

# CVM-GEENIDEFEKTI JA HOLSTEINI VERESUSE MÕJU SÜGAVKÜLMUTATUD/SULATATUD PULLISPERMA KVALITEEDILE JA EMASLOOMADE TIINESTUMISELE

Peeter Padrik<sup>a,b\*</sup>, Triin Hallap<sup>b</sup>, Tanel Bulitko<sup>a</sup>, Tanel Kaart<sup>b</sup>, Ülle Jaakma<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Eesti Tõuloomakasvatavate Ühistu, 79005 Keava, Eesti

<sup>b</sup> Sigimisbioloogia osakond, Veterinaarmeditsiini ja Loomakasvatuse Instituut, Eesti Maaülikool, Kreutzwaldi 62, 51014 Tartu, Eesti

\*tel.+3727313466; fax +3727313706; e-mail: peeter.padrik@mail.ee

**ABSTRACT. CVM-genedefect and Grade of Holstein Genes in Relation to Sperm Quality Characteristics of Estonian Holstein Dairy Bulls.** The aim of the current study was to investigate the influence of CVM- (Complex Vertebral Malformation.) genedefect and grade of Holstein genes on sperm motility, membrane integrity, membrane lipid architecture status and mitochondrial membrane potential in frozen-thawed (FT) semen, collected from Estonian Holstein (EHF) bulls. Thirty six ejaculates from 13 EHF bulls age (14–44 months) were examined for motility (using a computer assisted motility analyzer (CMA)), hypo-osmotic swelling (HOS), membrane lipid architecture status (Merocyanine 540 staining) and mitochondrial membrane potential (MitoTracker Deep Red 633 staining). The results showed a significant difference in the incidence of sperm linearity, (LIN), amplitude of lateral head displacement (ALH), plasma membrane integrity (HOS), membrane stability (LSM) and mitochondrial activity (MTDR-H ( $P < 0.05$ )) between the bull groups with the different grade of Holstein genes. The bull groups with and without CVM carriers differed in the incidence of general motile (GMot) and progressively motile (PMot), spermatozoa, curve line velocity (VCL), ( $P < 0.001$ ). The results showed positive correlation between results of GMot, PMot, VCL, ALH, LSM, MTDR-H and NRR (non return rate 60-day). Strong positive correlation was found between PNRR (predictive non-return rates) and NRR ( $P < 0.001$ ). We conclude that the bulls' grade of Holstein genes and CVM-genedefect have an effect on sperm quality parameters. Frozen/thawed sperm motility parameters, LSM and MTDR-H are related to NRR of cows and heifers and could be used for the prediction of bull's fertility.

**Key words:** Bull, Sperm quality, Grade of Holstein Genes, CVM.

## Sissejuhatus

Edukas aretustöö sõltub suurel määral õigest paaridevalikust. Paaridevalikul tuleb aretusväärtuse ja põlvnemise kõrval arvestada kindlasti ka sugupulli sperma kvaliteeti, millest kõrge aretusväärtusega pulli efektiivne kasutamine piimakarja populatsioonis olulisel määral sõltub.

Homogeense põlvnemisega tipp-pullide kasutamine holsteini tõu aretuses on üheks põhjuseks, miks

populatsiooni inbriidingukoefitsient suureneb. Kearney *et al.* (2004) leidsid, et Suurbritannia ja Iiri holsteini populatsiooni inbriidingukoefitsient hakkas tõusma 1990. aastatel ning selle negatiivset mõju on mitmetele emaslooma fertiilsusnäitajatele nagu poegimisvahemik, tiinestumine ja seemenduste arv edasistes uuringutes näidatud (Wall *et al.*, 2005; Mc Parland *et al.*, 2009). Van Eldik *et al.* (2006) leidis, et inbriidingukoefitsiendi suurenemine põlvnemises mõjutab täku spermide morfoloogilist kvaliteeti. Ka meie oleme oma varasemastes uuringutes täheldanud holsteini veresuse suurenemise ja spermide morfoloogilise kvaliteedi vahelist negatiivset seost (Padrik, Jaakma, 2001a).

Üheks geenidefektist põhjustatud probleemiks, mille esinemissagedus võib holsteini tõugu sugupullide aretuse homogeensemaks muutumisel suureneeda, on kompleksne lülisamba väärareng (Complex Vertebral Malformation, CVM), mida kirjeldasid Taani teadlased esmakordselt 2000. a. (Nautra, 2001). Kanae *et al.* (2005) leidsid oma uuringus, et CVM on autosoomselt retsessiivne tunnus, mis on põhjustatud mutatsioonist veiste serotoniini transporteri geenis (SLC35A3). Tavaliselt sünnivad CVM-geenidefektiga vasikad surnult, neil esinevad märgatavalt lühenenud lülisamba kaela- ja/või rinnaosa, väärarenenud või lühenenud tagajalad ning südamerikked (Kanae *et al.*, 2005; Thomsen *et al.*, 2006). Ameerika ja Euroopa holsteini populatsioonides on välja selgitatud mitmeid kõrge aretusväärtusega pulle, kes kannavad CVM-geenidefekt: USAs Carli-M Ivanhoe Bell; Taanis Taurus Bruma, Ftrisvard, KOL Nixon; Hollandis Lord Lily (*Milchrind*, 2000; Agerholm *et al.*, 2001). Meie eelnevatest uuringutest on selgunud, et CVM-geenidefekt kandvate eellaste olemasolu sugupulli põlvnemises mõjutab pullisperma kvantitatiivseid ja spermide kvalitatiivseid omadusi (Padrik, 2001; Padrik, Jaakma, 2001b; Padrik, Bulitko, 2004).

Mida rohkem erinevaid funktsionaalsete parameetrite mõõtmisi sügavkülmutatud/sulatatud spermide kohta teha, seda täpsemalt saab nende põhjal prognoosida spermide viljastamisvõimet (Rodriguez-Martinez, 2006; Rodriguez-Martinez, Barth, 2007). Paljud autorid on oma uuringutes täheldanud voolutsütomeetriliste meetodite efektiivsust ja täpsust spermide omaduste hindamisel, tuues esile võimalust mõõta mitut erinevat tunnust korraga tuhandetes spermides (Kasimanickam *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2007). Hallap *et al.*, (2005) täheldas oma uurimistöös, et spermide mitokondriaalse aktiivsuse määramine voolutsütomeetriliselt kasutades *MitoTracker Deep Red 633* värvingut korreleerus hästi

spermide liikuvusparameetritega. Sügavkülmutatud/sulatatud spermide membraanide stabiilsuse hindamisel on osutunud sobivaks *Merocyanine 540* (M540) värving (Hallap *et al.*, 2006), mis annab informatsiooni fosfolipiidide ümberpaigutumisest plasmamembraani siseselt (Harrison *et al.*, 1996).

Samas on spermide membraanide seisundi hindamiseks ka teisi võimalusi, näiteks hüpoosmootne test (Jeyendran *et al.*, 1984) ja selle modifikatsioonid (Padrik, 1999), mis on kergesti rakendatavad ka seemendusjaama praktikas. Hüpoosmootse testi ja selle modifikatsioonide abil saab määrata spermimembraani terviklikkust ja hüpoosmootset resistentsust (Avery *et al.*, 1990; Petrunkina *et al.*, 2001).

Spermide liikuvuse hindamisel on nii uurimistöös kui ka suurtes seemendusjaamades kasutusel kompuuteralalüüs (*computer assisted sperm analysis, CASA*), mille tulemused korreleeruvad hästi emasloomade tiinestumisega (Al-Qarawi *et al.*, 2002; Januskauskas *et al.*, 2003; Schäfer-Somi, Aurich, 2007). Kasutatakse ka energiarikka ühendi adenosinotriifosfaadi (*ATP*) sisalduse määramist spermas bioluminestsentsmeetodil (Söderquist *et al.*, 1991). Nimetatud autorid leidsid positiivse korrelatsiooni spermide liikuvuse ja *ATP*-sisalduse vahel.

Käesoleva uurimistöo eesmärgiks oli *CASA*, hüpoosmootse testi ja voolutsütomeetrite uuringute abil selgitada, milline on holsteini veresuse suurenemisest sugupulli põlvnemises tingitud mõju sügavkülmutatud/sulatatud spermide kvaliteedinäitajatele, missugused on *CVM*-geenidefekt kandvate ja mittekandvate sugupullide sügavkülmutatud/sulatatud spermide kvaliteedinäitajad ning kas uuritud spermide kvaliteedinäitajate põhjal on võimalik prognoosida emasloomade tiinestumist.

## Materjal ja meetodika

### Pullid, sperma kogumine ja töötlemine

Selgitamaks holsteini veresuse mõju sugupulli sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikele, spermimembraani stabiilsusele ja osmoresistentsele ning spermide mitokondriaalsele potentsiaalile uuriti 13 sugupulli 36 ejakulaati. Pullid jagati kahte gruppi: 87.5–93.8% holsteini veresusega pullid (Lamberg EHF 5843; Madjar EHF 6061; Alsum EHF 6062; Belmar EHF 6077; 4 pulli, 9 ejakulaati; keskmine emasloomade tiinestumine 55.4%; varieeruvus 42.9–69.2%) ja 100% veresusega pullid (Jaap EHF 5840; Jaco EHF 5841; Lambro EHF5842; Cedrik EHF 5845; Cels EHF 5846; Bellamo EHF 6060; Hilt EHF 5952; Fremos EHF 6063; Sivert EHF 6064; 9 pulli, 27 ejakulaati; keskmine emasloomade tiinestumine 54.3%; varieeruvus 22.8–72.7%).

Selgitamaks *CVM*-geenidefekt mõju sugupulli sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikele, spermimembraani stabiilsusele ja osmoresistentsele ning spermide mitokondriaalsele potentsiaalile uuriti 3 *CVM*-geenidefekt kandva pulli (Lamberg EHF 5843; Hilt EHF 5952; Lambro EHF5842) 9 ejakulaati (keskmine emasloomade tiinestumine 50.0%;

varieeruvus 22.8–67.0%) ja 3 *CVM*-geenidefekt mitte kandva pulli (Jaap EHF 5840; Jaco EHF 5841; Cels EHF 5846) 10 ejakulaati (keskmine emasloomade tiinestumine 60.7%; varieeruvus 52.2–71.1%). *CVM*-geenidefekt olemasolu oli eelnevalt kindlaks tehtud Göttingeni ülikooli laboris (*Tierärztliches Institut der Georg-August-Universität, Göttingen*). Katses olnud pullid olid 87.5–100.0% holsteini veresusega.

Sugupullidelt sperma varumiseks kasutati kunstvagiinat (*Minitüb GmbH&CO, Germany*). Sperma lahjendamiseks kasutati Triladyli (*Minitüb GmbH&CO, Germany*) ja munarebu (kanamunad pärit Kehтна Моис ОÜ, Eesti) lahjendit. Värske sperma lahjendati pärast viieminutilist 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 ~30–40×10<sup>6</sup> sperm. 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 ning säilitati vedelas lämmastikus -196°C juures.

Spermide liikumiskarakteristike, spermimembraani stabiilsuse ja osmoresistentse, spermide mitokondriaalse potentsiaali ja tiinestumise vaheliste seoste kindlakstegemiseks uuriti 13 sugupulli 36 ejakulaati. Nendest ejakulaatidest valmistatud seemendusdoosidega tehti 2828 katseseemendust (keskmiselt 218 seemendust pulli kohta ja 79 seemendust ejakulaadi kohta). Tiineks loeti emasloomad, kes ei innelunud uuesti 60 päeva jookul pärast seemendamist.

### Spermimembraani terviklikkuse määramine

Funktsionaalselt tervikliku membraaniga spermide osakaalu määramiseks kasutati traditsioonilist hüpoosmootset testi (HOT) (Jeyendran *et al.*, 1984). Kaks spermakõrrekest sulatati +35°C juures vesivannil 20 sekundi jookul ja tühjendati katseklaasi 1 ml HOT lahusesse (0.735 g naatriumtsitraati (*Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Germany*), 1.351 g fruktoosi (*Merck KGaA, Germany*), 100 ml destilleeritud vett; lahuste osmootne rõhk 150 mOsm kg<sup>-1</sup>). Pärast hoolikat segamist vorteksi loksutis (*VORTEX; Europe*) asetati katseklaas termostaati (*Memmert GmbH, Germany*) ning inkubeeriti 60 minutit +37°C juures. Seejärel lisati katseklaasi 0.3 ml eosini (0.99%, *Pioneer Research Chemicals, Ltd. England*), valmistati märgpreparaat ja loendati pundunud sabaga spermid 1000x suurendusel faaskontrastmikroskoobis (*Olympus BX40, Japan*). Igast preparaadist loendati 100 spermid ning pundunud spermide osakaal avaldati protsentides kahe preparaadi keskmisena.

### Spermide liikumiskarakteristikute määramine

#### CASA abil

Spermide liikumiskarakteristikud sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas määrati kompuuteranalüüsil (*Computer Assisted Cell Motion Analyser, Sperm Vision, Minitüb GmbH&CO, Germany*). Spermakõrreke sulatati +35°C juures vesivannis (*Memmert GmbH, Germany*) 20 sekundi jooksul ja uuriti Makleri kambris (*Makler Counting Chamber, Sefi-Medical Instruments, Israel*) 400x suurendusel iga proovi 4–5 erinevalt väljalt kokku ~400 sperm. Määrati järgmised näitajad: liikuvate spermide (LS) % / *Motility (GMot %)*; otseliikuvate spermide % (OLS; %) / *Progressive Motility (PMot %)*; spermide kiirus liikumistekonnal (SKL,  $\mu\text{m/s}$ ) / *Velocity Curve Line (VCL, \mu\text{m/s})*; spermide otseliikuvus (SOL, SKS/SKL) / *Linearity LIN (VSL/VCL)*; spermide kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektorist (SKA,  $\mu\text{m}$ ) / *Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH, \mu\text{m})*.

### Spermimembraani stabiilsuse määramine

Spermimembraani stabiilsuse määramiseks valmistati 1mM *Merocyanine 540 (M-540; Molecular Probes, M24571, Leiden, Holland)* ja 25  $\mu\text{M}$  *Yo-PRO 1 (Molecular Probes, Y3603, Leiden, The Netherlands)* põhilahused dimetüülsulfoksiidis (*AppiliChem; Germany; DMSO*). Pestud spermidele lisati 25 nM *Yo-PRO 1* ja inkubeeriti 38°C juures pimedas 9 min (*Harrison et al., 1996*). Seejärel lisati 10  $\mu\text{L}$  40  $\mu\text{M}$  *M-540* lahust *SP-TALP*-is, et saada lõplik *M-540* kontsentratsioon 2.7  $\mu\text{M}$  ja segati 10 s enne voolutsütomeetris (*FacsCalibur, Becton Dickinson, San Jose, USA*) analüüsimist. Andmete kogumist alustati 60 sekundit pärast *M-540* lisamist. Mõõtmised tehti voolutsütomeetriga, mis oli varustatud standardsete optiliste laseritega. *Merocyanine-540* ja *Yo-PRO 1* ergastati argoonioon 488 laseriga 15 mW juures. Otse- ja kõrvalhajuvuse väärtused toodi lineaarskaalale ja fluorestseeruvad väärtused logaritmskaalale. Maksimaalse tundlikkuse jaoks sätestati neeldunud kiirguse ala, et saavutada L-kujuline otsevalgus (hajuv/külgsuunaline valgus hajutab spermide jaotumise). *Yo-PRO 1* fluorestsents määrati detektoris FL 1 (530/28nm BP), samal ajal kui *M-540* fluorestsents määrati detektoris FL 2 (585/2 nm BP). Igast spermiproovist tehti 10000 mõõtmist, voolukiirusega ca 200 rakku/s. Kasutati *CellQuest Pro* tarkvara (*Becton Dickinson, San Jose, USA*). Punkt-diagrammid autonoomseteks analüüsideks tehti *WinMDI 2.8. abil (free software by J. Trotter, available at http://facs.scripps.edu/software.html)*. Detektorite FL 1/FL 2 (*Yo-PRO 1/M-540*) kohta koostati punkt-diagramme ala, et diferentseerida elusad stabiilse plasmamembraaniga ESM (*Yo-PRO 1* negatiivne ja *M-540* negatiivne); elusad ebastabiilse plasmamembraaniga EVM (*Yo-PRO 1* negatiivne ja *M-540* positiivne) ja surnud spermid (*Yo-PRO 1* positiivne).

### Spermide mitokondriaalse aktiivsuse määramine

Spermide mitokondriaalse aktiivsuse määramiseks kasutati Hallap *et al.*, (2005) poolt kirjeldatud metoodikat. Mõõdistamised tehti *FacsCalibur* voolutsütomeetris

(*Becton Dickinson, San Jose, USA*). *SYBR-14 (Sperm Viability Kit L-7011, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA)* värvaine ergastati 15 mW argoonioon 488 nm laseriga, samal ajal kui *MitoTracker Deep Red* ergastati 17 mW *HeNe* 633 nm laseriga. *SYBR-14* fluorestsents (tervikliku plasmamembraaniga rakud) määrati kindlaks detektoris FL 1 (530/28 nm) ja *MitoTracker Deep Red* fluorestsents (kõrge mitokondriaalne aktiivsus) määrati kindlaks detektoris FL 3 (670 LP). Otse- ja kõrvalhajuvuse väärtused toodi lineaarskaalale ja fluorestseeruvad väärtused logaritmskaalale. Tasakaalustamine tehti vastavalt Roedererile (2000). Kasutati *CellQuest Pro* tarkvara (*Becton Dickinson, San Jose, USA*). Voolutsütomeetrit kasutati madalal voolukiirusel (6–24  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Tehti ~10000 *SYBR-14* positiivset mõõtmist ja andmed salvestati järgnevatel analüüsides. Punkt-diagrammil FL1/FL2 eristati spermid muudest partiklitest *SYBR-14* fluorestsentsi (DNA sisaldus) alusel. Punkt-diagrammil *SYBR-14/MitoTracker Deep Red (FL 1/FL 3)* määrati kindlaks madala (MMA) ja kõrge mitokondriaalse aktiivsusega spermid (KMA).

### Statistiline analüüs

Uuringute tulemuste statistilises analüüsis kasutati erinevuste olulisuse hindamiseks *t*-testi ja dispersioonanalüüsi. Tunnustevahelised erinevused loeti tõenäoseks, kui  $P < 0.05$ . 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  $|r| \geq 0.7$ . Kordumvõõdistuste üldlineaarsete mudelite analüüsid esitati SAS süsteemis (versioon 9.1.3; *SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*), et võrrelda spermide kvaliteedinäitajaid pulligruppide ja ejakulaatide lõikes. Sperma kvaliteedi ja prognoositud tiinestumistulemuste vaheliste seoste leidmiseks kasutati astmelise regressiooni analüüsi.

### Tulemused

#### Holsteini veresuse mõju spermide funktsionaalsetele parameetritele

Uurimistulemustest selgus, et 87.5–93.8 % holsteini veresusega pullidel olid HOT, SOL, SKA, ESM ja KMA väärtused ejakulaatide lõikes ( $P < 0.05$ ) ja SOL ning SKA pullide lõikes ( $P < 0.05$ ; tabel 1) oluliselt kõrgemad kui 100% holsteini veresusega pullidel.

#### CVM-geenidefekti mõju spermide funktsionaalsetele parameetritele

Uuringutest selgus, et *CVM*-geenidefekti mittekandvate pullide grupis olid spermide kvaliteedinäitajad LS, OLS, SKL ( $P < 0.001$ ; tabel 2) ning SOL, SKA ja ESM ejakulaatide arvestuses ( $P < 0.05$ ) paremad kui *CVM*-geenidefekti kandvatel pullidel. Sama tendents esines ka pullide arvestuses

**Tabel 1.** Holsteini veresuse mõju sügavkülmutatud sperma kvaliteedile  
**Table 1.** Influence of grade of Holstein genes on quality of FT semen (means  $\pm$  S.D.).

Kvaliteediparameeter/Sperm parameters	Holsteini veresus / Grade of Holstein genes		Holsteini veresus / Grade of Holstein genes	
	Ejakulaatide lõikes / Batch level		Pullide lõikes / Bull level	
	87.5–93.8 %	100.0%	87.5–93.8 %	100.0%
	n=9	n=27	n=4	n=9
HOT(%)/ HOS(%)	39.8 $\pm$ 6.8 <sup>a</sup>	31.9 $\pm$ 10.0 <sup>b</sup>	39.2 $\pm$ 5.3	33.2 $\pm$ 6.4
LS(%)/ GMot (%)	76.7 $\pm$ 10.1	74.4 $\pm$ 9.1	75.8 $\pm$ 6.5	75.0 $\pm$ 8.7
OLS(%)/ PMot (%)	62.3 $\pm$ 10.3	57.5 $\pm$ 13.4	61.2 $\pm$ 6.8	60.2 $\pm$ 10.5
SKL ( $\mu$ m/sek)/ VCL ( $\mu$ m/sec)	89.5 $\pm$ 4.9	95.7 $\pm$ 11.5	88.7 $\pm$ 6.7	96.8 $\pm$ 9.4
SOL/ LIN	0.51 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.51 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.47 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
SKA ( $\mu$ m)/ ALH( $\mu$ m)	2.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.9 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	2.6 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	2.9 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
ESM%/ LSM%	63.1 $\pm$ 11.5 <sup>a</sup>	50.1 $\pm$ 16.0 <sup>b</sup>	63.8 $\pm$ 11.2	53.2 $\pm$ 14.3
KMA%/ MTDR-H%	82.0 $\pm$ 7.0 <sup>a</sup>	69.5 $\pm$ 25.1 <sup>b</sup>	83.7 $\pm$ 4.4	73.1 $\pm$ 17.4

HOT–funktsionaalselt tervikliku membraaniga spermid; LS–liikuvad spermid; OLS–otseliikuvad spermid; SKL–spermide kiirus liikumisteedekonnal; SOL–spermide otseliikuvus; SKA–spermide kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektorist; ESM–elusad stabiilse membraaniga spermid; KMA–kõrge mitokondriaalse aktiivsusega spermid;

HOS –intact plasma membranes; GMot–general motile; PMot–progressively motile; VCL–curve line velocity; LIN–linearity; ALH–amplitude of lateral head displacement; LSM–live stable membrane; MTDR-H–high mitochondrial activity;

<sup>a, b</sup> Erinevate ülaindeksitega väärtused samas reas on statistiliselt erinevad/Values with different superscripts in a row are significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Tabel 2.** CVM-geenidefekti seos sügavkülmutatud/sulatatud sperma kvaliteediga  
**Table 2.** The quality of FT semen of CVM-carriers and CVM-free bulls (means  $\pm$  S.D.).

Kvaliteediparameetrid /Sperm parameters	Ejakulaatide lõikes / Batch level		Pullide lõikes/ Bull level	
	CVM-vaba/ CVM	CVM-kandja /CVM	CVM-vaba/ CVM	CVM-kandja/CVM
	free	carrier	free	carrier
	n=10	n=9	n=3	n=3
HOT(%)/ HOS(%)	26.5 $\pm$ 9.2	31.9 $\pm$ 9.1	27.5 $\pm$ 6.7	33.1 $\pm$ 6.8
LS(%)/ GMot (%)	79.4 $\pm$ 5.3 <sup>c</sup>	64.6 $\pm$ 15.2 <sup>d</sup>	79.9 $\pm$ 1.5	69.1 $\pm$ 13.4
OLS(%)/ PMot (%)	63.3 $\pm$ 5.8 <sup>c</sup>	45.7 $\pm$ 16.9 <sup>d</sup>	64.0 $\pm$ 2.0	51.7 $\pm$ 14.2
SKL ( $\mu$ m/sek)/ VCL ( $\mu$ m/sec)	102.7 $\pm$ 7.1 <sup>c</sup>	85.2 $\pm$ 11.9 <sup>d</sup>	103.2 $\pm$ 4.4	87.7 $\pm$ 9.8
SOL/ LIN	0.46 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.45 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.04
SKA ( $\mu$ m)/ ALH( $\mu$ m)	2.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.8 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	3.1 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.3
ESM%/ LSM%	5.2 $\pm$ 7.6 <sup>a</sup>	38.1 $\pm$ 20.5 <sup>b</sup>	52.4 $\pm$ 7.3	46.6 $\pm$ 18.2
KMA%/ MTDR-H%	76.3 $\pm$ 14.9	54.7 $\pm$ 30.4	75.4 $\pm$ 8.8	67.4 $\pm$ 27.9

HOT–funktsionaalselt tervikliku membraaniga spermid; LS–liikuvad spermid; OLS–otseliikuvad spermid; SKL–spermide kiirus liikumisteedekonnal; SOL–spermide otseliikuvus; SKA–spermide kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektorist; ESM–elusad stabiilse membraaniga spermid; KMA–kõrge mitokondriaalse aktiivsusega spermid;

HOS –intact plasma membranes; GMot–general motile; PMot–progressively motile; VCL–curve line velocity; LIN–linearity; ALH–amplitude of lateral head displacement; LSM–live stable membrane; MTDR-H–high mitochondrial activity;

<sup>a, b, c, d</sup> Erinevate ülaindeksitega väärtused samas reas on statistiliselt erinevad/Values with different superscripts in a row are significantly different (<sup>a, b</sup>  $P < 0.05$ ; <sup>c, d</sup>  $P < 0.01$ ).

### Emasloomade tiinestumise ja sügavkülmutatud/sulatatud spermide funktsionaalsete parameetrite vaheline seos

Ilmnes tugev positiivne korrelatsioon emasloomade tiinestumise ja liikuvate spermide osakaalu vahel, nii ejakulaatide kui ka pullide lõikes (vastavalt:  $r=0.70$ ;  $P < 0.001$  ja  $r=0.73$ ;  $P < 0.01$ ). Otseliikuvate spermide osakaalu ja emasloomade tiinestumise vahel oli keskmine korrelatsioon nii pullide ( $r=0.64$ ;  $P < 0.05$ ) kui ka ejakulaatide lõikes ( $r=0.64$ ;  $P < 0.001$ ). Tiinestumise ja SKL vahelist seost iseloomustas korrelatsioonikordaja  $r=0.67$  ( $P < 0.001$  ejakulaatide) ja  $r=0.75$  ( $P < 0.01$  pullide arvestuses).

Sarnane oli ka seos tiinestumise ja spermide liikumistrajektorist kõrvalekaldeamplituudi vahel nii pullide kui ka ejakulaatide arvestuses (vastavalt  $r=0.77$  ja  $r=0.63$ ;  $P < 0.001$ ) ning ESM ja KMA ning tiinestumise

vahel ejakulaatide arvestuses (vastavalt:  $r=0.45$  ja  $r=0.49$ ;  $P < 0.01$ ).

### Sugupullide viljastamisvõime prognoosimine

Sugupullide viljastamisvõime prognoosimiseks sügavkülmutatud/sulatatud spermide kvaliteedi põhjal koostati lineaarne mudel, millesse kuulusid järgnevad spermide kvaliteediparameetrid: spermide otseliikuvus (OLS), spermide kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektorist (SKA), elusad stabiilse membraaniga spermid (ESM) ja kõrge mitokondriaalse aktiivsusega (KMA) spermid. Ejakulaatide arvestuses oli parim mudel emasloomade tiinestumise prognoosimiseks järgmine:

Prognoositud tiinestumine =  $-25.283 + 0.136 \times \text{OLS} + 0.275 \times \text{SKL} + 11.472 \times \text{SKA} + 0.118 \times \text{ESM} + 0.0915 \times \text{KMA}$

Determinatsioonikordaja:  $R^2=0.58$ ; kohaldatud determinatsioonikordaja:  $R^2=0.52$

Pullide viljastamisvõime prognoosimiseks koostatud mudel tulemi ja emasloomade tegeliku tiinestumistulemuse (mitteümberindlemine 60 päeva) vahel ilmnis tugev positiivne korrelatsioon ( $r=0.79$ ;  $P<0.001$ ).

### Arutelu

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli selgitada, kas sugupullide holsteini veresuse aste ja *CVM*-geenidefakti esinemine on seotud sügavkülmutatud/sulatatud sperma kvaliteediga ja ning kas meie poolt analüüsitud sperma kvaliteedinäitajate põhjal on võimalik prognoosida emasloomade tiinestumist.

Oleme oma varasemas uuringus (Padrik, 2001) leidnud, et koos holsteini veresuse suurenemisega sugupulli põlvnemises suureneb ka patoloogilise morfoloogiaga spermide osakaal värskes pullispermas ( $P<0.001$ ). Samuti tegime kindlaks (Padrik, Jaakma, 2001a), et 100% holsteini veresusega sugupullid on sesoonsusest tuleneva välistemperatuuri kõikumise suhtes vastuvõtlikumad, kuna patoloogilise morfoloogiaga spermide osakaal värskes pullispermas suurenes kevad-suvisel perioodil oluliselt rohkem kui pullidel, kelle põlvnemises holsteini veresus jäi alla 96.9%. Kuigi Cassell *et al.* (2003) leidsid oma uuringus, et holsteini veresus ei mõjuta oluliselt päevade arvu lehmade esmakordse seemenduseni pärast poegimist, on paljud uurijad täheldanud inbreedingu mõju mitmetele lehmade fertiilsusnäitajatele nagu poegimisvahemik, seemenduste arv, poegimiskused, surnultsünnid ja ümberindlemine (Wall *et al.*, 2005; González-Recio *et al.*, 2007; Mc Parland *et al.*, 2007; 2009). Käesolevast uuringust selgus, et 87.5–93.8% holsteini veresusega pullide grupis olid spermide funktsionaalsed kvaliteedinäitajad sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas kõrgemad kui 100% holsteini veresusega pullide grupis, seda nii ejakulaatide kui ka pullide lõikes. Statistiline erinevuste tõenäosus ilmnis HOT, SOL, SKA, ESM ja KMA osas ejakulaatide lõikes ( $P<0.05$ ) ning SKA ja SOL osas pullide lõikes ( $P<0.05$ ).

Meie uuringutest selgus, et *CVM*-geenidefakti mittemovavate pullide sperma kvaliteet oli parem kui *CVM*-geenidefakti kandvatel pullidel, mis ilmnis nii liikuvate, otseliikuvate spermide osakaalu kui ka SKL ( $P<0.01$ ) ning SOL, SKA ja ESM ( $P<0.05$ ) osas ejakulaatide arvestuses. Oma varasemates uuringutes olime analüüsinud pullide sperma kvaliteedi seost *CVM*-geenidefakti esinemisega sugupulli eellastel, defektse alleeli olemasolu kohta pullil endal meil andmed puudusid. Nii leidsime (Padrik, Bulitko, 2004), et spermide kontsentratsioon värskes ejakulaadis ja liikuvate ning otseliikuvate spermide osakaal sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas oli oluliselt suuremad nendel pullidel, kelle põlvnemises ei esinenud *CVM*-geenidefakti kandvaid eellasi. Patoloogilise morfoloogiaga sperme esines oluliselt rohkem nende pullide värskes spermas, kelle põlvnemises kuni neljanda põlvkonnani esines *CVM*-geenidefakti kandev eellane (Padrik, Jaakma 2001a, 2001b). Samas uuringus leidsime, et patoloogilise morfoloogiaga sperme esines kõige enam nende pullide värskes spermas, kelle põlvnemises esines *CVM*-geenidefakti kandev eellane nii ema- kui ka isaliinis.

Berglund *et al.* (2004) leidis oma uuringus, et *CVM*-geenidefakti mittekandvate pullide suhteline aretusväärtus lehmade ümberindlemise järgi pärast 168 päeva möödumist seemendusest, oli võrreldes *CVM*-geenidefakti kandvate pullidega kõrgem ( $P<0.039$ ). Ka Persson (2003) leidis oma uuringus, et *CVM*-geenidefakti kandvate pullide spermaga seemendades esineb lehmadel ümberindlemisi (56-päeva möödudes seemendusest) rohkem kui *CVM*-geenidefakti mittekandvatel pullidel. Ghanem *et al.* (2008) uurisid Jaapani holsteini populatsiooni ja *CVM*-geenidefakti vahelisi seoseid, leidis, et *CVM*-geenidefakti kandvatel lehmadel oli poegimisvahemik pikem ( $P<0.0008$ ) ning nende tiinestamiseks vajati 1.7 seemendust rohkem ( $P<0.0003$ ), võrreldes *CVM* geenidefakti mittekandvate lehmadega.

Meie uuringust selgus, et sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas määratud spermide kvaliteediparameetreid (liikuvate ja otseliikuvate spermide osakaal, SKL, SKA, ESL ja KMA) ja emasloomade tiinestumise vahel esines keskmine positiivne korrelatsioon. Tugev oli korrelatsioon liikuvate spermide osas, seda nii ejakulaatide kui ka pullide lõikes ning spermide liikumistrajektorist kõrvalekaldeamplituudi osas. Ka teised uurijad on täheldanud seoseid spermide liikuvusparameetrite ja emasloomade tiinestumise vahel (Correa *et al.* 1997; Zhang *et al.*, 1998; Verberckmoes *et al.*, 2002; Januskauskas *et al.*, 2003). Januskauskas *et al.* (2003) ja Verberckmoes *et al.* (2002) poolt läbiviidud uurimustest selgus, et sügavkülmutatud/sulatatud spermas olevate otseliikuvate spermide osakaalu ja emasloomade tiinestumise vahel oli keskmine positiivne korrelatsioon (vastavalt  $r=0.61$  ja  $r=0.66$ ;  $P<0.01$ ). Käesolevas uuringus ilmnenu oluline seos emasloomade tiinestumise ja EMS ning KMA vahel erineb Hallap *et al.* (2005, 2006) varasematest tulemustest, kus statistiliselt olulist korrelatsiooni EMS ja KMA spermide ja emasloomade tiinestumise vahel ei esinenud. Saadud tulemuse põhjuseks võis olla väike ning homogeenne pullide grupp varasemas katses. Liikuvuse, mitokondriaalse aktiivsuse ja membraani funktsionaalse tervikkuse määramist spermide viljastamisvõime hindamisel on märkinud teisedki autorid (Hua *et al.*, 2006; Kathiravan *et al.*, 2008).

Meie uurimusest selgus, et emasloomade tiinestumise prognoosimiseks sobis kõige paremini viie sügavkülmutatud/sulatatud sperma funktsionaalse parameetri põhjal koostatud mudel. Sellesse mudelisse kuulusid otseliikuvate spermide, elavate stabiilse membraaniga ja kõrge mitokondriaalse aktiivsusega spermide osakaal, spermide kiirus liikumisteeakonnal ning spermide kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektorist. Mudeli põhjal prognoositud tiinestumise ja tegeliku tiinestumise vahel ilmnis tugev positiivne korrelatsioon ( $r=0.79$ ;  $P<0.001$ ) ning kohaldatud determinatsioonikordaja oli  $R^2=0.52$ . Sarnaseid mudeleid, lähtudes sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikuvuse ja membraani tervikkuse parameetritest, on koostatud varem ka mitmete teiste uurijate poolt (Zhang *et al.*, 1999; Januskauskas *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2004). Zhang *et al.* (1999) leidis oma uuringutes, et spermide liikuvus pärast sügavkülmutamist/sulatamist sobib hästi sperma viljastamisvõime hindamise mudelisse, kusjuures korrelatsioon emasloo-

made tegeliku tiinestumise ja prognoosimismudeli vahel oli  $r=0.94$  ( $P<0.001$ ) ning kohaldatud determinatsioonikordaja ( $R^2=0.71$ ). Ka Januskauskas *et al.* (2000) märkis oma uuringus, et spermide liikuvus ja membraani funktsionaalne terviklikkus pärast sügavkülmutamist/sulatamist sobisid hästi emasloomade tiinestumise prognoosimismudelisse ning selle mudeli korrelatsioon emasloomade tiinestumisega oli  $r=0.74$  ( $P<0.002$ ; kohaldatud:  $R^2=0.55$ ). Phillips *et al.* (2004) leidis, uurides austraalia piimatõugu sugupullide sügavkülmutatud/sulatatud spermat, et morfoloogiliselt normaalsete ja tervikliku membraaniga spermide põhjal koostatud viljastamisvõime prognoosimismudel kirjeldas emasloomade tiinestumise variatsiooni 76.5% ulatuses. Zhang *et al.* (1999) poolt, koostatud emasloomade tiinestumise prognoosimismudeli ning emasloomade tegeliku tiinestumise vaheline tugev korrelatsioon ( $r=0.94$ ;  $P<0.001$ ), tuleneb tõenäoliselt sellest, et mudel koosnes kaheksast erinevast sperma funktsionaalsest kvaliteediparameetrist. Kuna Januskauskas *et al.* (2000) ja meie uuringus moodustatud mudelitesse kuulus vastavalt neli ja viis spermi funktsionaalset kvaliteediparameetrit jäi ka seos emasloomade tegeliku tiinestumisega nõrgemaks. ( $r=0.74-0.79$ ).

### Kokkuvõte

Holsteini veresuse suurenemine sugupulli põlvnemises nõrgendab oluliselt sügavkülmutatud/sulatatud spermide membraani terviklikkust ja stabiilsust, funktsionaalseid liikuvusparameetreid ning mitokondriaalset aktiivsust.

CVM-geenidefekti kandvate sugupullide sügavkülmutatud/sulatatud spermide funktsionaalsed liikuvusparameetrid, liikumiskiirus, spermimembraani stabiilsus ja mitokondriaalne aktiivsus on väiksemad kui CVM-geenidefekti mittekanvatel sugupullidel

Sugupullide sügavkülmutatud/sulatatud spermide viljastamisvõime prognoosimiseks sobisid kõige paremini järgmised funktsionaalsed parameetrid: spermide otseliikuvus, spermide kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektooriga, elavad stabiilse membraaniga spermid ja kõrge mitokondriaalse aktiivsusega spermid. Sugupullide viljastamisvõime prognoosimiseks koostatud mudeli tulemi ja emasloomade tiinestumistulemuste vahel ilmes tugev positiivne korrelatsioon.

### Tänuavaldused

Uurimistööd toetasid Eesti Teadusfond (grant 6089, grant 7814), ja SF 1080045s07. Täname Eesti Tõuloomakasvatavate Ühistut ja Niina Haasmaa tehnilise abi ja keelelise korrektuuri eest.

### Kasutatud kirjandus

Agerholm, J.S., Bendixen, C., Andersen, O., Arnbjerg, J., 2001. Complex vertebral malformation in Holstein calves. – *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13 (4), p. 283–289.

- 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. – *Animal Reproduction Science*, 74, p. 741–749.
- Avery, S., Bolton, V.N., Mason, B.A. 1990. An evaluation of the hypo-osmotic sperm swelling test as a predictor of fertilizing capacity in vitro. – *Journal of Andrology*, 13, p. 93–99.
- Berglund, B., Persson, A., Ståhlhammar, H. 2004. Effects of Complex Vertebral Malformation on Fertility in Swedish Holstein Cattle. – *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45 (3–4), p. 161–165.
- Cassell, B.G., Adamec, V., Pearson, R.E. 2003. Effect of incomplete pedigrees on estimates of inbreeding and inbreeding depression for days to first and summit milk yield in Holstein and Jerseys. – *Journal of Dairy Science*, 86 (9), p. 2967–2976.
- Correa, J.R., Heerche, G. Jr., Zavos, P.M. 1997. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. – *Theriogenology*, 4 (3), p. 715–721.
- Ghanem, M.E., Isobe, N., Kubota, H., Suzuki, T., Kasuga, A., Nishibori, M. 2008. Ovarian Cyclicity and Reproductive Performance of Holstein Cows Carrying the Mutation of Complex vertebral Malformation in Japan. – *Reproduction in Domestic Animals*, 43 (3), p. 346–350.
- González-Recio O., Lopez de Maturana E., Gutiérrez J.P., 2007. Inbreeding depression on female fertility and calving ease in Spanish dairy cattle. – *Journal of Dairy Science*, 90 (12), p. 5744–5752.
- Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, Ü., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez H., 2005. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracer Deep Red 633. – *Theriogenology*, 63 (8), p. 2311–2322.
- Hallap T., Nagy S., Jaakma Ü., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, H. 2006. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. – *Theriogenology*, 65 (6), p. 1122–1136.
- Harrison, R.A.P., Ashworth, P.J.C., Miller, N.G.A. 1996. Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. – *Molecular Reproduction and Development*, 45, p. 378–391.
- Hua, Y., Qian, X.M., Chen, B.G., Yang, J.H., Wu, X.Y., Ma, L., Chen C.L. 2006. Application of flow cytometry to the evaluation of semen quality. – *National Journal of Andrology*, 12(7), p. 608–611.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. – *Theriogenology*, 60 (4), p. 743–758.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Söderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to the fertility of Swedish dairy AI bulls. – *Theriogenology*, 53(4), p. 859–875.
- 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 Reproduction and Fertility*, 70 (1), p. 219–225.

- Kanae, Y., Endoh, D., Nagahata, H., Hayashi, M. 2005. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis. – *Journal of Veterinary Diagnostics Investments*, 17 (3), p. 258–262.
- Kasimanickam, R., Nebel, R.L., Peeler, I.D., Silvia, W.L., Wolf, K.T., McAllister, A.J., Cassell B.G. 2006. Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. – *Theriogenology*, 66 (5), p. 1307–1315.
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Edwin, M.J., Veerapandian, C. 2008. Computer automated motion analyser of crossbreed bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. – *Animal Reproduction Science*, 104 (1), p. 9–17.
- Kearney, J.F., Wal, J. E., Villanueva, B., Coffey, M.P. 2004. Inbreeding trends and application optimized selection in the UK Holstein population. – *Journal of Dairy Science*, 87 (10), p. 3503–3509.
- Milchrind, 4, 2000. Neuer Gendefekt CVM: Alle warten auf weitere Testergebnisse – *Milchrind*, 4, 2000.
- Mc Parland S., Kearney F., Rath, M., Berry, D.P. 2007. Inbreeding effects on milk production, calving performance, fertility, and conformation in Irish Holstein-Friesians. – *Journal of Dairy Science*, 90 (9), p. 4411–4419.
- Mc Parland, S., Kearney, F., Berry, D.P. 2009. Puring of inbreeding depression within the Irish Holstein-Friesian population. – *Genetics Selection Evolution*, 41(1), p. 16.
- Nautra 2, 2001. Holstein-friisiläisrodussa esiintyviä periytyviä synnynnäisiä vikoja, joita voidaan testata. – *Nautra 2*, 2001.
- 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 the Estonian Agricultural University*. 1999. Tartu, p. 75–76.
- Padrik, P. 2001. Seemenduse resultatiivsus kui oluline aretus-edu faktor. – *Tõuloomakasvatuse*, 2, lk. 27–30.
- Padrik, P., Jaakma, Ü. 2001a. Relationships Between the Grade of Holstein Genes and Sperm Morphology in Estonian Holstein Bulls. *Reproductive Failure in Farm Animals. Proceedings from a symposium at the Estonian Agricultural University, June 14 Tartu, 2001, CRU Report 14, Uppsala*, p. 47–53.
- Padrik, P., Jaakma, Ü. 2001b. Sperma morfoloogiline kvaliteet CVM-geeni kandvaid eellasi omavatel eesti holsteini tõugu pullidel. – *Veterinaarmeditsiin*, Tartu, lk. 22–30.
- Padrik, P., Bulitko, T., 2004. Semen quality of CVM carriers and CVM free Estonian Holstein young bulls. *EAAP- 55th Annual Meeting 2004, Bled*, p. 195.
- Peña, F.J., Saravia, F., Johannisson, A., Wallgren, M., Rodriguez-Martinez, H. 2007. Detection of early changes in sperm membrane integrity: pre-freezing can estimate post-thaw quality of boar spermatozoa. – *Animal Reproduction Science*, 97 (1–2), p. 74–83.
- Petrunkina, A.M., Petzoldt, R., Sthalberg, S., Pfeilsticke, J., Beyerbach, M., Bader, H., Töpfer-Petersen, E. 2001. Sperm-cell volumetric measurements as parameters in bull semen function evaluation: correlation with nonreturn rate. – *Andrologia*, 33, p. 360–367.
- Phillips, N.J., McGowan, M.R., Johnston, S.D., Mayer, D.G. 2004. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. – *Animal Reproduction Science*, 81, p. 47–61.
- Persson, A. 2003. Inverkan av den genetiska defekten Complex Vertebral Malformation på fruktsamheten hos SLB. *Dissertation*, Department of Animal Breeding and Genetics, SLU, Sweden.
- Roederer M., 2000. Compensation (an informal perspective). 2000; <http://www.drmm.com/compensation>, 24 May.
- Rodriguez-Martinez, H., Barth, A.D. 2007. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Society of Reproduction And Fertility Supplement*, 64, p. 39–45.
- Rodriguez-Martinez, H. 2006. Can We Increase The Estimated Value of Semen Assessment? – *Reproduction In Domestic Animals*, 41 (2), p. 2–10.
- Schäfer-Somi, S., Aurich, C. 2007. Use of new computer-assisted sperm analyser for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. – *Animal Reproduction Science*, 102 (1–2), p. 1–13.
- Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H., Jansson, L. 1991. Post-thaw motility, ATP content and cytochrome-C oxidase activity of A.I. bull spermatozoa in relation to their fertility. – *Zentralblatt Für Veterinärmedizin*, 38 (3), p. 165–174.
- Thomsen, B., Horn, P., Panitz, F., Bendixen, E., Petersen, A.H., Holm, L.E., Nielsen, V.H., Agerholm J.S., Arnbjerg, J., Bendixen, C. 2006. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. – *Genome Research*, 16 (1), p. 97–105.
- Van Eldik, P., Van der Waaij, E.H., Ducro B., Kooper, A.W., Stout, T.A., Colenbrander, B. 2006. Possible negative effects of inbreeding on semen quality in Shetland pony stallions. – *Theriogenology*, 65 (6), p. 1159–1170.
- Verberckmoes, S., Van Soom, A., De Pauw, I., Dewulf, J., de Kruif, A. 2002. Migration of bovine spermatozoa in a synthetic medium and its relation to in vivo bull fertility. – *Theriogenology*, 58 (5), p. 1027–1037.
- Wall, E., Brotherstone, S., Kearney, J.F., Woolliams, J.A., Coffey, M.P. 2005. Impact of nonadditive genetic effects in the estimation of breeding values for fertility and correlated traits. – *Journal of Dairy Science*, 88 (1), p. 376–385.
- 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. – *Journal of Andrology*, 21 (4), p. 1–10.
- Zhang, B.R., Larsson, B., Lundeheim, N., Håard, M.G., Rodriguez-Martinez, H. 1999. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. – *Journal of Andrology*, 22 (4), p. 253–260.

### CVMgene defect and Grade of Holstein Genes in Relation to Sperm Quality Characteristics of Estonian Holstein Dairy Bulls

P. Padrik, T. Hallap, T. Bulitko, T. Kaart and  
Ü. Jaakma

#### Summary

The aim of the current study was to investigate the influence of CVM gene defect (Complex Vertebral Malformation.) and grade of Holstein genes to sperm motility, membrane integrity, membrane lipid architecture status and mitochondrial membrane potential characteristics in frozen-thawed (FT) semen from Estonian Holstein (EHF) bulls.

Thirty six ejaculates from 13 EHF bulls were divided into 2 groups according to the presence (3 bulls, 9 ejaculates) or absence (10 bulls, 27 ejaculates) of CVM-gene and according to the grade of Holstein genes (group I 87,5–93,8% Holstein genes, group II 100% Holstein genes). Semen was collected using an artificial vagina. Two consecutive ejaculates were pooled (hereafter referred to as a “batch”), extended with a commercial extender (Triladyl<sup>®</sup>, Minitüb, Germany), packed in 0.25 ml plastic straws, each containing ~30–40x10<sup>6</sup> spermatozoa, and frozen in a biological freezer and stored in liquid nitrogen until tested. The semen from two straws of the same batch was thawed by immersion in water +35°C 20 seconds then pooled and immediately used for testing. A post-thaw motility ≥50% was set up as threshold. Straws from each batch were used also for the test inseminations. Totally 2828 cows and heifers were inseminated (average 79 inseminations per ejaculate and 218 inseminations per bull) by 4 AI technicians in 4 different herds according to the breeding program. Inseminations were performed within 1 year of freezing on heifers and cows of different parity. NRR-60 days were recorded for each batch but not corrected for season, area, and parity. NRR-60 days ranged from 22.8 to 80,0%.

**Hypo-osmotic swelling (HOS) test** (Jeyendran, 1984), labelled as HOS, was performed by incubating a contents of 2 frozen/thawed semen straws together with 1 ml of a 150mOsm kg<sup>-1</sup> hypoosmotic solution at 37°C for 60 min. After incubation, 0.3 ml of eosin was added into the test tube. Wet preparation was evaluated under the phase contrast microscope (x 1000) and the ratio of spermatozoa with swollen tails was expressed in % as an average of two replicates. One hundred spermatozoa were assessed in each replicate.

**Sperm motility** characteristics were determined with a computer assisted motility analyzer (Computer Assisted Cell Motion Analyzer (CMA), Sperm Vision, Minitüb GmbH&Co, Germany). Samples of 5µl were placed in Makler chamber where ~400 post-thaw spermatozoa were tracked and assessed (x400) at +37°C. The following parameters were determined: the percentage of general motile (GMot) and progressively motile (PMot) spermatozoa, curve line velocity (VCL, µm/sec), linearity LIN(VSL/VCL) and amplitude of lateral head displacement (ALH, µm).

**Sperm plasma membrane stability.** Washed spermatozoa were stained with 25 nM Yo-PRO 1 (Molecular Probes, Y3603) and after incubation at 38°C in the dark with 2.7 µM Merocyanine 540 (M-540, Molecular Probes, M24571, Leiden, The Netherlands) as previously described (Harrison et al.1996). Analysis was performed on a flow cytometer (FacsCalibur, Becton Dickinson, San Jose, USA). Data collection was started at 60 s after M-540 addition. The M-540 and Yo-PRO 1 dyes were excited by an Argon ion 488 nm laser run-

ning at 15 mW. Forward and side scatter values were recorded on a linear scale; while fluorescent values were recorded on a logarithmic scale. Fluorescence of Yo-PRO 1 was detected on detector FL 1 (530/28nm BP), while M-540 fluorescence was detected on detector FL 2 (585/2 nm BP). From each sample, a total of 10,000 events were measured with flow rate of approx. 200 cells/s. Acquisitions were made using CellQuest Pro software (Becton Dickinson, San Jose, USA). Dot plots for offline analyses were drawn by WinMDI, version 2.8. Events accumulated in the lower left corner correspond to sample debris and were excluded from the analysis by gating. On FL 1/FL 2 (Yo-PRO 1/M-540) dot plots regions were set to differentiate viable, stable plasma membrane LSM (Yo-PRO 1 negative and M-540 negative); viable, scrambled plasma membrane (Yo-PRO 1 negative and M-540 positive); and dead (Yo-PRO 1 positive) events.

**Sperm mitochondrial activity.** The staining protocol was identical to that described by Hallap et al. (2005). The measurements were made using a FacsCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, USA). The SYBR-14 dye was excited by a 15 mW Ar ion 488 nm laser while MitoTracker Deep Red was excited by a 17 mW HeNe 633 nm laser. The SYBR-14 fluorescence (cells with intact plasma membrane) was detected on detector FL 1 (530/28 nm) while MitoTracker Deep Red fluorescence was detected by a detector FL 3 (670 LP). Forward and side scatter (FSC and SSC) values were recorded on a linear scale while fluorescent values were recorded on a logarithmic scale. Compensations were set according to Roederer (2000). Acquisitions were made using the CellQuest Pro software (BD). Non-sperm events were gated out based on SYBR-14 fluorescence (DNA content). The FC was used at a low flow rate (6–24 µL/min). Acquisitions were stopped after recording 10 000 SYBR-14-positive events and the data stored in list mode for further analysis. On SYBR-14 (FL 1/FL 2) dot plots, regions were drawn around the SYBR-14-positive cluster, and these events were classified as spermatozoa. In SYBR-14/ MitoTracker Deep Red dot plots sperm cells with low MTDR-L) and high (MTDR-H) Deep Red fluorescence were specified.

**Results.** Generally, the increase in the grade of Holstein genes was accompanied by the decrease in the FT semen quality. The results presented in Table 1 showed that there was a significant difference in the incidence of HOS, LIN, MTDR-H and LSM (P<0.05) on batches level and LIN (P<0.05) on bull level between the bull groups with the different grade of Holstein genes. CVM had significant influence on frozen/thawed sperm characteristics as well (Table 2). The mean of GMot, PMot and VCL was higher in FT semen of CVM free bulls on batches level (P<0.01).

Positive correlation was observed between the GMot, PMot, VCL, ALH, (P<0.001), LSM, MTDR-H (P<0.01) and NRR. on batches level and Gmot, PMot, VCL, ALH (P<0.05–0,001) on bulls level. The best predicted non return rate (PNRR) for bulls on batches level was obtained with the model including five parameters: PMot, VCL, ALH MTDR-H and LSM. Strong positive correlation was found between PNRR and NRR (r=0.79; P<0.001) on batches level.

**Conclusion.** We conclude that increase in the grade of Holstein Genes and presence of CVM-gene defect have negative effects on FT sperm quality in holstein bulls. The results of FT sperm motility, progressive motility, VCL ALH, LSM and MTDR-H are related to NRR of cows and heifers and could be used for the prediction of bull's fertility.