Can. Vet. J.*, 35, 2, p 93–102.
- Behne, D., Rothlein, D., Pfeifer, H., Kyriakopoulos, A. 2000. Identification and characterisation of new mammalian selenoproteins. – *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 14, 117.
- Bellin, M. E., Ogarso, J. N., Hawkins, H. E., Zang, H. M., Smith, R. G., Forrest, D. W., Sprott, L. R., Ax, R. L. 1998. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. – *J. Anim. Sci.*, 76, p. 2032–2039.
- Budworth, P. R., Amann, R. P., Chapman, P. L. 1988. Relationships between computerized measurements of motion of frozen thawed bull spermatozoa and fertility. – *J. Androl.*, 9, p. 41–54.
- Correa, J. R., Pace, M. M., Zavos, P. M. 1997. 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*, 48, p. 721–731.
- Cranfield, N., Revell, S. 2000. 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, Vol. 2, p. 5.

- Farell, P. B., Presicce, G. A., Brockett, C. C., Foote, R. H. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. – *Theriogenology*, 49, p. 871–879.
- Forsberg, M. Hormonal Control of Male Reproductive Function. – Nordic Research Course in Diagnostic and Experimental Animal Andrology, May 1996.
- Foulkes, J. A., MacDonald, B. J. 1979. The relationship between ATP content and motility of bovine spermatozoa. – *Theriogenology*, 11, p. 313–316.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th edition. – Lippincott Williams & Wilkins.
- Henault, M. A., Killian, G. J. 1996. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. – *J. Report Fert.* 46, p. 227–229.
- Hobson, S., Roe, H., Houghton, A. 1996. Relationship between sperm motion and the achievement of fertility. In: Proc. Meet. "Techniques for Gamete Manipulation and Storage". – Hamilton, New Zealand, June 22–25, p. 55.
- Holt, C., Holt, W. V., Moore, H. D. M., Reed, H. C. B., Curnock, R. M. 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. – *J. Androl.*, 18, p. 312–23.
- Januskauskas, A. 1995. Studies on the assessment of post-thaw sperm viability in Swedish dairy AI bulls. – Thesis, Uppsala. – 28 pp.
- Januskauskas, A., Rodriguez-Martinez, H. 1995. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen-thawed bull semen. – *Acta Vet. Scand.*, 36, p. 571–574.
- Januskauskas, A., Söderquist, L., Håård, M. G., Håård, M. Ch., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H. 1996. 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.
- Linford, E., Glover, F. A., Bishop, C., Stewart, D. L. 1979. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. – *J. Reprod. Fertil.*, 47, p. 283–291.
- Liu, Z., Foote, R. H. 1998. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. – *J. Dairy Sci.*, 81(7), p. 1868–73.
- Majas, L. 1972. Pullide spermaproduksioon ja suguline aktiivsus. Dissertatsioon põllumajandusteaduste kandidaadi kraadi taotlemiseks. – Tartu, lk 202.
- Malmgren, L., Söderquist, L. 1998. Effects of scrotal insulation on the viability of fresh, cooled stored, and frozen/thawed stallion semen. *Gametes Development and functions, Serono Symposia*, p. 570.
- McCauley, T. C., Zhang, H. M., Bellin, M. E., Ax, R. L. 1999. Purification and characterization of fertility-associated antigen (FAA) in bovine seminal Fluid. *Mol. Reprod. Dev.* 54, p. 145–153.
- Padrik, P., Jaakma, Ü. 2002. Eesti holsteini tõugu sugupullide spermide morfoloogia, seda mõjutavad tegurid ja seos emasloomade tiinestumisega. – *Agraarteadus* 13, 4, lk 243–256.
- Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Breilmeier, M., Bornkamm, G. W., Behne, D. 2001. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. – *FASEB Journal*, 15, p. 1236–1238.
- Rodriguez-Martinez, H. 1998. Optimization of Sperm Quality in AI Bulls. *Reproduction in Domestic Animals*, 33, p. 233–237.
- Saacke, R. G. 1983. Semen quality in relation to semen preservation. – *J. Dairy Sci.*, 66, p. 2635–2644.
- Sekoni, V. O., Gustafsson, B. K. 1987. Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. – *Br. Vet. J.*, Vol. 143, No.4, p. 312–317.
- Slaweta, R. 1986. Morphological changes in the acrosome of bull spermatozoa during various seasons of the year. – *Pol. Arch. Weter.* 26 (3–4), p. 67–73.
- Surai, P. 2003. Antioxidants and their role in stress conditions. – *Alltech's Annual European, Middle Eastern and African Lecture Tour*, p. 44–63.
- Söderquist, L., Jansson, L., Håård, M., Einarsson, S. 1996. 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.
- Söderquist, L., Jansson, L., Larsson, K., Einarsson, S. 1991. Sperm morphology and fertility in dairy AI bulls. – *J. Vet. Med.*, vol. 38, p. 534–543.
- Söderquist, L., Larsson, K. 1985. Relationship between ATP content and post-thaw motility in bull semen. – *Acta Vet. Scand.*, 26, p. 308–312.
- Söderquist, L. 1991. Sperm characteristics and fertility in dairy A.I. bulls. – Thesis, Uppsala.
- Söderquist, L. 1991b. ATP content and sperm motility of extended bovine semen under different storage conditions. – *Acta Vet. Scand.*, 32, p. 511–518.

- Zhang, B.R., Larsson, B., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H. 1997. 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.
- Zhang, B. R., Larsson, B., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H. 1998. 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.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. – *Theriogenology*, 57, p. 149–179.
- Vierula, M. Epidymal function. Different aspects in animal andrology. – NOVA-BA Postgraduate Research Course, December 1–5, 1997.
- Vogler, C. J., Saacke, R. G., Barne, J., DeJarnette, J. M., McGilliard, M. L. 1991. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine spermatozoa. – *J. of Dairy Sci.*, 74, p. 3827–3835.
- Vogler, C. J., Barne, J., DeJarnette, J. M., McGilliard, M. L., Saacke, R. G. 1993. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. – *Theriogenology*, 40, p. 1207–1220.
- Wood, P. D. P., Foulkes, J. A., Shaw, R. C., Melrose, D. R. 1986. Semen assessment, fertility and the selection of Hereford bulls for use in A.I. – *J. Reprod. Fert.*, 76, p. 783–795.

Semen quality in Estonian Red dairy A.I. bulls after relocation and 54-days pause in semen collection

P. Padrik, Ü. Jaakma

Summary

The aim of the current research was to study quality of semen of Estonian Red dairy A.I. bulls after the 54-days interval in semen collection caused by the relocation of the bulls and their adaptation.

Ninety-five ejaculates were collected from 19 Estonian Red bulls during the period from February 2003 to March 2003 to study the semen volume, sperm concentration, morphology and motility characteristics. During that period one ejaculate per week was collected from each bull. The average age of the bulls was 27 months (20–28 months) and average weight 655 kg (508–680 kg). Fifty four days before the study the bulls were transferred from their previous location to the another AI station (~160 km). In addition to transport and new location, the bulls had some changes in the feed ratio where silage and sunflower cake were added. After the period of adaptation the semen collection started again.

The volume of semen was determined with a calibrated glass collector with 0,5 ml accuracy. Semen concentration was determined with a photometer (SDM-5, Minitüb GmbH&Co, Germany) with an accuracy of 1×10^6 spermatozoa/ml.

Sperm motility in fresh and frozen/thawed semen was determined with a computer assisted motility analyser (CMA, Computer Assisted Cell Motion Analyser, Sperm Vision, Minitüb GmbH&Co, Germany). The fresh semen was diluted in ratio 1:10 in Triladyl (Minitüb GmbH&Co, Germany) and egg yolk extender. The frozen semen straw was thawed by plunging it in a water at +35 °C for 20 sec. The preparations were studied in Makler chamber, evaluating totally ~400 spermatozoa from 4–5 different fields (x 400) and estimating percentage of motile and progressively motile spermatozoa, velocity average path (VAP, $\mu\text{m}/\text{sec}$), velocity curve line (VCL, $\mu\text{m}/\text{sec}$), velocity straight line (VSL, $\mu\text{m}/\text{sec}$), linearity (LIN; VSL/VCL), beat cross frequency (BCF) and, amplitude of lateral head displacement (ALH, μm).

For sperm morphology evaluation, air dried smears 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 contract microscope (x 1000). Different morphological abnormalities (detached heads, abnormal heads, abnormal necks, proximal and distal cytoplasmic droplets, abnormal midpieces and abnormal tails) were registered in each preparation as a percentage of the total number of counted spermatozoa.

Analysis of variance were used for analysis of differences in semen volume, sperm concentration, frequency of sperm abnormalities and sperm motility during the study period. Differences were considered significant when $P < 0,05$.

The results of the study showed that the semen volume and sperm concentration did not change significantly during the study period (Table 1). The decrease in the frequency of abnormal spermatozoa in fresh semen was recorded in each consecutive ejaculate ($P < 0,05$; Table 2). The first ejaculates contained 13.9% of abnormal sperms on an average, mostly detached heads (4.1 %) and abnormal midpieces (5.3 %). The proportion of abnormal spermatozoa in the 5th ejaculates was 1.8 times lower than in first ejaculates (Table 2).

Small increase was recorded for the ratio of motile spermatozoa in fresh semen (Table 3). There was 3.41 % more motile spermatozoa in the 5th ejaculate than in the 1st ($P < 0.05$). The same tendency was observed for progressive motility and velocity characteristics, however only changes in VSL and BFS were statistically different ($P < 0.05$, Table 3).

The study showed even more clear improvement of motility characteristics in frozen/thawed semen than in fresh semen. The average sperm motility and progressive motility increased for 5.6 % and 9.7 % when the 5th ejaculate was compared to the 1st ejaculate ($P < 0.05$; Table 4). The kinetic characteristics VCL, VAP and VSL showed improvement after three week of semen collection ($P < 0.05$; Table 4). BFS and ALH were significantly higher in frozen/thawed semen on week 5 compared to weeks 1 and 3.

The results of the study showed that the quality of semen of the Estonian Red A.I. bulls, previously transferred from one A.I. station to the another, improved significantly during 5 weeks after recommencement of semen collection.

The study was financially supported by the Estonian Science Foundation (grant No 4807) and the Estonian Animal Breeders' Association.