

EESTI HOLSTEINI TÕUGU SUGUPULLIDE SÜGAVKÜLMUTATUD/SULATATUD SPERMIDE LIIKUMISKARAKTERISTIKUD JA NENDE SEOS EMASLOOMADE TIINESTUMISEGA

P. Padrik, Ü. Jaakma

ABSTRACT. *Sperm motility characteristics of Estonian Holstein dairy bulls and their relations to fertility. The aim of the current study was to evaluate the influence of Estonian Holstein AI bulls' age and season of semen collection on sperm motility characteristics estimated by CASA, and to determine the correlations between frozen/thawed sperm motility characteristics and bulls' in vivo fertility expressed as non-return rates (NRR) of the dairy cows and heifers.*

The results of the study showed that the increase in bulls' age from 1...2 to 3...4 years was accompanied by the increase in the proportions of motile and progressively motile spermatozoa in frozen/thawed semen. An opposite tendency, decrease in sperm progressive motility was recorded from 3...4 to 5...7 years of age.

The mean overall and progressive sperm motility in frozen/thawed samples varied between the seasons. The results of the study showed that the proportion of progressively motile sperms was the highest in winter, from December to February ($P < 0.05$).

The positive correlation was detected between the frozen/thawed sperm motility and the results of the hypo-osmotic tests carried through in fresh semen ($r = 0.69$; $P < 0.005$).

The significant positive correlations were recorded between the mean percentage of motile spermatozoa in frozen/thawed semen both on ejaculate and bull level and 60-days NRR ($r = 0.69$ and $r = 0.68$, respectively; $P < 0.005$).

Keywords: *dairy AI bull, sperm motility, age, season, fertility.*

Sissejuhatus

Sügavkülmutatud/sulatatud sperma kvaliteet mõjutab oluliselt lehmade ja mullikate tiinestumist (Amann *et al.*, 2000; Januskauskas *et al.*, 2000; Tanghe *et al.*, 2002). Seetõttu on seemendusjaamas vaja rakendada selliseid sperma hindamise meetodeid, mis annavad objektiivse ülevaate sügavkülmutatud/sulatatud sperma kvaliteedist ja mille tulemused korreleeruvad hästi emasloomade tiinestumisega.

Spermide liikuvus värskes ja sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas on üks olulisemaid sperma kvaliteedi parameetreid. Aastaid on seemendusjaamades spermide liikuvust hinnatud valgusmikroskoobi abil, kuid selle puuduseks on subjektiivsus. Tänapäeval kasutatakse üha enam spermide liikuvuse hindamist kompuuteranalüüsi (*Computer Assisted Cell Motion Analyser, CMA*) abil, millega saab määrata nii spermide üldist liikuvust kui ka spetsiifilisi liikumiskarakteristikuid. Selle meetodi eelisteks on objektiivsus ja kiirus.

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada pulli vanuse ja sperma kogumise aastaaja mõju eesti holsteini tõugu pullide sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikutele ning nende näitajate seos emasloomade tiinestumise ja spermide osmoresistentsusega. Viimane on praktikas laialt levinud spermimembraanide funktsionaalse terviklikkuse hindamise parameetrik.

Materjal ja meetodika

Spermide liikumiskarakteristikute väljaselgitamiseks sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas uuriti 96 sugupulli 722 ejakulaadist valmistatud spermadoose. Ejakulaadid koguti ajavahemikus juuni 2002 kuni juuli 2003. Selle perioodi vältel võeti hinnatud pullidelt keskmiselt 3–6 ning noorpullidelt 2–4 ejakulaati kuus. Sperma lahjendamiseks kasutati Triladyli (*Minitüb GmbH&CO, Germany*) ja munarebu lahjendit. Värske sperma lahjendati pärast viie minutit 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 $\sim 30 \times 10^6$ sperm. Seejärel asetati lahjendatud sperma külmikusse (+4 °C). Kahetunnist jahutamise järel pakendati sperma 0,25 ml spermakõrrekestesse (*Minitüb GmbH&CO, Germany*). Pärast kahetunnist ekvilibreerumist spermakõrrekesed sügavkülmutati.

Spermide liikumiskarakteristikud värskes ja sügavkülmutatud pullispermas määrati kompuuteranalüüsi (*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 korral sulatati spermakõrreke +35 °C juures 20 sekundi jooksul. Nii värske kui ka sügavkülmutatud sperma puhul uuriti Makleri kambris iga proovi 4–5 erinevalt väljalt 400× suurendusel kokku ~400 spermide. Määrati järgmised näitajad:

liikuvate spermide % / *Motility %*,
 otseliikuvate spermide % / *Progressive Motility %*,
 spermide kiirus trajektooriga (SKT, µm/s) / *Velocity Average Path (VAP, µm/s)*,
 spermide kiirus liikumisteedel (SKL, µm/s) / *Velocity Curve Line (VCL, µm/s)*,
 spermide kiirus sirgjoonel (SKS, µm/s) / *Velocity Straight Line (VSL, µm/s)*,
 spermide otseliikuvus SOL (SKS/SKL) / *Linearity LIN (VSL/VCL)*,
 spermide ristumissagedus liikumistrajektooriga (SRL, Hz) / *Beat Cross Frequency (BCF, Hz)*,
 spermide kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektooriga (SKA, µm) / *Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH, µm)*.

Intaktse (funktsionaalselt tervikliku) membraaniga spermide osakaalu määramiseks kasutati hüpoosmootseid teste.

1. HOT-1 (Jeyendran *et al.*, 1984). Spermakõrreke sulatati +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 naatriumsitraati, 1,351 g fruktoosi, 100 ml destilleeritud vett; lahuste osmootne rõhk 150 mOsm/kg). Pärast hoolikat segamist asetati katseklaas termostaati ning inkubeeriti 60 minutit +37 °C juures. Seejärel lisati katseklaasi 0,3 ml eosini, valmistati märgpreparaat ja loendati pundunud sabaga spermid 1000-kordsel suurendusel faaskontrastmikroskoobis. Igast preparaadist loendati 100 spermide ning pundunud spermide osakaal avaldati protsentides kahe preparaadi keskmisena.

2. HOT-2 testi (Padrik, 1999) abil selgitati, kuidas muutub pundunud membraanidega spermide osakaal erinevates hüpoosmootsetes lahustes. Selleks kasutati NaCl-lahuseid kontsentratsiooniga 0,2 ja 0,4%, mille osmootne rõhk oli vastavalt 66 ja 130 mOsm/kg. Ühe spermakõrre sisu tühjendati pärast sulatamist (+35 °C, 20 sekundit) katseklaasi 1 ml NaCl-lahusesse. Pärast inkubeerimist toatemperatuuril (+20 °C, 2 minutit) lisati lahusesse 0,3 ml eosini ning valmistati märgpreparaadid. Igast preparaadist loendati 100 spermide ning pundunud sabaga spermide osakaal avaldati protsentides kahe preparaadi keskmisena. Iga ejakulaadi jaoks arvutati ΔHOT, mille saamiseks intaktse membraaniga 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.

3. HOT-3 testiks (Padrik jt, 2000) sulatati kolm spermakõrre (+35 °C, 20 sekundit), tühjendati 3 ml 2,9% naatriumsitraadi lahusesse (Tallinna Farmaatsiatehas) katseklaasis ning segati. Seejärel asetati katseklaas spermide suspensiooniga termostaati +37 °C juurde kuueks tunniks. Pärast seda pipeteeriti 0,1 ml spermide suspensiooni katseklaasidesse, kus igatühes oli 1 ml erineva osmootse rõhuga NaCl-lahust (66 ja 130 mOsm/kg). Kaheminutilise inkubeerimise järel toatemperatuuril (~20 °C) valmistati spermide suspensioonidest NaCl-lahustes märgpreparaadid ning loendati pundunud sabaga spermide osakaal. Igas preparaadis vaadeldi 100 spermide (1000-kordsel suurendusel) ning pundunud sabaga spermide osakaal arvutati protsentides kolme preparaadi keskmisena. ΔHOT arvutati samasugusel viisil nagu HOT-2 testi puhul.

Selgitamiseks sugupulli vanuse mõju spermide liikumiskarakteristikutele, jaotati pullid kolme gruppi: 1–2-aastased (58 pulli), 3–4-aastased (32 pulli) ja 5–6-aastased (8 pulli).

Sperma kogumise aastaaja mõju spermide liikumiskarakteristikutele uuriti talvel (detsember, jaanuar, veebruar), kevadel (märts, aprill, mai), suvel (juuni, juuli, august) ja sügisel (september, oktoober, november).

Spermide liikumiskarakteristikute ja tiinestumise vahelise seose kindlakstegemiseks kasutati 17 sugupulli 61 ejakulaati. Nendest ejakulaatidest valmistatud seemendusdoosidega tehti 4750 katseseemendust (keskmiselt 279 seemendust pulli kohta ja 78 seemendust ejakulaadi kohta). Tiineks loeti emasloomad, kes ei innelnu uuesti 60 päeva jooksul pärast seemendamist.

Uuringute tulemuste statistilises analüüsis kasutati erinevuste olulisuse hindamiseks t-testi ja dispersioonanalüüsi. Tunnustevahelised erinevused loeti tõenäoseks, kui $P < 0,05$ (* kui $P < 0,05$; ** kui $P < 0,01$; *** kui $P < 0,001$). Tunnustevaheliste seoste hindamiseks kasutati Pearsoni korrelatsioonikordajat. Tunnustevahelist seost loeti järgmiselt: nõrk seos, kui $r \leq 0,3$; keskmine seos, kui $0,3 < r < 0,7$; tugev seos, kui $r \geq 0,7$.

Uurimistulemused

Pulli vanuse mõju sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikutele

Uurimistulemused näitasid, et liikuvate spermide osakaal sügavkülmutatud spermas ei muutu oluliselt pullide vanuse suurenedes (tabel 1). Otseliikuvate spermide osakaal oli 5–7-aastastel pullidel väiksem kui 3–4-aastastel pullidel ($P < 0,05$). SKA, SKL ja SKT olid suurimad 3–4-aastaste pullide grupis, erinedes oluliselt ($P < 0,05$) 5–7-aastaste ja 1–2-aastaste pullide samadest näitajatest. Loetletud näitajad olid ka 1–2-aastastel

sugupullidel veidi kõrgemad kui 5–7-aastastel, kuid statistiliselt oluline erinevus ilmnes vaid SKT ja SKS osas. Spermide otseliikuvus (SOL) oli oluliselt vähenenud 5–7-aastastel pullidel ($P < 0,05$).

Tabel 1. Pulli vanuse mõju sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikutele
Table 1. Influence of bulls' age on frozen/thawed sperm motility characteristics

Spermide liikumiskarakteristikud <i>Sperm motility characteristics</i>	Pulli vanus aastates / <i>Age of bulls (years)</i>		
	1–2	3–4	5–7
Pulle / <i>No of bulls</i>	56	32	8
Ejakulaate / <i>No of ejaculates</i>	339	219	167
1. Liikuvate spermide % / <i>Overall motility %</i>	69,00	69,72	68,76
2. Otseliikuvate spermide % / <i>Progressive Motility %</i>	57,98 ^{ab}	59,07 ^a	56,50 ^b
3. SKL/VCL ($\mu\text{m/s}$)	87,24 ^a	92,67 ^b	86,48 ^a
4. SKT/VAP ($\mu\text{m/s}$)	56,93 ^a	58,66 ^b	54,20 ^c
5. SKS/VSL ($\mu\text{m/s}$)	44,74 ^a	45,34 ^a	41,18 ^b
6. SOL/LIN	0,50 ^a	0,50 ^a	0,47 ^b
7. SRL/BCF (Hz)	29,33	29,45	29,20
8. SKA/ALH (μm)	2,58 ^a	2,69 ^b	2,53 ^a

^{a,b,c} – Erinevate ülaindeksitega väärtused samas reas on statistiliselt erinevad ($P < 0,05$) / *Values with different superscripts in a row are significantly different ($P < 0.05$)*

SKT – spermide kiirus trajektooriga ($\mu\text{m/s}$) / *VAP – Velocity Average Path ($\mu\text{m/s}$);*

SKL – spermide kiirus liikumistekonnal ($\mu\text{m/s}$) / *VCL – Velocity Curve Line ($\mu\text{m/s}$);*

SKS – spermide kiirus sirglõigul ($\mu\text{m/s}$) / *VSL – Velocity Straight Line ($\mu\text{m/s}$);*

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

SRL – spermide ristumissagedus liikumistrajektooriga (Hz) / *BCF – Beat Cross Frequency (Hz);*

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

Aastaaegade mõju sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikutele

Talvel ja sügisel kogutud ja külmutatud spermas oli liikuvate spermide osakaal suurem kui kevadel ja suvel (tabel 2, $P < 0,05$). Sügisel täheldati otseliikuvate spermide osakaalu olulist vähenemist võrreldes teiste aastaaegadega ($P < 0,05$), samas suurenesid spermide ristumissagedus liikumistrajektooriga ja kõrvalekaldeamplituud (SKA puhul oli erinevus oluline kõigi teiste aastaaegadega, SRL puhul talvega võrreldes, $P < 0,05$). Sperma kogumise aastaaeg ei mõjutanud oluliselt spermide liikumiskiiruse trajektooriga, liikumistekonnal ja sirglõigul ($P > 0,05$).

Tabel 2. Aastaaegade mõju sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikutele
Table 2. Seasonal variation in frozen/thawed sperm motility characteristics

Spermide liikumiskarakteristikud <i>Sperm motility characteristics</i>	Aastaaeg/Season			
	Talv <i>Winter</i>	Kevad <i>Spring</i>	Suvi <i>Summer</i>	Sügis <i>Autumn</i>
Pulle/ <i>No of bulls</i>	62	54	34	67
Ejakulaate/ <i>No of ejaculates</i>	211	166	139	206
1. Liikuvate spermide % / <i>Overall motility %</i>	70,33 ^a	67,80 ^b	67,70 ^b	69,55 ^a
2. Otseliikuvate spermide % / <i>Progressive Motility %</i>	59,60 ^a	57,60 ^a	58,63 ^a	56,48 ^b
3. SKL/VCL ($\mu\text{m/s}$)	88,61	89,13	91,15	88,66
4. SKT/VAP ($\mu\text{m/s}$)	57,15	57,26	57,65	56,30
5. SKS/VSL ($\mu\text{m/s}$)	44,03	45,57	45,70	43,43
6. SOL/LIN	0,49 ^a	0,51 ^{ab}	0,50 ^a	0,48 ^b
7. SRL/BFS(Hz)	28,97 ^a	29,30 ^{abc}	29,66 ^b	29,70 ^{bc}
8. SKA/ALH (μm)	2,55 ^a	2,52 ^a	2,50 ^a	2,78 ^b

^{a,b,c} – Erinevate ülaindeksitega väärtused samas reas on statistiliselt erinevad ($P < 0,05$) / *Values with different superscripts in a row are significantly different ($P < 0.05$)*

SKT – spermide kiirus trajektooriga ($\mu\text{m/s}$) / *VAP – Velocity Average Path ($\mu\text{m/s}$);*

SKL – spermide kiirus liikumistekonnal ($\mu\text{m/s}$) / *VCL – Velocity Curve Line ($\mu\text{m/s}$);*

SKS – spermide kiirus sirglõigul ($\mu\text{m/s}$) / *VSL – Velocity Straight Line ($\mu\text{m/s}$);*

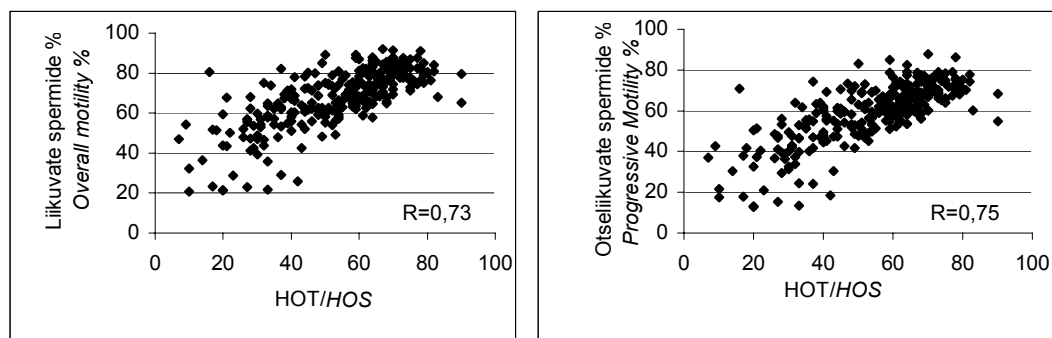
SOL – spermide otseliikuvus (SKS/SKL) / *LIN – Linearity (VSL/VCL);*

SRL – spermide ristumissagedus liikumistrajektooriga (Hz) / *BCF – Beat Cross Frequency (Hz);*

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

Sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikute seos spermide osmoresistentsusega värskes spermas

Värskes pullispermas määratud spermide osmoresistentsuse ja sügavkülmutatud/sulatatud sperma liikuvate ja otseliikuvate spermide osakaalu vahel on tugev korrelatsioon, vastavalt $r=0,73$ ($P<0,005$) ja $r=0,75$ ($P<0,005$; joonised 1 ja 2).



HOT – Funktsionaalselt tervikliku membraaniga spermide % / HOS – spermatozoa with intact membranes, %

Joonis 1. Värske sperma HOT-1 ja sügavkülmutatud/sulatatud liikuvate spermide vaheline seos

Figure 1. Correlation between HOT-1 in fresh semen and sperm overall motility in frozen/thawed semen

Joonis 2. Värske sperma HOT-1 ja sügavkülmutatud/sulatatud otseliikuvate spermide vaheline seos

Figure 2. Correlation between HOT-1 in fresh semen and sperm progressive motility in frozen/thawed semen

Spermide liikumiskarakteristikute ja osmoresistentsuse vahelised seosed sügavkülmutatud/sulatatud spermas

HOT-2 testi tulemuste ja spermide liikumiskarakteristikute vahel ilmneseid mõnevõrra tugevamad seosed võrreldes HOT-3-ga (tabel 3). Kõige tugevam positiivne korrelatsioon oli liikuvate spermide osakaalu ja HOT-2 tulemuste vahel ($r=0,64$; $P<0,01$), samas oli korrelatsioon otseliikuvate spermide osakaalu ja HOT-2 vahel negatiivne ($r=-0,35$; $P>0,05$). Ka HOT-3 tulemused korreleerisid liikuvate spermide osakaaluga pärast külmutamist/sulatamist ($r=0,50$; $P<0,01$) ning samuti oli tegemist negatiivse seosega otseliikuvate spermide osakaalu ja HOT-3 vahel ($r=-0,34$; $P>0,05$; tabel 3).

Tabel 3. Spermide liikumiskarakteristikute ja osmoresistentsuse vaheline seos sügavkülmutatud spermas

Table 3. Correlations between sperm motility characteristics and membrane hypoosmotic resistance in frozen/thawed semen

Spermide liikumiskarakteristikud <i>Sperm motility characteristics</i>	Korrelatsioon HOT-testi ja spermide liikumiskarakteristikute vahel / <i>Correlations between HOS and sperm motility characteristics</i>	
	HOT-2 HOS-2	HOT-3 HOS-3
1. Liikuvate spermide % / <i>Overall motility %</i>	0,64**	0,50**
2. Otseliikuvate spermide % / <i>Progressive Motility %</i>	0,58**	0,49**
3. SKL/VCL ($\mu\text{m/s}$)	0,42**	0,40**
4. SOL/LIN	-0,35	-0,34
5. SKA/ALH (μm)	0,48**	0,36**

HOT-2 – hüpoosmootne test 2 / HOS-2 – *Hypo-osmotic test 2*;

HOT-3 – hüpoosmootne test 3 / HOS-3 – *Hypo-osmotic test 3*

SKL – spermide kiirus liikumisteedkonnal ($\mu\text{m/s}$) / *VCL – Velocity Curve Line ($\mu\text{m/s}$)*;

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

SKA – spermide kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektorist (μm) / *ALH – Amplitude of Lateral Head Displacement (μm)*

Emasloomade tiinestumise ja sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikute vaheline seos

Sügavkülmutatud/sulatatud spermas määratud liikuvate ja otseliikuvate spermide osakaal olid keskmise tugevusega positiivses korrelatsioonis emasloomade tiinestumisega (tabel 4). Sealjuures oli korrelatsioon kõige tugevam liikuvate spermide osakaalu ja tiinestumise vahel nii uuritud ejakulaatide kui ka pullide lõikes (mõlemal juhul $r=0,69$, $P=0,005$).

Tabel 4. Emasloomade tiinestumise ja sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikute vaheline seos
Table 4. Correlations between sperm motility characteristics in frozen/thawed semen and 60-days NRR

Spermi liikumiskarakteristikud <i>Sperm motility characteristics</i>	61 ejakulaati / 61 <i>batches</i>		17 pulli / 17 <i>bulls</i>	
	r	P	r	P
1. Liikuvate spermide % / <i>Overall motility %</i>	0,69	0,005	0,69	0,005
2. Otseliikuvate spermide % / <i>Progressive Motility %</i>	0,66	0,005	0,62	0,005
3. SKL/VCL ($\mu\text{m/s}$)	0,59	0,005	0,64	0,005
4. SKT/VAP ($\mu\text{m/s}$)	0,33	0,05	0,36	>0,1
5. SKS/VSL ($\mu\text{m/s}$)	0,40	>0,1	-0,07	>0,1
6. SOL/LIN	-0,54	>0,1	-0,55	>0,1
7. SRL/BFS (Hz)	-0,49	>0,1	-0,55	>0,1
8. SKA/ALH (μm)	0,55	0,005	0,61	0,01

SKT – spermide kiirus trajektoiril ($\mu\text{m/s}$) / VAP – Velocity Average Path ($\mu\text{m/s}$);

SKL – spermide kiirus liikumisteedkonnal ($\mu\text{m/s}$) / VCL – Velocity Curve Line ($\mu\text{m/s}$);

SKS – spermide kiirus sirglõigul ($\mu\text{m/s}$) / VSL – Velocity Straight Line ($\mu\text{m/s}$);

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

SRL – spermide ristumissagedus liikumistrajektooriga (Hz) / BCF – Beat Cross Frequency (Hz)

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

Spermide spetsiifiliste liikumiskarakteristikute osas leiti keskmise tugevusega korrelatsioon SKA, SKT ja SKL ning emasloomade tiinestumise vahel. Kõige tugevam oli see näitaja SKL ja emasloomade tiinestumise vahel, ejakulaatide lõikes $r=0,59$ ($P<0,005$) ja pullide lõikes $r=0,64$ ($P<0,01$).

Uurimusest selgus, et emasloomade tiinestumisel puudub oluline seos SKS, SRL ja SOL-ga ($P>0,1$).

Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada pulli vanuse ja sperma kogumise aastaaja mõju eesti holsteini tõugu pullide sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikutele ning viimaste seos spermide osmoresistentsuse ja emasloomade tiinestumisega.

Spermide liikumiskarakteristikute määramiseks on kaks võimalust. Esiteks, subjektiivne liikuvuse hindamine valgusmikroskoobi abil, kus vastavalt liikumise iseloomule (trajektoori kuju ning silma järgi hinnatud liikumiskiirus) jagatakse spermid erinevatesse rühmadesse (Padrik jt, 2000). Teiseks, objektiivne spermide liikuvuse hindamine kompuuteranalüüsi abil, mis võimaldab registreerida iga spermi liikumistrajektoori ja liikumiskiiruse. Mitmete uuringute põhjal on selgunud, et spermide liikumiskarakteristikute uurimine kompuuteranalüüsi abil annab hea ja objektiivse ülevaate nii värske kui ka sügavkülmutatud sperma kvaliteedist (Januskauskas, Rodriguez-Martinez, 1995; Rodrigues-Martinez, 1998; Versteegen *et al.*, 2002; Marco-Jimenez *et al.*, 2002) ning selle tulemused korreleeruvad hästi emasloomade tiinestumisega (Farell *et al.*, 1998; Al-Qarawi *et al.*, 2002; Januskauskas *et al.*, 2003). Samas on mitmed autorid leidnud ka subjektiivselt valgusmikroskoobis hinnatud spermide liikumiskarakteristikute ja tiinestumise vahel positiivse korrelatsiooni (Saacke, 1983; Amann, 1989; Kjaestad *et al.*, 1993; Januskauskas, Rodriguez-Martinez 1995; Januskauskas *et al.*, 2003). Meie uuringud näitasid, et kõige enam on liikuvaid ja otseliikuvaid sperme sügavkülmutatud/sulatatud spermas 3–4-aastaste pullide rühmas, kuigi statistiline erinevus ($P<0,05$) ilmnis ainult 3–4-aastaste ja 5–7-aastaste pullide vanuserühmade vahel otseliikuvate spermide osas. Mitmed teised autorid on samuti täheldanud sugupulli vanuse mõju spermide liikuvusele (Lunstra, Echterncamp, 1982; Mathevon *et al.*, 1998; Picard-Hagen *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2002). Meie uuringust selgus, et ka spermide liikumiskiirust iseloomustavad parameetrid SKL, SKT ja SKS kasvasid pulli vanuse suurenedes 1–2 kuni 3–4 aastani ja seejärel näitasid uuesti vähenemistendentsi 5–7-aastastel pullidel. Liikuvate ja otseliikuvate spermide osakaalu suurenemine pulli vanuse suurenedes 1–2 aastalt 3–4 aastani võib olla tingitud sugupulli jätkuvast kasvust ja arengust, millega kaasneb ka munandite kasv ja ümbermõõdu suurenemine. J. Chanon jt (2002) leidsid oma uurimuses, et munandite ümbermõõdud on tugevalt seotud sugupulli kehamassiga ja vanusega. M. Forsberg (1996) märkis, et munandi ümbermõõdu suurenedes tõuseb ka testosterooni tase vereplasmas. Munandi ümbermõõdu suurenemine sugupulli kasvades ja vereplasma testosteroonisaldus mõjutab omakorda nii ejakulaadi mahtu, spermide kontsentratsiooni spermas kui ka spermide liikuvust (Gabor *et al.*, 1998; Kastelic *et al.*, 2001). Ka T. Hallap jt (2000) on täheldanud sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas liikuvate spermide osakaalu suurenemist pulli vanuse suurenedes 1 aastast kuni 4 aastani. Liikuvate ja otseliikuvate spermide osakaalu vähenemine 5–6-aastaste sugupullide grupis võrrelduna 3–4-aastaste pullidega võib olla tingitud spermatogeneesi reguleerivate hormoonide – folliikuleid stimuleeriva hormooni, luteiniseeriva hormooni ja testosterooni (Parvinen, 1993; Hafez, Hafez, 2000) taseme langusest või kõikumisest (Forsberg, 1996) sugupulli vananedes.

Kõige enam liikuvaid sperme esines sügavkülmutatud/sulatatud spermas sügis-talvisel perioodil ja kõige vähem kevad-suvisel perioodil ($P<0,05$). Samas selgus, et kõige rohkem otseliikuvaid sperme esines talvel

kogutud sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas – 59,60% ($P < 0,05$), kuid otseliikuvate spermide osakaal vähenes sügisel. Spermide kiirus liikumisteedekonnal, trajektoiril ja sirglõigul ei sõltunud aastaajast, samas aga spermide otseliikuvus, ristumissagedus liikumistrajektooriga ja kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektoorist olid sesoonsusest mõjutatud. Muutused spermide liikumises olenevalt aastaajast võivad olla tingitud asjaolust, et kevad-suvine temperatuuri tõus võib põhjustada mitmete hormoonide taseme kõikumist. A. Shubbur jt (1989) leidsid oma uuringus, et testosterooni tase sugupulli vereplasmas oli kõige kõrgem detsembris. R. L. Axi jt (1985) andmeil põhjustab suvine kõrge temperatuur ebanormaalsete spermide esinemissageduse suurenemist ja spermide liikuvuse vähenemist. M. Mathevon jt (1998) märkisid oma uuringus, et noorpullide spermas oli liikuvate spermide osakaal suurem talvel, kuid vanade pullide (4–6-aastased) sperma kvaliteedile sesoonsus olulist mõju ei avaldanud.

Käesolevas uuringus selgus, et hüpoosmootses keskkonnas vastupidavaiks osutunud ja seega funktsionaalselt terviklike membraanidega spermide osakaal värskes pullispermas ning spermide liikuvus ja otseliikuvus sügavkülmutatud/sulatatud spermas on omavahel tugevas korrelatsioonis (vastavalt $r=0,73$ ja $r=0,75$). Ka S. G. Revell ja R. A. Mrode (1994) on täheldanud värsket sperma osmoresistentsuse ja sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikute vahelist seost. Nii leidsid nad oma uurimuses, et värsket sperma funktsionaalselt tervikliku membraaniga spermide osakaal oli tugevas seoses spermide kõrvalekaldeamplituudiga liikumistrajektoorist ($r=0,67$). Meie uurimusele tuginedes võib järeldada, et mida suurem on funktsionaalselt tervikliku membraaniga spermide osakaal värskes pullispermas, seda suurem on tõenäosus, et sügavkülmutatud/sulatatud spermas on rohkem liikuvaid ja otseliikuvaid sperme. Sellise seose olemasolu võiks olla üheks aluseks ejakulaadi individuaalsele töötlemisele seemendusjaamas pärast sperma kvaliteedi määramist. Nimelt, kui võtta sperma lahjendamise arvestuslikuks aluseks funktsionaalselt tervikliku membraaniga spermide osakaal värskes pullispermas, siis määratakse sellega suure osas ka liikuvate spermide osakaal seemendusdoosis pärast sügavkülmutamist/sulatamist protsessi, sest sügavkülmutamist/sulatamist käigus hukuvad valdavalt kahjustatud membraaniga spermid. See võimaldab liikuvate spermide osakaalu seemendusdoosis viia optimaalsele tasemele, tagamaks hea emasloomade tiinestumise.

Ka sügavkülmutatud/sulatatud spermide osmoresistentsuse ja liikuvuse vahel ilmnes positiivne korrelatsioon. Kõige tugevam oli see liikuvate spermide osakaalu ja HOT-2 testi näitaja vahel ($r=0,64$; $P < 0,05$). Korrelatsiooni sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikuvuse ja funktsionaalselt tervikliku membraaniga spermide osakaalu vahel erinevatel põllumajandusloomadel on märkinud mitmed uurijad (Januskauskas *et al.*, 1996; Mantovani *et al.*, 2002). Käesolevas uurimuses leiti põhjal tuleb aga tõdeda, et korrelatsioon sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikuvuse ja värsket sperma osmoresistentsuse vahel on tugevam ($r=0,75$), mistõttu peaks just sellesse seosesse kätkevad kvaliteedikriteeriume arvestama pullisperma hindamisel.

Sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas määratud liikumiskarakteristikute (liikuvate ja otseliikuvate spermide osakaal, SKT ja SKL, SKA) ja emasloomade tiinestumise vahel esines keskmine positiivne korrelatsioon. Sealjuures kõige tugevam oli korrelatsioon liikuvate ja otseliikuvate spermide osas, seda nii ejakulaatide (vastavalt $r=0,68$ ja $r=0,66$) kui ka pullide lõikes (vastavalt $r=0,69$ ja $r=0,62$). Sarnase tulemuse said B. R. Zhang jt (1998), leides, et otseliikuvate spermide osakaal sügavkülmutatud/sulatatud spermas ja emasloomade tiinestumise korreleeruvad keskmiselt ($r=0,59$). Ka J. R. Correa jt (1997) ning Januskauskase jt (2003) poolt läbiviidud uurimustest selgus, et liikuvate spermide osakaal sügavkülmutatud/sulatatud spermas ja emasloomade tiinestumine on omavahel seotud (vastavalt $r=0,53$ ja $r=0,61$).

Mitmed uurijad on leidnud ka seose sügavkülmutatud/sulatatud spermide spetsiifiliste liikumiskarakteristikute ja emasloomade tiinestumise vahel. S. G. Revell ja R. A. Mrode (1994) leidsid keskmise positiivse korrelatsiooni ($r=0,43$) SKA ja emasloomade tiinestumise vahel. T. Hallap jt. (2004) märkisid oma uurimistöös positiivset korrelatsiooni SKT ja emasloomade tiinestumise vahel ($r=0,47$).

Kokkuvõte

Sugupulli vanus mõjutab oluliselt otseliikuvate spermide osakaalu ja spetsiifiliste liikumiskarakteristikute SKT, SKS, SKT ja SKA väärtusi sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas. Nimetatud parameetrite keskmised väärtused on kõrgeimad 3...4-aastastel pullidel.

Liikuvate ja otseliikuvate spermide osakaal ning spetsiifiliste liikumiskarakteristikute näitajad sõltuvad sperma kogumise aastaajast. Spermide üldine liikuvus ejakulaatides on kõige parem sügisel ja talvel.

Funktsionaalselt tervikliku membraaniga spermide osakaalu ja spermide liikuvuse vahel värskes spermas on tugev ning sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas keskmine positiivne korrelatsioon.

Sügavkülmutatud/sulatatud spermas leitud liikuvate ja otseliikuvate spermide osakaalu, SKT, SKL ja SKA ning emasloomade tiinestumise vahel on keskmine kuni tugev korrelatsioon.

Seega võime järeldada, et sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikute määramine kompuuteralüüsi (CMA) abil annab objektiivse ülevaate pullisperma kvaliteedist ja võimaldab prognoosida nii pulli kui ka konkreetse ejakulaadi viljastamisvõimet.

Kirjandus

- Al-Qarawi, A. A., Abdel-Rahman, H. A., El-Mougy, S. A., El-Belely, M. S. 2002. Use of a new computerised system for evaluation of spermatozoal motility and velocity characteristics in relation to fertility levels in dromedary bulls. – *Anim Reprod. Sci.*, 74(1–2), p. 1–9.
- Amann, R. P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? – *J. Androl.*, 10, p. 89–98.
- Amann, R. P., Seidel, G. E. Jr., Mortimer, R. G. 2000. Fertilizing potential *in vitro* of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. – *Theriogenology*, 54(9), p. 499–515.
- Ax, R. L., Dickson, K., Lenz, R. W. 1985. Induction of acrosome reaction in response to chondroitin sulfates *in vitro* corresponds to non-return rates of dairy bulls. – *Journal of Dairy Sci.*, 68, p. 387.
- Brito, L. F., Silva, A. E., Rodrigues, L. H., Vieira, F. V., Deragon, L. A., Kastelic, J. P. 2002. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. – *Theriogenology* 58(6), p. 1175–1186.
- Chacon, J., Perez, E., Rodrigues-Martinez, H. 2002. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermogramme parameters of extensively reared Brahman (*Bos indicus*) bulls in the tropics. – *Theriogenology*, 58(1), p. 41–50.
- 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.
- 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. 1996. Hormonal Control of Male Reproductive Function. – Nordic Research Course in Diagnostic and Experimental Animal Andrology, Uppsala, May, 1996.
- Gabor, G., Sasser, R. G., Kastelic, J. P., Coulter, G. H., Falkay, G., Mezes, M., Bozo, S., Volgyi-Csik, J., Szasz, F. Jr. 1998. Morphologic, endocrine and thermographic measurements of testicles in comparison with semen characteristics in mature Holstein-Freisian breeding bulls. – *Anim Reprod. Sci.*, 51(3), p. 215–24.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins, p. 105.
- Hallap, T., Håård, M., Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B. 2000. Semen quality of Swedish Red and White bulls at one and four years of age. Abstract. – ESDAR, Prague, Czech Republic, November 2000.
- Hallap, T., Håård, M. Ch., Jaakma, Ü., Larsson, B., Rodriguez-Martinez, H. 2004. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? – *Theriogenology*, in press.
- 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., Håård, M. G., Håård, M. Ch., Söderquist, L., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H. 1996. Estimation of Sperm Viability in Frozen-Thawed Semen from Swedish A.I. Bulls. – *J. Vet. Med. A.*, 43, p. 281–287.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodrigues-Martinez, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. – *Theriogenology*, 60(4), p. 743–58.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Söderquist, L., Rodrigues-Martinez, H. 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. – *Theriogenology*, 53(4), p. 859–75.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., Zaneveld, L. J. D. 1984. 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.
- Kastelic, J. P., Cook, R. B., Pierson, R. A., Coulter, G. H. 2001. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. – *Can. J. Vet. Res.*, 65(2), p. 111–115.
- Kjaestad, H., Robstad, E., Berg, K. A. 1993. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. – *Acta Vet. Scand.*, 34(3), p. 299–303.
- Lunstra, D. D., Echternkamp, S. E. 1982. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. – *Journal of Anim. Sci.*, 55(3), p. 638–648.

- Mantovani, R., Rora, A., Falomo, M. E., Bailoni, L., Vincenti, L. 2002. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. – *Reprod. Nutr. Dev.*, 42(3), p. 217–226.
- Marco-Jimenes, F., Mazon, J., Vicente, J. S. 2002. Evaluation of frozen sperm from fighting bulls by in-vitro fertilization of in-vitro matured oocytes. – 18e Réunion A. E. T. E, Rolduc, 06–07 Septembre 2002.
- Mathevon, M., Buhr, M. M., Dekkers, J. C., 1998. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. – *J. Dairy Sci.*, 81(12), p. 3321–3330.
- Padrik, P., Jaakma, Ü., Mürsepp, I. 2000. Eesti holsteini tõugu seemenduspullide värske sperma kvaliteet. – *Agraarteadus*, XI, 1, lk 71–80.
- Padrik, P. 1999. 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 Estonian Agriculture University, Tartu, June 7, 1999*, p. 75–76.
- Parvinen, M. 1993. Cyclic function of the Sertoli cells. – *The Sertoli Cell*. Eds. Russel L.D., Griswold, M.D., Clearwater, F.L., Cache River Press, p. 331–347.
- Picard-Hagen, N., Sourbe, O., Lyazrhi, F., Coupet, H., Hennequin, M., Jac, H., Berthelot, X. 2002. Effect of precocious collection on semen output and quality in young Holstein bulls. – *Theriogenology*, 57(5), p. 1511–1522.
- Revell, S. G., Mrode, R. A. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. – *Animal Reproduction Science*, 36, p. 77–86.
- 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. – *Journal of Dairy Sci.*, 66, p. 2635–2644.
- Shubbur, A., Goffaux, M., Thibier, M. 1989. Seasonal evolution of blood levels of thyroxine and triiodothyronine in the post-pubertal bull in France and Iraq. Concomitant variations of LH and testosterone. – *Reprod. Nutr. Dev.*, 29(3), p. 309–315.
- 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.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Sterckx, V., Maes, D., de Kruif, A. 2002. Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. – *Reprod. Domest. Anim.*, 37(3), p. 127–132.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. – *Theriogenology*, 57, p. 149–179.

Sperm motility characteristics in Estonian Holstein dairy bulls and their relations to fertility

P. Padrik, Ü. Jaakma

Summary

The aim of the current study was to determine the effects of bulls' age and season of semen collection on frozen/thawed sperm motility characteristics in Estonian Holstein bulls and estimate the relations between sperm motility characteristics and bulls' *in vivo* fertility expressed as 60-days non-return rate (NRR) of the dairy cows and heifers.

Six hundred twenty five ejaculates (collected from June 2002 to June 2003) from 96 bulls were studied to determine the motility characteristics of frozen/thawed spermatozoa. During that period 3...6 ejaculates from proven bulls and 2...4 ejaculates from young bulls were collected per month. Sixty one ejaculates from 17 bulls were studied to determine the relation between the sperm motility characteristics and NRR. Four thousand seven hundred and fifty cows and heifers were inseminated with semen doses from tested batches (average 279 inseminations per bull and 78 inseminations per ejaculate). One hundred eighty six ejaculates from 57 bulls were studied to determine the relations between frozen/thawed sperm motility characteristics and sperm membrane integrity in fresh semen (judged according to the results of HOT). Sixty one ejaculates from 17 bulls were studied to determine the relations between sperm motility characteristics and osmoresistance in frozen/thawed semen.

Sperm motility in fresh and frozen/thawed semen was determined with a computer assisted sperm 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 seconds. The preparations were studied in Makler chamber, evaluating totally ~400 spermatozoa from 4–5 different fields (×400) and estimating

percentage of motile and progressively motile spermatozoa, velocity average path (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocity curve line (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocity straight line (VSL, $\mu\text{m/s}$), linearity (LIN; VSL/VCL), beat cross frequency (BCF) and, amplitude of lateral head displacement (ALH, μm).

Traditional hypoosmotic test (Jeyendran *et al.*, 1984), labelled as HOS-1, was used to determine the frequency of spermatozoa with intact membranes in fresh and frozen/thawed semen.

HOS-2 test (Padrik, 1999) was used to determine the proportion of the frozen/thawed spermatozoa with intact membranes in different hypoosmotic concentrations of NaCl (0.2 and 0.4%; osmotic pressure 66 and 130 mOsm/kg, respectively). The semen straw was emptied after thawing in the water bath (+35 °C, 20 seconds) into the test tube with 1 ml NaCl solution. After incubating at the room temperature (+20 °C) for 2 minutes, 0.2 ml of eosin was added into each test tube. Wet preparation of each concentration was evaluated under the phase contrast microscope ($\times 1000$) and the ratio of spermatozoa with swollen tails was expressed in % as an average of two replicates. $\Delta\text{HOS-2}$ was estimated for each ejaculate by subtracting the ratio of the spermatozoa with intact membranes in 0.2% NaCl solution from the similar value in 0.4% NaCl solution.

In HOS-3 test (Padrik, Jaakma, 2000) three straws of semen (250 μl each) were thawed (+35 °C, 20 seconds), emptied into the test tube with 3 ml 2.9% sodium citrate solution (Tallinn Pharmacy Ltd.) and mixed. After six hours, 100 μl of sperm suspension was pipetted into each 1 ml of 0.2 and 0.4% NaCl solution. After 2 minutes incubation at room temperature (+20 °C), the wet preparation of sperms in NaCl solutions were made. One hundred spermatozoa were counted in each preparation and the ratio of the spermatozoa with swollen tails was given in % as an average for the three replicates. $\Delta\text{HOS-3}$ was estimated as described in HOS-2 test.

The highest proportion of progressively motile spermatozoa were found in semen of 3...4 years old bulls – 59.07% (Table 1, $P < 0.05$). Bulls at age of 1...2 and 5...7 years showed lower values, however only the difference in sperm progressive motility between 3...4 and 5...7 year age groups was significant ($P < 0.05$). VCL, VAP and VSL had also the highest values at 3...4 years of age ($P < 0.05$).

Season of semen collection had significant influence on frozen/thawed sperm motility characteristics (Table 2). The overall sperm motility was significantly higher in ejaculates collected in autumn and winter ($P < 0.05$). The proportion of progressively motile sperms was the highest in winter ($P < 0.05$). VCL, VAP and VSL values in frozen/thawed semen did not depend on season ($P > 0.05$) but LIN, BFC and ALH were influenced by the seasons ($P < 0.05$, Table 2).

Strong correlation was observed between the results of HOS-2 test of fresh semen and the overall and progressive motility of frozen/thawed sperms ($r = 0.73$; $P < 0.005$ and $r = 0.75$; $P < 0.005$; respectively). The correlations were lower when HOS-2 was performed in frozen/thawed semen ($r = 0.64$ and $r = 0.58$, $P < 0.01$; Table 3).

Overall motility, progressive motility, VCL, VAP and ALH were related to NRR. The strongest correlation was observed for the overall motility on both ejaculate ($r = 0.69$; $P < 0.005$) and bull ($r = 0.69$; $P < 0.005$) level.

We conclude that the bulls' age and season of semen collection have an effect on sperm motility and kinetic characteristics. The results of hypo-osmotic test performed in fresh semen are in strong relation to the sperm motility post-thaw and therefore could be used for the adjustment of the number of spermatozoa per insemination dose for the individual bull. Frozen/thawed sperm motility and progressive motility, VCL and VAP are related to NRR of cows and heifers and could be used for the prediction of bull's fertility.

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