

Hevosen keinosiemennys tuore- ja pakastespermalla

Minna-Liisa Heiskanen
Kotieläinten jalostustieteen laitos

Helsinki 1983

Julkaisija:

Kotieläinten jalostustieteen laitos, Helsingin Yliopisto, Viikki

HEVOSEN KEINOSIEMENNYS
TUORE- JA PAKASTESPERMALLA

Minna-Liisa Heiskanen
Kotieläinten jalostustieteen
pro gradu-työ 1983

Sisällysluettelo

	Sivu
JOHDANTO	1
K I R J A L L I S U U S O S A	
1. LISÄÄNTYMISELINTEN FYSIOLOGIA	2
1.1 Tamman lisääntymiskierto	2
1.1.1 Kiima ja kiimakierto	3
1.1.2 Munasarjamuutokset tamman lisääntymiskierron aikana .	4
1.2 Sperma ja sen kemiallinen koostumus	5
1.3 Siittiön morfologia	3
1.4 Siittiöiden biokemiaa ja fysiologiaa	4
2. HEDELMÖITYMINEN	8
2.1 Siittiön kulkeutuminen hedelmöitymispaikalle	8
2.2 Kapasitaatio	8
2.3 Akrosomireaktio	9
3. TIINEHTYMISPROSENTTI JA SIIHEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT	10
3.1 Sikiön varhaiskuolema	11
3.1.1 Tiineystarkastustusten vaikutus sikiön varhaiskuolemaan	12
4. SPERMAN LAATU JA TUOTANTO	13
4.1 Sperman laadun arvostelu	13
4.1.1 Spermassa tapahtuvia muutoksia	13
4.2 Keinoemättimet	14
4.3 Sperman keräämisajankohdan vaikutus sperman tuo- tantomuutoksiin ja pakastuksenkestokykyyn	14
4.4 Sperman keräämistiheys	15
5. SPERMAN PAKASTAMINEN	18
5.1 Plasman erottaminen	18
5.2 Solun syväjääditys	18
5.2.1 Vaaralliset lämpötilat	19
5.2.2 Jäähdytysnopeus ja glyserolilisäys	19
5.3 pH:n vaikutus siittiöihin	20

6. TAMMAN SIEMENNYS	21
6.1 Siemennysajankohta	21
6.2 Kiiman ja ovulaatioajakohdan synkronointi	22
6.3 Siemennysannoksen siittiömäärä ja tilavuus	22
7. TUORESIEMENEN KÄYTTÖ	24
7.1 Laimentamattoman tuoresiemenen käyttö	24
7.2 Laimennetun tuoresiemenen käyttö	24
7.2.1 Laimennetun tuoresiemenen elinkyvyn palautuminen jäähdytyksen jälkeen	25
7.2.2 Laimennetun tuoresiemenen hedelmöittämiskyky eri- laisten säilytysaikojen jälkeen	25
7.2.3 Eri laimennusnesteillä saatujen tiinehtymistulosten vertaaminen ilman laimennusta tehtyyn tuoresiemen- nykseen	27
8. PAKASTESIEMENEN KÄYTTÖ	29
8.1 Pakastesiemennystoiminnan kehitys	29
8.2 Eri maissa suoritetuista pakastesiemennyskokeista	29
8.2.1 Pohjois-Amerikka	29
8.2.2 Japani	29
8.2.3 Saksa	31
8.2.4 Neuvostoliitto	32
8.3 Sperman laadun ja pakastuksen vaikutus tiinehtymiseen sekä alkion kokoon	33
9. YHTEENVETO	34
O M A T T U T K I M U K S E T	
1. ASTUTUKSEN JA PAKASTESIEMENNYKSEN VERTAILU SIITTOLA- OLOSUHTEISSA	35
1.1 Aineisto ja menetelmät	35
1.1.1 Oriit	35
1.1.2 Sperman laadun arvostelu	36
1.1.3 Tammat	37
1.1.4 Siemennysajankohdan määrittäminen	38

1.2 Tulokset ja tulosten tarkastelu	39
1.2.1 Siemennys- ja astutuskerrat	39
1.2.2 Positiivisen tiinehtymisennusteen saaneet pakaste-ryhmän tammät	39
1.2.3 Pakastesiemennys verrattuna astutukseen	39
1.2.4 Pakastesiemennys verrattuna astutukseen luokissa la ja lb	41
1.2.5 Varsallisten ja varsattomien tammojen tiinehtymistulosten vertailu erikseen luokissa la ja lb	41
1.2.6 Sikiön varhaiskuolemien esiintyminen	42
1.2.7 Pakakastesiemennystulosten tarkastelu	43
1.2.8 Sperman laatuominaisuudet	44
1.2.9 Sperman laadun vaikutus tiinehdyttämiskykyyn	45
1.2.10 Tiinehtymistuloksen aleneminen v. 1974	47
2. MUUT SIEMENNYSKOKEET	49
2.1 Kenttäolosuhteissa suoritettut pakastesiemennykset	49
2.1.1 Tamma- ja oriaineisto	49
2.1.2 Varsomistulokset	49
2.2 Siittolassa ja kenttäolosuhteissa suoritettut tuoresiemennykset	50
2.2.1 Tamma- ja oriaineisto	50
2.2.2 Varsomistulokset	50
JOHTOPÄÄTÖKSET	52
KESKUSTELUA	53
TIIVISTELMÄ	54
KIIITOKSET	55
KIRJALLISUUSLUETTELO	56
LIITTEET	61

JOHDANTO

Hevosten riskialttius loukkaantumisille astutusten ja kuljetusten yhteydessä sekä kustannustason nousu on herättänyt kiinnostuksen keinosiemennykseen. Kiinnostusta on lisännyt myös arvokaiden jalostusoriiden sperman jakamis- ja varastointimahdollisuus samoin kuin kansainvälinen spermakauppa.

Astutuksessa oriin siittiöt ovat useita vuorokausia hedelmöittämiskykyisiä. Pakastuksen tai pitkäaikaisen tuoresäilytyksen yhteydessä on todettu siittiöiden tiinehdyttämiskyvyn alenevan eikä enää voidakaan puhua vuorokausien vaan muutamien tuntien eliniästä tammaan sukuelimissä. Mm. tämän vuoksi hedelmöittyminen keinosiemennyksellä on epävarmaa. Siemennyksen on osuttava lähelle ovulaatioajankohtaa, jonka määrittämistä vaikeuttavat tammaan pitkä kiima ja yksilölliset erot kiiman kestossa ja follikkelien kehityksessä. Lisääntymistoimintojen tarkka tunteminen on perusedellytys keinosiemennyksen onnistumiselle.

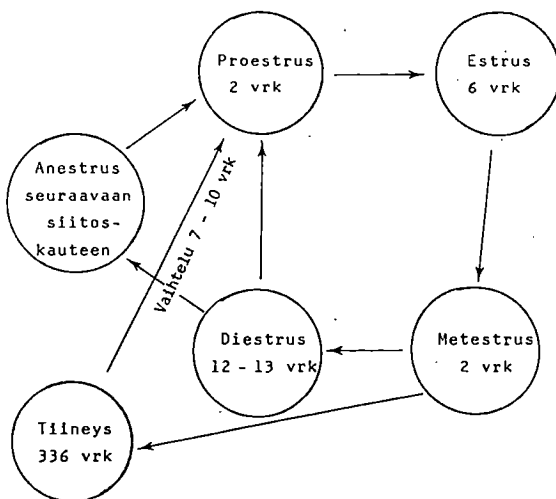
Tässä työssä on pyritty selvittämään hedelmöittymiseen vaikuttavia fysiologisia ja biokemiallisia tekijöitä sekä tuore- ja pakastesiemennyksen mahdollisuuksia ja niihin vaikuttavia tekijöitä.

K I R J A L L I S U U S O S A

1. LISÄÄNTYMISELINTEN FYSIOLOGIA

1.1 Tamman lisääntymiskierto

Hevosen lisääntymistoiminnat ovat voimakkaasti vuodenajasta riippuvia (VOSS ja PICKET 1976). Luonnollinen lisääntymiskausi on keväällä ja kesällä, jolloin valon määrä on suurin. Kiimaton kausi (anestrus) on vuoden pimeimpänä aikana ja kestää 2 - 6 kk (VOSS ja PICKET 1976). Tänä aikana lisääntymiskäyttäytyminen ja kierto ovat epäsäännöllisiä; osa tammoista on kiimassa ja ovuloi, osa tammoista ovuloi vaikkakaan ei näytä ulkoista kiimaa (EVANS 1977).



KUVA 1. Tamman lisääntymiskierto

1.1.1 Kiima ja kiimakierto

Normaali kiima ja varsakiima. Normaalina kiiman pituutena pidetään 2 - 10 vrk. HUGHES (1975) on saanut keskiarvoksi 5.6 vrk (1 - 24). Kiiman pituus helmi-maaliskuussa oli 7.6 vrk ja huhtitoukokuussa 4.8 vrk (1 - 19)(U.S.A.), mikä kuvaa hyvin vuodenajan vaikutusta kiiman pituuteen. Varsakiimassa tammät ovat 7 - 12 vuorokauden kuluttua synnytyksestä 73-prosenttisesti. Yhdeksäntenä päivänä synnytyksestä oli kiimassa 26 % tammoista (EVANS 1977).

Kiimakierto (syklus). Kiimakierron pituus sykluksen alusta seuraavan alkuun on 50 - 60 prosentilla tammoista 21 - 23 vrk (EVANS 1977). Myös VOSS ja PICKETT (1976) ovat saaneet samansuuntaisen tuloksen, 21.5 vrk (13 - 37) samoin HUGHES (1975) esittää pituudeksi 20.6 vrk (13 - 34).

Taulukko 1. Tammojen kiimakierron pituuden vaihtelu (HUGHES ym. 1972).

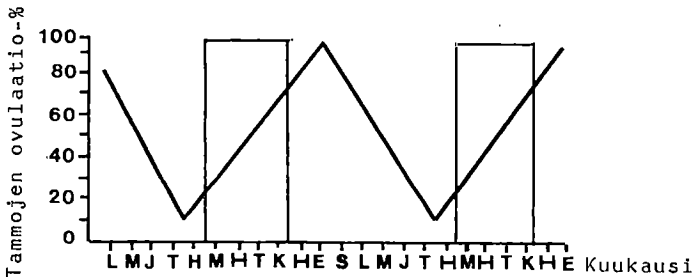
18 vrk	18-25 vrk	26-36 vrk	37-48 vrk	48 vrk
7 %	49 %	15 %	13 %	16 %

Kiimaväli. Keskimäärin kiimaväli (aika kiiman lopusta seuraavan alkuun) on 14 - 16 vrk. HUGHES ym. (1972) ovat saaneet diestruksen, johon sisältyy metestrus, pituudeksi 15.4 vrk (16 - 25). Metestrus alkaa ovulaatiolla. Tamman käyttäytymisen muutos siirryttäessä estruksesta diestruksen tapahtuu verrattain nopeasti. HUGHES ym. (1972) ovat saaneet tuloksen, että 80 % tammoista oli 48 tunnin kuluttua ovulaatiosta diestrus-vaiheessa ja 50 % jo 24 tunnin kuluttua.

Kiimakierron epäsäännöllisyyteen vaikuttavat tekijät. HUGHES ym. (1972) havaitsivat, että kuuma sää voi katkaista estrussykluksen. Hiljainen kiima, jolloin tamma ei näytä ulkoisia merkkejä,

tulkitaan usein kiiman epäsäännöllisyydeksi, vaikka monesti on kysymys kiimantarkkailun puutteellisuudesta ja tulkintavirheistä.

Myös ovulaatiomäärässä esiintyy vaihtelua johtuen vuodenajasta. Talvikuukausien aikana ovulaatio tapahtuu usein ilman ulkoista kiimaa. Ovulaatio-% on suurin kesäkuukausina. Siirryttäessä inaktiivista anestruus-kaudesta siitoskauden alkuun, voivat tammat näyttää kiimaa, mutta eivät kuitenkaan ovuloi.



KUVA 2. Vuodenaajan vaikutus ovulaatioprosenttiin Australiassa (Sydney). Pylväät kuvaavat siitoskauden ajoittumista. (ROSSDALE 1975).

1.1.2 Munasarjamuutokset tamman lisääntymiskierron aikana

Ovarisyklukseen kuuluu follikkelin muodostuminen ja sen puhkeaminen. Tilalle muodostuu keltarauhanen, joka surkastuu 15 - 17 vrk:n kuluttua. Ominaista ovarin toiminnalle on sen seinämän voimakas verentungos (hyperemia), mistä seuraa, että peräsuolen kautta tamman munasarjoja tutkittaessa on vaikea havaita niissä tapahtuvia muutoksia tai tietää kiiman vaihetta, mikäli tutkimusta ei suoriteta riittävän usein, varsinkin kiiman loppuvaiheessa (RAJAKOSKI ja TANHUANPÄÄ 1973).

Ennen ovulaatiota follikkelin seinämä on voimakkaasti hypereminen. Follikkeli on läpimitaltaan 3 - 6 cm ja täyttää ovulaatiokuopan. Ovulaatioajan lähestyessä follikkeli tuntuu rektaalisesti pehmeältä (RAJAKOSKI ja TANHUANPÄÄ 1973). On huomioitava myös se, etteivät kaikki follikkelit tule pehmeiksi ennen ovulaatiota (HUGHES 1975). Kypsynyt follikkeli ovuloituu ja follikkelineste valuu ovulaatiokuopan läpi ulos ja ontelo alkaa täyttyä verenvuodosta, mikä syntyy hyperemisen seinämän repeilystä. Tamma aristaa rektaalaisesti koetettaessa ovuloitunutta follikkelia. Painauma täyttyy 10 - 12 tunnin kuluttua verihyytymällä (RAJAKOSKI ja TANHUANPÄÄ 1973).

1.2 Sperma ja sen kemiallinen koostumus

Oriin siemenneste poikkeaa muiden eläinten spermasta alhaisen fruktoosipitoisuuden vuoksi. Siemennesteestä voidaan erottaa plasmaosa (geeli), jonka muodostamiseen osallistuu sitruunahappo (LIITE 1).

Hevonen kuuluu monivaiheisesti ejakuloiviin eläimiin. TISCHNER ym. (1974) ovat tutkineet oriin astumiskäyttäytymistä avoimen keinoemättimen avulla. Astumiskäyttäytyminen on lähes vakio kaikilla oriilla. Ejakulaatioon (siemnsyöksyyn) tavitaan keskimäärin seitsemän emättimen sisäistä työntöä. Ejakulaatio tapahtuu 5 - 10 fraktiossa, joista kolmessa ensimmäisessä (ei huomioitu vesihera-
maiseta ensimmäistä fraktiota) on TISCHNERin ym. (1974) mukaan 80 % siittiöistä. KOSNIAK (1975) on saanut vastaavat tuloksen kolmesta ensimmäisestä fraktiosta, joissa siittiöistä oli 76 %, GPC:sta 70 %, samoin näissä fraktioissa oli suurin pitoisuus ergotioniinia ja fruktoosia. GPC (glyserylfosforylkoliini) on emäs, jota erittyy epididymiksestä.

Taulukko 2. Oriin ejakulaation eri fraktioiden siittiötiheys ja kemiallinen koostumus (21 ejakulaatiota, joista on tutkittu 132 fraktiota, on kerätty neljältä eri tyyppiseltä ja eri ikäiseltä oriilta)(KOSNIAK 1975).

Fraktion n:o	Näytteiden lkm	Fraktion tilavuus (ml)	Siittiötiheys (10^6 /ml)	Pitoisuudet		
				Fruktoosi	Ergoti- oniini	GPC
1	21	8.3	528.9	11.2	16.0	77.5
2	21	6.6	425.6	10.4	15.0	88.3
3	21	7.7	307.8	9.3	12.4	80.5
4	21	4.8	205.0	7.3	12.1	60.7
5	21	4.1	120.1	7.3	8.0	33.3
6	14	5.1	85.1	9.2	5.5	29.7
7	9	3.9	58.3	11.3	4.8	14.3
8	4	4.7	88.7	10.2	3.8	19.7
Yht.	132	45.2				

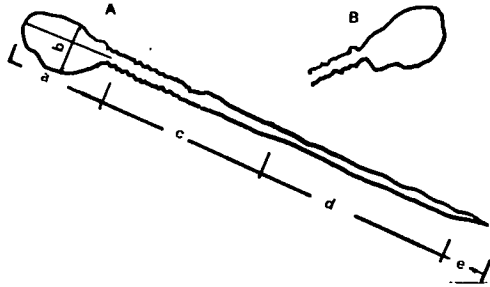
GÖTZE (1949) on jakanut oriin ejakulaation kolmeen päävaiheeseen. Kussakin näistä vaiheista on erotettavissa tiettyjä sokerirauhaseritteitä (mm. LAMBERT ja MCKENZIE 1940). Ensimmäisessä vaiheessa (esifaasissa), joka tapahtuu kitkaliikkeiden kanssa samanaikaisesti, virtaa siittiövapaata vesiheramaista eritettä Cowperin rauhasesta ja uretaalirauhasesta (ANDERSSON 1945). Ensimmäisessä pääfaasissa tulee suurin osa siemensoluista sekoituneena prostata-eritteeseen. Välittömästi toisessa pääfaasissa tyhjenee limainen rakkularauhasten erite (clandula vesiculariserite) ja bulbourethraalirauhaserite (ANDERSSON 1945). Lisäsukupuolirauhaseritettä on koko ejakulaatiossa 50 % (BERLINER 1947).

1.3 Siittiön morfologia

Siittiöiden (spermatozoa) rakenne on koko eläinkunnassa varsin yhdenmukainen. Tyypillistä oriin siittiölle on, että sen kaulassa sijaitsee mikrotubuleita. Siittiön pää on epäsymmetrinen, siittiön hännän asento ei myöskään ole akselinsuuntainen (BIELANSKI ja KACZMARSKI 1979).

A ja B Pää eri suunnilta katsottuna

- a) Pään pituus
- b) Pään leveys
- c) Kaula ja keskiosa
- d) Varsinainen häntä
- e) Hännän loppuosa



KUVA 3. Oriin siittiön kaavakuva (BIELANSKI ja KACZMARSKI 1979).

1.4 Siittiöiden biokemiaa ja fysiologiaa

Siittiön kolme osaa: pää, keskikappale ja häntä ovat kemialliselta koostumukseltaan erilaisia. Tämä vaikuttaa osien toimintaan; keskiosa ja häntä tuottavat aineenvaihdunnallaan (glykolyysi ja hengitys) siittiön tarvitsemää energiaa, pään tehtävä on munasolun hedelmöittäminen ja geneettisen informaation siirto.

Sokerin hajoaminen ja hengitys, jotka tuottavat energiaa siittiöiden liikkumista varten, tapahtuu keskiosassa ja hännässä hapetomissa olosuhteissa. Kyseiset reaktiot tarvitsevat orgaanisia happoja ja alkoholia. Ei ole pystytty selvittämään, miten kemiallinen energia muuttuu mekaaniseksi energiaksi. On havaittu, että on olemassa selvä suhde siittiöiden liikkuvuuden ja ATP-varastojen välillä; jos ei ole ATP:ta, ei ole myöskään liikkuvuutta. Korrelaatio ATP:n ja ADP:n pitoisuuksien ja liikkuvien siittiöiden prosentuaalisen osuuden välillä on 0.89 ($p < 0.05$). Yhtä selvää korrelaatiota ei ole siittiöiden aineenvaihdunnan ja hedelmällisyyden välillä (SMIDT ja ELLENDORF 1970).

Ejakulaatioon asti siittiöt ovat lepotilassa (anabioosissa), jonka jälkeen ne saavuttavat liikkuvuuden. Liikkuvuuden aiheuttavat kalvopotentiaalin muuttumisen aikaansaavat mekanismit. Tällöin K^+ - ja Na^+ -suhde muuttuu, samalla tapahtuu siittiöiden osmoottisen paineen väheneminen sekä kalvojen (membraanien) läpäisykyvyn muutos (SMIDT ja ELLENDORF 1970).

2. HEDELMÖITTYMINEN

2.1 Siittiön kulkeutuminen hedelmöittymispaikalle

Ori siementää kohtuun. Huippukiiman aikana kohdunsuu on verraten avoin ja astutuksen yhteydessä se avautuu lisää. (KNUDSEN 1971). Ovulaatiota edeltävä estrogeenitason nousu lisää liman määrää sekä vesi- ja suolapitoisuutta sukuelimissä, mikä auttaa siittiön etenemistä (NIEMI 1975).

Siittiö on ejakulaation jälkeen vain lyhyen ajan kosketuksessa siemenplasman kanssa. Suurin osa siemennesteestä jää kohtuun, josta tamma supistusten avulla työntää sen ulos viimeistään puolen tunnin kuluttua astutuksesta (KNUDSEN 1971).

Siittiöt saapuvat munajohtimeen 5 - 10 min. kuluttua astutuksesta. Kokeellisesti on osoitettu, että jos eläintä häiritään astutuksen yhteydessä, jäävät siittiöitä munajohtimeen kuljettavat supistukset pois. Siittiöt eivät pääse pelkästään oman liikkeensä avulla munajohtimen ampullassa sijaitsevalle hedelmöittymispaikalle (KNUDSEN 1971)

Siittiösolut voivat elää munajohtimessa vähintään kaksi vuorokautta, on kuitenkin tapauksia, jolloin ne ovat eläneet hedelmöittämiskykyisinä huomattavasti kauemmin (KNUDSEN 1971).

2.2 Kapasitaatio

Naaraan sukupuolitehyyissä tapahtuvia muutoksia, jotka tekevät siittiön lopullisesti hedelmöityskykyiseksi, nimitetään kapasitaatioksi. Kapasitaatio on ehkä heikoimmin tunnettu hedelmöittymiseen liittyvä tekijä, ja kuitenkin juuri sen voidaan

katsoa aloittavan tapahtumaketjun, joka johtaa hedelmöittymiseen (NIEMI 1975). Kapasitaation kestosta hevosilla tiedetään vähän, mutta SALISBURY ja Van DEMARK (1961) arvioivat kapasitaation kestoksi sonnilla n. 6 tuntia.

SUOMINEN ja NIEMI (1972) ovat osoittaneet, että yleensä siemenplasmassa on akrosomin trypsiinin kaltaista entsyymiä estävä tekijä, ns. dekapasitaatiotekijä. Tämä on ilmeisesti yksi niistä aineista, jotka poistuvat kapasitaation aikana. Kapasitaation aikana siittiön pinta paljastuu munasolun ja sitä ympäröivien solujen vaikutukselle. Kapasitoituminen merkitsee ainakin osaksi siittiön pinnan puhdistautumista pinta-aineista, varsinkin akrosomin osalta (NIEMI 1975).

2.3 Akrosomireaktio

Hedelmöittääkseen munasolun on siittiön läpäistävä munakummusta peräisin oleva corona radiata-solukko sekä zona pellucida-kerros. Vaikka siittiöitä olisi paikalla jo heti ovulaation tapahtuessa, ei hedelmöitys ilmeisestikään tapahdu heti. Muutaman tunnin kuluessa munaa ympäröivä munakumpu käy läpi muutoksia, jolloin granulosa-soluja irtoilee ja tuhoutuu, mikä vasta tekee mahdolliseksi siittiön tunkeutumisen munasoluun (NIEMI 1975).

Munan ja siittiön kohtaaminen ovat todennäköisesti riippuvaisia törmäyspinnan suuruudesta ja siittiön liikkeiden aktiivisuudesta sekä siittiöiden lukumäärästä. Tullessaan kosketukseen ensin munakummun solujen ja sitten zona pellucidan solujen kanssa menettää siittiö vähin erin akrosominsa, tapahtuu akrosomireaktio. Tällöin siittiön solukalvo ja akrosomin ulkokalvo ensin pilkkoutuvat sekä synnyttävät yhdessä rakkuloita. Akrosomin sisäkalvo sensijaan säilyy siittiön päähän kiinnittyneenä. Tämän rakkuloitusvaiheen aikana akrosomista vapautuu hyaluronidaasia. Hyaluronidaasi pystyy irroittelemaan granulosoluja toisistaan. Ilmeisesti akrosomireaktio raivaa entyysmaattisesti tietä siittiölle munasolun läheisyyteen. Akrosomista ei ole akrosomireaktion jälkeen jäljellä kuin sisäkalvo ja akrosomin tyvi (NIEMI 1975).

3. TIINEHTYMISPROSENTTI JA SIIHEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT

Eri hevosrotujen välillä on suuria eroja hedelmällisyydessä. Esimerkiksi monet ponirodut tiinehtyvät lähes 100-prosenttisesti. Esim. Norjassa on saatu Dalahevosen tiinehdyttämisprosentiksi 48.7 (aineisto käsitti 91 oritta ja 7243 tammaa) ja vuonohevosen tiinehdyttämisprosentiksi 61.7 (aineisto käsitti 39 oritta ja 3999 tammaa) (AAMDAL 1979). Suomenhevosen keskimääräinen tiinehtymisprosentti on astutuksessa 45, lämminverisillä ravihevosilla saavutetaan hieman yli 10 prosenttiyksikköä parempi tulos.

PACE ja SULLIVAN (1975) ovat osoittaneet oriiden hedelmällisyyden vaihteluväliksi tuoresimennyksessä 50 - 80 prosenttia ja pakastesiemennyksessä 0 - 60 prosenttia.

Oriin tiinehdyttämisprosentin on havaittu laskevan lähes suoraviivaisesti, mikäli tammamäärä siitoskauden aikana on kohonnut yli 80 (MERKT ym. 1979). Sensijaan oriin iällä ei näyttäisi olevan vaikutusta hedelmöittämiskykyyn (MERKT ym. 1979).

Oriilla esiintyy hyvin harvoin täydellistä hedelmättömyyttä (ROSSDALE 1975). Tavallisimpia syitä huonoon tiinehtymistulokseen lienee se, ettei hevosen sukuelintoimintoja tunneta riittävän hyvin (ROSSDALE 1975). Väärä astutusajankohta ja oriiden liikkäyttö kiireisimpänä siitoskautena ovat tavallisia virheitä (ROSSDALE 1975).

Mikäli spermassa on tavattu tavallista enemmän epänormaaleja siittiöitä, on havaittu tiinehdyttämiskyvyn alenemista (ROSSDALE 1975, AAMDAL 1979).

Tammojen hedelmättömyyteen ovat huonon kiimatarkkailun lisäksi usein synnä munasarjojen toimintahäiriöt sekä sukuelininfektiot. Sen vuoksi on tullut yhä tärkeämmäksi huomion kiinnittäminen astutushygieniaan. Esimerkiksi saksalaiset ovat kohottaneet täysiverihevosien varsomisprosentin viidessä vuodessa 54:stä 80:een tehostetun astutushygienian ja kiimatarkkailun avulla (MERKT ja KLUG 1976).

3.1 Sikiön varhaiskuolema

Sikiön varhaiskuolemaa, joka tapahtuu kymmenen ensimmäisen kanto-
viikon aikana, on todettu suomenhevosilla 16 % (MOBERG 1972).
Sikiön varhaiskuolemista on havaittu eniten täysiverihevosilla,
esim. irlantilaisilla täysiverisillä (BADI ym. 1978).

Varhaiskuolemaa aiheuttavat hormonaaliset häiriöt sekä sukuelinten infektiot (ROSSDALE 1975). Varhaisluomista aiheuttavia tekijöitä voivat olla vitamiinien ja hivenaineiden puute sekä ruokinnan alhainen energiataso (BELLONJE JA NIEREK 1975).

Kuudennella kantoviikolla tapahtuvat muutokset sikiön fysiologiassa voivat aiheuttaa varhaiskuolemaa. Tällöin keltuaispussin tehtävät siirtyvät rakkokalvolle, mikä voi aiheuttaa hapen puutetta sikiöllä (JONES 1973).

Varhaiskuoleman tapahduttua sikiö ja sikiövesi imeytyvät eikä ulkoisia merkkejä luomisesta voida havaita. Varhaiskuoleman jälkeen kohtu tulee kiinteäksi ja putkimaiseksi kuten tiineellä tammalla, myös munasarjat ovat hyvin kehittyneet. Sikiön jäänteet pystyvät ylläpitämään tiineyttä, eikä tamma tule useinkaan enään kiimaan kyseisenä siitoskautena (BELLONJE ja NIEREK 1975).

Varsakiimaan astutetuilla tammoilla on havaittu eniten varhaiskuolemia (mm. MERKT 1966). KLUG ym. (1979) ovat todenneet, että vain kolmasosa tammoista, joilla oli varsa mukana ja jotka astutettiin ensimmäiseen kiimaan, tiinehtyivät. Sensijaan varsattomista tammoista tiinehtyi kaksi kolmasosaa.

Myös varsakiimaan pakastesiemennellä siemennetyillä tammoilla havaittu kohonnut varhaiskuolemaprosentti. TISCHNER (1975) on esittänyt, että kaikilla pakastesiemennetyillä tammoilla esiintyy normaalia enemmän sikiön varhaiskuolemia.

3.1.1 Tiineystarkastustusten vaikutus sikiön varhaiskuolemaan

Amerikkalaiset VOSS ja PICKETT (1975) ovat tutkineet kolmen vuoden ajan jatkuvan tiineystarkastuksen vaikutusta varhaisluomiseen tuoresiemennetyillä tammoilla. Tammat oli jaettu kahteen ryhmään. Toisessa ryhmässä olivat tammot, jotka tutkittiin peräsuolen kautta päivittäin viidenteenkymmenteen tiineysvuorokauden saakka (n = 46), toisessa ryhmässä tammot tutkittiin ainoastaan koetusoriin avulla (n = 24). Tiinehtyminen todettiin paremmaksi ($p < 0.025$) jälkimmäisessä ryhmässä, mikä osoittanee tammoille tulevaa mahdollista stressivaikutusta liian usein tehtävien tarkastusten vuoksi.

Vastoin edellistä mielipidettä esittävät MERKT ym. (1978), että varhaistiineyden tutkiminen kohottaa tiinehtymistä. Koska tarkastus ei mahdollista ainoastaan varhaistiineyden toteamista, vaan sen yhteydessä voidaan havaita myös mahdollinen uusi kiima, joka johtaa nopeampaan astutuksen uusimiseen kuin tutkimattomilla tammoilla.

IRVIN (1975) on tutkinut 487 tammian aineistolla tiineystarkastuksen vaikutusta sikiön resorptioon. Tarkastukset on suoritettu 20., 24., 32. ja 42. kantovuorokauden aikana. Tarkastukset eivät aiheuttaneet varhaiskuolemien lisääntymistä. Tutkittujen tammien tiinehtyminen parani, koska tyhjiksi jääneet tammot tulivat nopeammin uusinta-astutukseen.

4. SPERMAN LAATU JA TUOTANTO

4.1 Sperman laadun arvostelu

Sperman tiheys voidaan määrittää mikroskooppisesti käyttämällä laskukammiota, opasitaatiomenetelmällä (vertaaminen standardisarjoihin) ja fotometrinenetelmällä (BIELANSKI 1975). Liikkuvuutta (motiliteettia) arvioitaessa käytetään faasikontrastimikroskooppia. Siittiöiden morfologiset tutkimukset suoritetaan värjäyksillä. Elävien siittiöiden määrittämisessä käytetään reduktaasi-koetta ja elävyyden määrittämisessä resistenssikokeita.

4.1.1 Spermassa tapahtuvia muutoksia

Ennen spermatogeneesiä tai spermatogeneesissä tapahtuneet muutokset ovat primäärisiä. Ne ilmenevät siittiön eri osissa esim. taittumisina tai turpoamisina (BIELANSKI 1975). Jos primäärisiä muutoksia esiintyy enemmän kuin 10 %, on hedelmöittämiskyky alentunut (BIELANSKI 1975).

Sekundäärisiä muutoksia ovat spermatogeneesin jälkeen tapahtuneet (BLUM 1949). Tyypillisiä muutoksia ovat vammat häntäosassa sekä siittiön akrosomin vaipan tai siittiön pään irtoaminen sekä protoplasmapisaran esiintyminen (BIELANSKI 1975). Jos sekundäärisiä muutoksia esiintyy esim. 30 %, ei hedelmällisyys ole aina alentunut (BIELANSKI 1975).

4.2 Keinoemättimet (artificial vagina = AV)

Lähes joka maassa, jossa käytetään keinosiemennystä tai sitä tutkitaan, on kehitetty oma AV-malli. Amerikkalaiset, jotka käyttävät lähinnä tuoresiemennystä, ovat kehittäneet mm. Colorado-keinoemättimen, jossa suodatin asetetaan vaginaan jo keruuvaiheessa. Quate-mallissa suodatointi suoritetaan keruun jälkeen, samoin venäläisten käyttämässä AV-mallissa. Saksalaiset ovat kehittäneet keinoemättimen, jonka avulla voidaan sperma fraktioida.

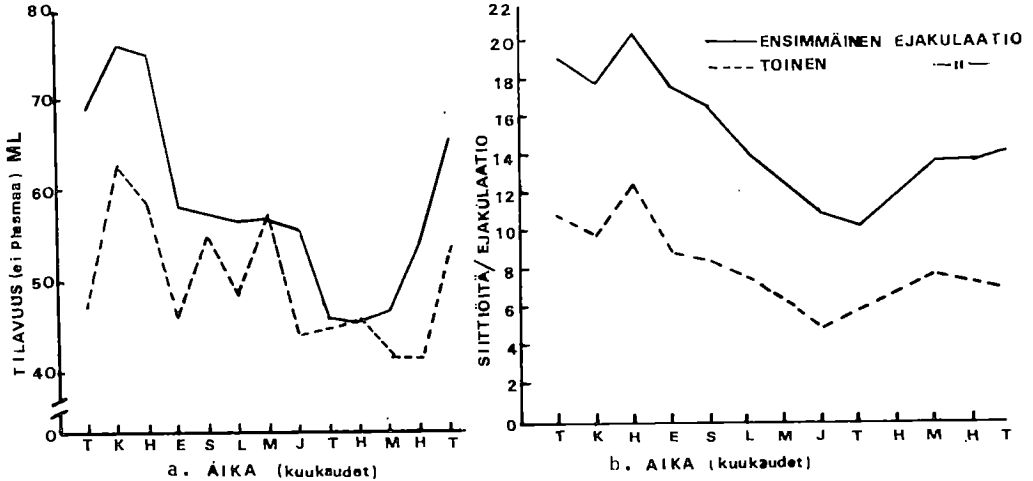
Puolalaiset käyttävät avointa keinoemätintä KRAKOW-72 (open artificial vagina), jossa ei ole kiinnitettävää keruustasia eikä edes muoviputkea emättimen päässä (kuten saksalaisessa mallissa), vaan keruu tapahtuu erillisillä astioilla. Ori työntää osan siittimestä ja terskan emättimen läpi. Tämä vaginamalli mahdollistaa sperman keräämisentäysin eri fraktioidina (TISCHNER ym. 1974). On luonnollista, että fraktioiduissa menetelmissä tapahtuu melko suuria sperman häviöitä verrattuna kiinteisiin keinoemätinmalleihin, joissa myös jää jonkun verran siittiöitä keruustasioihin.

4.3 Sperman keräämisajankohdan vaikutus sperman tuotantoon ja pakastuksenkestokykyyn

Vuodenajan ja astutuskäytön lisäksi vaikuttaa siementuotantominaisuuksiin yksilöllinen kyky. On huomioitava, että varsinaisena paritus kautena vaihtelee siementuotanto vähän, mutta sensijaan simenen ominaisuudet, kuten tiheys ja motiliteetti voivat vaihdella suurestikin (KLUG 1977).

Oriin siementuotantoa säätelee mm. hypofyyysi, jota säätelee hypothalamus, jonka toiminta on riippuvaista mm. valon määrästä. Tämän vuoksi on luonnollista, että siementuotannon huippu ajoittuu alkukesään ja kesään. Kuitenkin esim. Amerikassa käytetään oriita siitokseen eniten ennen varsinaista siitoskautta (SULLIVAN ja PICKETT 1975).

Vuodenajan vaikutusta sperman pakastuskestävyyteen ovat tutkineet RAJAMAN ym. (1968) todeten sen olevan parhaan keväällä ja kesällä. Sensijaan NISHIKAWA (1975) on todennut, ettei keruuajalla ole kovin suurta vaikutusta pakastuskestävyyteen. Mm. Saksassa on siirrytty käytäntöön, jossa sperma kerätään joului-tammikuussa, koska orit joutuvat tämän jälkeen voimakkaaseen astutuskäyttöön, eikä sperman laatu ole enää pakastukseen kelpavaa.



KUVA 4. Keruukuukauden vaikutus ejakulaation a) tilavuuteen sekä b) siittiömäärään (plasmaosa ei ole mukana) (PICKETT ja VOSS 1973).

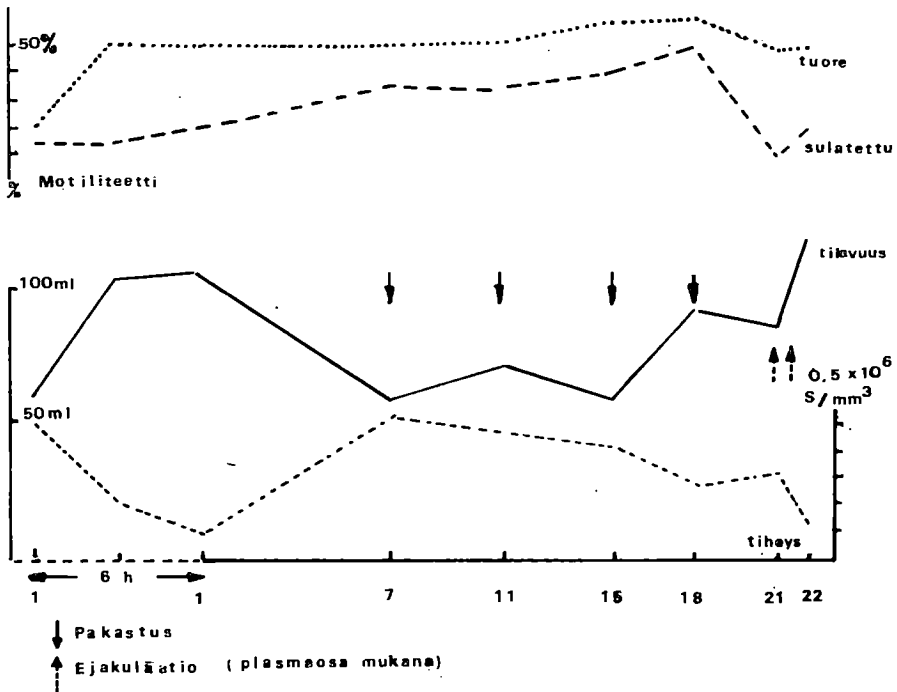
4.4 Sperman keräämistiheys

Kivesten päivittäinen siementuotanto on 8×10^9 siittiötä ja päivittäinen siemenen ulossaanti on 7×10^9 (SWIERSTA ym. 1975).

Siementuotanto vakiintuu 5 - 7 vrk:n kuluessa ensimmäisestä siemenenotosta, mikäli siemen kerätään päivittäin ja oritta käytetään säännöllisesti. Ensimmäiset ejakulaatiot astutuskauden alussa sisältävät runsaasti epämuodostuneita siittiöitä.

Amerikkalaiset SULLIVAN ja PICKETT (1975) suosittelivat spermanottorytmiksi pakastesiemennykseen kahta kertaa viikossa ja tuoresiemennykseen joka toista päivää.

Varsinkin, jos oritta ei ole käytetty pitkään aikaan siitokseen, suosittelee KLUG (1977) määrätynlaista sperman keruutiheyttä, joka johtaa hyvään tiheyteen ja motiliteettiin tuoreessa ja myös sulatetussa spermassa. Esim. talven jälkeen kerätään siementä useita kertoja lyhyellä aikavälillä, jonka jälkeen spermantuotannon annetaan vakiintua viikon. Tämän jälkeen kerätään siementä määrättyllä frekvenssillä, esim. 4-4-3-3-1-vuorokauden välein.



KUVA 5. Erilaisten sperman keruuvälien vaikutus ori Wedekind'in siemenen määrään, tiheyteen ja liikkuvuuteen (v. 1977), ensimmäinen ejakulaatti on kerätty 150 vrk:n seksuaalisen lepotaun jälkeen (KLUG 1977):

Kuvasta voidaan havaita, että ensimmäisessä ejakulaatissa on korkea siementiheys, mikä johtuu pienestä spermavolyymista. Siinä

on myös alhainen liikkuvuus niin tuoreessa kuin sulatetussakin siemenessä. Toisessa ja kolmannessa ejakulaatissa on havaittavissa selvä siementiheyden aleneminen samalla, kun muut arvot, paitsi sulatuksen järkeinen motiliteetti, nousevat. Välissä olevan lepokauden aikana tiheys ja tilavuus saavuttavat alkuperäiset arvonsa samalla, kun tuoreessa ja sulatetussa spermassa on hyvä liikkuvuus. Tämän jälkeen saadaan useita erittäin käyttökelpoisia ejakulaatteja. Kun keruutiheyttä lisätään, laskevat tiheys ja sulatusarvot. Näihin tutkimuksiin perustuen ovat saksalaiset pystyneet pakastamaan korkealuokkaista spermaa, jonka tiheydeksi on saatu $0.472 \times 10^6/\text{mm}^3$ ja liikkuvuuden keskiarvoksi sulatuksen jälkeen 40 %. KLUG (1977) on todennut, että sulatuksen jälkeinen motiliteetti on yhteydessä hedelmällisyyden kanssa.

Tutkituista oriista täytti edellä esitetyt laatuvaatimukset vain n. 15 - 25 % (KLUG 1977), kuitenkin uudistetun pakastustekniikan (makro-oljet) ansiosta voidaan käyttää n. 60 % kaikista oriista pakastesiemennykseen (DARENIUS 1981).

Taulukko 3. Määrätyllä keruufrekvenssillä otetun sperman laatu-tiedot. Mukana on ollut 11 oritta, joilta on otettu 32 ejakulaattia. (Tilavuus ei sisällä plasmaosaa) (KLUG 1977).

Ominaisuus	\bar{x}	s
Tilavuus (ml)	62.82	± 21.0
Tiheys $10^6/\text{mm}^3$	0.472	± 0.15
Liikkuvuus, eteenpäin, %	52.0	± 7.0
" yhteensä "	75.0	± 6.0
Väriainesabsorbtiotesti	17.8	± 4.7
Epänormaalit siittiöt, %:		
- akrosomi irronnut	5.6	± 3.7
- pää irronnut	3.1	± 1.7
- plasmapisara	9.6	± 4.2
Yhteensä	38.0	± 10.0
Sulatuksen jälkeinen liikkuvuus, eteenpäin	40	30.0 - 60.0
" yhteensä	52	40.0 - 70.0

5. SPERMAN PAKASTAMINEN

5.1 Plasman erottaminen

Oriilla ja karjulla on pystytty osoittamaan, että plasman poistaminen ennen syväjäädystä (-196°C) parantaa tuloksia. Plasmaosan erottaminen on kohottanut siittiöiden motiliteettia sulatuksen jälkeen (RAJAMAN ym. 1968). Oriin siemenplasmassa on runsaasti Na-kloridia, mikä selittänee plasmaosan heikentävän vaikutuksen siittiöiden motiliteettiin. On pystytty osoittamaan, että väliaineessa oleva korkea Na-kloridipitoisuus on vahingoittanut siittiöitä pakastuksen aikana (NISHIKAWA 1975).

Sperman viimeisen fraktion, joka sisältää lisärauhaseritettä, on todettu olevan vahingollista siittiöille (BADER ja HUTTENRAUCH 1966). Plasmaosa voidaan erottaa sperman keruuvaiheessa filtroimalla, fraktioidulla sperman keruulla tai sentrifugoimalla sperma, jolloin kierrosnopeus säädetään viskositeetin mukaan (NISHIKAWA 1975).

5.2 Solun syväjäädystys

Siittiösolu onnistuttiin pakastamaan ensimmäisen kerran 1950. Solun säilyminen -196°C :n lämpötilassa ei ole ongelmallista, vaikeuksia esiintyy solun saattamisessa tähän lämpötilaan vahingoittumattomana sekä sen sulattamiseen. Solun pitäisi säilyä kyseisessä lämpötilassa 3 000 - 10 000 vuotta. Jäätyminen joko tappaa solun tai säilyttää sen täysikuntoisena. On esitetty, ettei jäädytyksen yhteydessä tapahdu mitään geneettisiä muutoksia, sensijaan fysiologiset muutokset, kuten esim. akrosomivahingot, ovat mahdollisia (JOKINEN 1980).

5.2.1 Vaaralliset lämpötilat

Laimentamattomana 0 °C:ssa oriin sperma elää ainoastaan muutamia tunteja (MERKT ym. 1978). Päinvastoin kuin sonnin sperma, elää oriin sperma jopa yli +38 °C:een lämpötilassa yli 30 min. (NISHIKAWA 1975).

5.2.2 Jäähdytysnopeus ja glyserolilisäys

Jäähdytyksen myötä hidastuu siittiöiden hapetus-pelkistys-prosessi ja elinilmiöt. Neuvostoliittolaiset NAUMENKOV ym. (1977) ovat osoittaneet, että pienissä tilavuuksissa sperman ja laimennusnesteen tasapainotusaikana hengitysintensiivisyys väheni spermatozoilla 38 % hapen suhteen ja 36 % CO₂:n suhteen (volyymi 50 ml). Suurissa tilavuuksissa väheni hapenotto 15 % ja CO₂:n tuotanto 10 % (volyymi 300 ml). Todettiin, että lämpötilan hidaskasvun aleneminen heikensi siittiöiden elinkykyä, ja että on tärkeää, että jäähdytys tapahtuu nopeasti ja tasaisesti.

Solunsisäisten jääketeiden syntymisen estämiseksi lisätään glyserolia. BIELANSKI ja KACMARSKI (1971) ovat tutkineet glyserolin vaikutusta ja havainneet, että jos pakastus suoritetaan ilman glyserolia, akrosomin ulkokerros turpoaa, tulee ryppyiseksi ja irtaana. Mikäli ei tehty glyserolilisäystä, havaittiin myös postnuclear-cap-osan (tuman takana sijaitseva ylin osa) kaksinkertaistuvan. Mikäli lisäys tehtiin, ei voitu havaita eroa normaaliin siittiöön. Samoin tutkittaessa 3 kk pakastettuna ollutta spermaa, ei eroja ultra-strukturissa voitu todeta.

PACE ja SULLIVAN (1975) ovat kuitenkin todenneet, että glyserolilla on myös siittiöiden elinkykyä heikentävä vaikutus. He saivat tuloksen, että glyserolimäärän alentaminen 7 prosentista 2 prosenttiin paransi hedelmöitystulosta ($p < 0.05$). Myös sioilla on todettu, että glyseroli tuhoaa siittiön akrosomin ja siten alentaa hedelmöittämiskykyä (JOKINEN 1980).

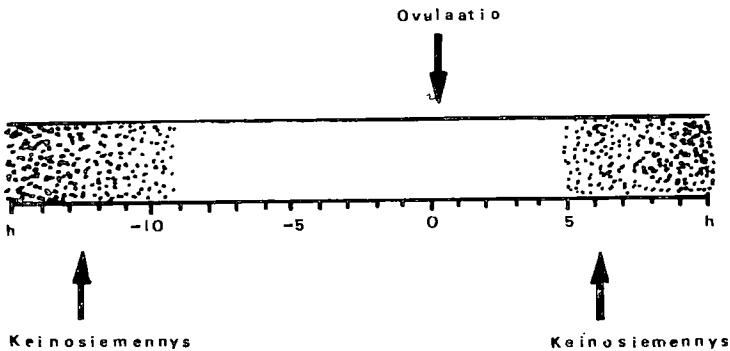
5.3 pH:n vaikutus siittiöihin

pH:n noustessa lisääntyy siittiöiden liike, sitävastoin alhainen pH vähentää siittiöiden liikettä. Mikäli sperma laimennetaan emäksisellä laimentimella, kuluttavat siittiöt 0 °C:ssa energiaa ja niiden elinvoima heikkenee. Lievästi happamissa liuoksissa ovat siittiöt anabiosissa lämpötilan ollessa 0 °C (NAUMENKOV ym. 1977).

6. TAMMAN SIEMENNYS

6.1 Siemennysajankohta

Tarkka ja usein suoritettu follikkelikontrolli on välttämätöntä oikean siemennysajankohdan selvittämiseksi (KLUG 1977). Pakastespermaa käytettäessä on siemennyksen osuttava lähelle ovulaatioajankohtaa. HUGHESin (1975) mukaan tammoista ovuloi 78 % klo 16 ja 8 välillä. Myös WITHERSPOON (1972) on saanut samansuuntaisen tuloksen.



KUVA 6. Pakastespermasiemennyksen on tapahduttava lähellä ovulaatiota, jotta saavutetaan hyvä tiinehtymistulos (KLUG 1977).

MERKT ja KLUG (1976) suorittivat ravisiittolassa pakastesiemennyskokeen, jossa 33 tammaa siemennettiin ennen ja jälkeen ovulaation. Näistä tiinehtyi 24 eli 73 %. MARTIN ja KLUG (1979) siemensivät 19 tammaa kuuden tunnin sisällä ovulaatiosta, jolloin tiinehtyi 12 tammaa ensimmäisestä siemennyksestä, mikä todistaa, että

myös ovulaation jälkeen tapahtuvalla siemennyksellä on tiinehdyttämismahdollisuus. Amerikkalaiset PACE ja SULLIVAN (1975) tutkivat pakastespermasiemennyksen optimaalista ajankohtaa ja saivat parhaan tuloksen, kun siemennys suoritettiin 12 tunnin sisällä ovulaatiosta ja 24 tunnin välein.

6.2 Kiiman ja ovulaatioajankohdan synkronointi

Huomattavan suuret vaihtelut kiima-ajan pituudessa ovat aiheuttaneet vaikeuksia keinosiemennyksen ajoittamisessa. Kiiman synkronointikokeissa on havaittu, että yhteen kiimaan suoritettujen siemennysten lukumäärää on voitu vähentää, mikäli kiima on synkronoitu.

Kiiman synkronointia voidaan käyttää siitoskauden alussa ongelmattomille anestroksen lopettamisen takia sekä normaalisti toimiville tammoille aiheuttamaan estrusta. Kiiman synkronointi tapahtuu progesteroniyhdisteiden avulla. Prostaglandiini $F_{2\alpha}$ on käytetty luteolyysin aikaansaamiseksi tammoilla, samoin kuin prostaglandiini-analogeja. On myös havaittu, että ihmisen choriongonadotropin- (HCG) hormoni käytettynä toisena kiimapäivänä, tai kun follikkeli on läpimitaltaan 35 mm, aiheuttaa ovulaation 48 tunnin sisällä (HYLAND ja BRISTOL 1979).

6.3. Siemennysannoksen siittiömäärä ja tilavuus

Saksalaiset sisällyttävät siemennysannokseen 200 miljoonaa siittiötä. Neuvostoliittolaiset suosittelevat n. 300 miljoonan siittiön annosta. Annoksen tilavuutta eivät VOSS ja PICKETT (1976) pidä oleellisena. Eräässä kokeessa saatiin sama tulos käytettäessä 2.5 ml:n (100 milj. siittiötä/annos) annosta kuin 12.5 ml:n annoksella, joka sisälsi 500 milj. siittiötä. Tavanomaisessa amerikkalaisessa siittolarutiinissa, jossa käytetään runsaasti tuoresimennystä, vaihtelee annos 1 - 5 ml (ALLEN ym. 1976).

Jopa 0.6 ml:n annos tuoresiementä on johtanut kohtalaiseen tii-
neystulokseen (PICKETT ja VOSS 1975). Saksalaisten käyttämä
annostilavuus on 4 ml, neuvostoliittolaiset käyttävät n. 25 ml:n
annoista pakastesiemennyksessä.

Siemennys voidaan suorittaa joko kohtuun n. 10 cm:n syvyyteen,
toiseen munasarveen tai munajohtimen suulle, kuten esim. saksa-
laiset ovat tehneet (KLUG ym. 1978).

7. TUORESIEMENEN KÄYTTÖ

7.1 Laimentamattoman tuoresiemenen käyttö

Tuoresiemennystä käytettiin runsaasti sosialistisissa maissa toisen maailmansodan aikana estämään hevosten tarttuvia sukuelin-sairauksia (esim. dourine)(BANE 1976).

Spermasta erotetaan plasmaosa suodattamalla tai fraktioimalla se ja siittiörikkain osa käytetään siemennykseen. Siemennysannoksen tilavuus vaihtelee millilitrasta ylöspäin ja annos sisältää tavallisesti vähintään 100 miljoonaa elävää siittiötä. Siemen säilytetään $+30 - 35^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa ennen siemennystä. Tällöin säilytysaika voi olla korkeintaan muutama tunti. Usein siemennys suoritetaan lähes välittömästi sperman oton jälkeen (ALLEN ym. 1976).

Hyvässä kiimakontrollissa olleilla tammoilla on saatu 50 - 60 %:n tiinehtyminen ensimmäiseen kiimaan ja yli kolmeen kiimaan siemennetyillä tammoilla on saatu 85 - 92 %:n tulos (ALLEN ym. 1976).

Pohjois-Amerikassa on nykyisin siirrytty suurimmissa siittoloissa lähes 100-prosenttisesti tuoresperma- tai laimennettuun tuorespermasiemennykseen (ALLEN ym. 1976).

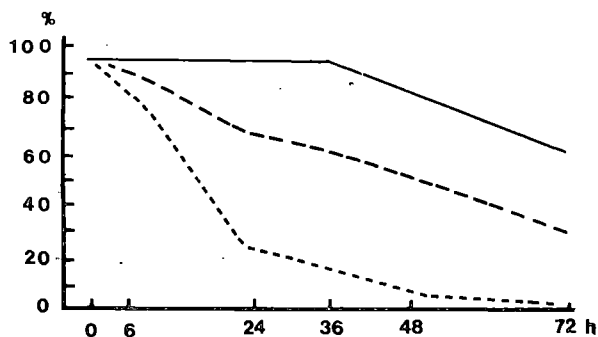
7.2 Laimennetun tuoresiemenen käyttö

Sperma voidaan laimentaa, jolloin sitä voidaan säilyttää kauemmin kuin tuoretta siementä. Samoin, mikäli siittiötiheys on korkea ja sperman tilavuus pieni, sitä voidaan jakaa useammille tammoille.

Laimennettu siemen jäädytetään hitaasti, 1 - 4 tunnissa, +4°C:n lämpötilaan, jossa sitä voidaan säilyttää puolesta vuorokaudesta jopa kolmeen vuorokauteen. Laimennussuhde vaihtelle riippuen tiheydestä, tavallisesti se on 2:1. Laimentimet jakaantuvat kahdentyyppisiin aineisiin, toiset sisältävät eri pitoisuuksia kananmunankeltuaista, glukoosia, fruktoosia tai laktoosia, toiset perustuvat maitotuotteisiin (kuorittu maito tai kerma), joihin on usein lisätty gelatiinia (ALLEN ym. 1976).

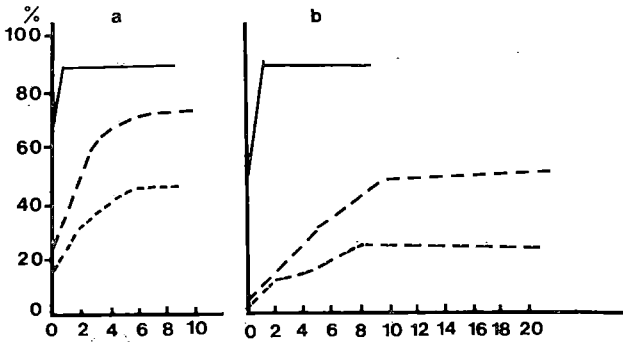
7.2.1 Laimennetun tuoresiemenen elinkyvyn palautuminen jäädytyksen jälkeen

NISHIKAWA (1975) on verrannut kolmea erilaista laimennusnestettä tuoreen sperman säilyttämisessä. CGH-27-laimennin osoittautui kokeissa parhaaksi verrattuna Baken-II- ja 5 %:een glukoosiliuokseen.



KUVA 7. Siittiöiden liikkuvuus eri laimennusnesteissä säilytysajan vaihdella 0 - 72 h. CGH-27 (—), Baken-II (---), 5 %:n glukoosilaimennus (----)(NISHIKAWA 1975).

Laimennettu sperma, jota oli säilytetty 24 tai 48 h $+4^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa ja lämmitetty uudelleen $+38^{\circ}\text{C}$, sai takaisin liikkuvuuden yhdessä minuutissa, kun oli käytetty CGH-27-laimennusnestettä. Sensijaan muita laimentimia käytettäessä ei saavutettu kuin osa liikkuvuudesta 8 - 10 min. kuluttua.



KUVA 8. Säilytysajan (a = 24 h, b = 48 h) vaikutus liikkuvuuden palautumiseen eri laimennusnesteissä. CGH-27 (—), Baken-II (---), 5 %:n glukoosiliuos (- - -)(NISHIKAWA 1975).

7.2.2 Laimennetun tuoresiemenen hedelmöittämiskyky erilaisten säilytysaikojen jälkeen

Kun spermaa on säilytetty laimennusnesteessä 2 - 8 tuntia $+4^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa, on saatu tiinehtymistulos, joka on ollut vertailukelpoinen astutuksessa saadun tuloksen kanssa. Vuosina 1961-65 on tiinehtymistulos ollut 67.3 %. Tiinehtymistulos on alentunut huomattavasti, kun säilytysaika on pidentynyt 24 - 48 tuntiin (NISHIKAWA 1975).

Taulukko 4. Tuorespermalla, joka on laimennettu CGH-27-laimentimella, saavutettu tiinehtymistulos, kun säilytysaika ennen siemennystä on ollut 2 - 8 tuntia (NISHIKAWA 1975).

Vuosi	Säilytys-aika, h	Siemennettyjen tammojen luku	Tiinehtyneiden tammojen luku	Tiinehtymis-%
1961	6	43	37	86.1
1963	3	7	5	71.4
1965	2	20	18	90.0
1965	2-8	337	214	63.5
Yht.	2-8	407	274	67.3

Taulukko 5. Saavutettu tiinehtymistulos, kun siementä on säilytetty 24 - 48 tuntia CGH-27-laimentimessa ennen siemennystä (NISHIKAWA 1975).

Säilytys-aika, h	Farmi	Vuosi	Siemennettyjen tammojen luku	Tiinehtyneiden tammojen luku	Tiineht.-%
24-30	0	1964	10	6	60.0
	H	"	6	0	0 ¹⁾
	H	1965	11	0	33.3
	T	"	6	2	11.1
48	0	"	9	1	0
	0	1964	4	0	0
	H	"	6	0	0

1) Keinosiemennys on suoritettu vain yhteen kiimaan

7.2.3 Eri laimennusnesteillä saatujen tiinehtymistulosten vertaaminen ilman laimennusta tehtyyn tuoresiemennykseen

PICKETT ja VOSS (1975) vertasivat Tris- ja kerma-gelatiini-laimennusnesteillä saatuja tiinehtymistuloksia ilman laimennusta tehtyihin tuoresiemennyksiin. Siemennykset suoritettiin tunnin

sisällä sperman keruusta. Siemennysannos sisälsi 500 milj. siittiötä. Siemennysannoksen tilavuus oli laimennetulla spermalla 11.6 - 11.8 ml ja laimentamattomalla vain 1.5 ml.

Kerma-gelatiini-laimennuksella saavutettiin hieman parempi tulos kuin laimentamattomalla tuoresiemennyksellä. Ero ei ollut kuitenkaan tilastollisesti merkitsevä. Sensijaan kerma-gelatiini-laimennus osoittautui hyvin merkitsevästi paremmaksi kuin Tris-laimennus.

Taulukko 6. Tris-2.4 %- sekä kerma-gelatiini-laimennuksella saadut tiinehtymistulokset verrattuna toisiinsa sekä vastaaviin laimentamattomalla tuoresiemennyksellä saatuihin tuloksiin (PICKETT ja VOSS 1975).

Sykli.	Laimennettu siemen				Laimentamaton siemen	
	TRIS		Kerma-gelatiini			
	Tiin./ siemenn.	Tiineys-%	Tiin./ siemenn.	Tiineys-%	Tiin./ siemenn.	Tiineys-%
1	9/24	37.5	18/24	75.0	18/24	75.0
2	5/13	38.5	4/5	80.0	4/6	66.7
3	4/7	57.1	1/1		0/1	0
Yht.	18/24	75.0 ^{a)}	23/24	95.8 ^{b)}	22/24	91.7 ^{b)}

a) ja b) Ero tilastollisesti hyvin merkitsevä

8. PAKASTESIEMENEN KÄYTTÖ

8.1 Pakastesiemennystoiminnan kehitys

Johtuen ongelmakentän laajuudesta ovat pakastesiemennyskokeista saadut tulokset vaikeasti vertailtavissa. Myös koejärjestelyt ovat erilaisia. Nähtävästi osin kaupallisten sovellutusten sekä eri maiden tutkijoiden välisen "kilpailun" vuoksi ei aina pyritäkään julkaisemaan kovin seikkaperäisiä koejärjestelyjä ja tuloksia.

8.2 Eri maissa suoritetuista pakastesiemennyskokeista

8.2.1 Pohjois-Amerikka

PACE ja SULLIVAN (1975) ovat verranneet erilaisten laimennusnesteidⁿ vaikutusta hedelmöittymiseen sekä erilaisia pakkausmenetelmiä. Parhaiksi laimennusnesteiksi osoittautuivat TCA₃₂₅ ja TCA₃₉₀. Tutkittaessa ampulli- ja pilleripakastuksen paremmuutta, saatiin TCA₃₂₅-laimentimella parempi tulos ampullimenetelmällä, kun taas TCA₃₉₀-laimennuksessa osoittautui pilleripakkaus paremmaksi.

8.2.2 Japani

NISHIKAWA (1975) on suorittanut 1966-73 lähes 600 tamman siemennyskokeen HF-20-laimennusnestettä käyttäen. Vuosina 1966-68 tammat siemennettiin ainoastaan yhteen kiimaan, vuodesta 1969 on siemennyksiä tehty myös toiseen ja kolmanteen kiimaan, mikä selittää parantuneen tiinehtymistuloksen näinä vuosina.

NISHIKAWAn (1975) mukaan Japanissa on saatu vertailukelpoiset tulokset tuore- ja pakastesiemennyksellä vuosina 1966-73. Edellä selostetussa kokeessa on käytetty osin viisi vuotta vanhaa syväjäähdytettyä spermaa eikä siemenen laadun ole todettu heikentyneen säilytyksen aikana. Sopivimmaksi laimennusnesteeksi glyserolipitoisuudeksi on saatu 4 - 5 %. Glyserolin vaikutusajalla ennen pakastusta ei ole todettu olevan merkitsevää vaikutusta sperman sulatuksen jälkeiseen liikkuvuuteen. NISHIKAWA ym. (1972) suosittelivat 4 - 5 tuntia. Hyvä tulos on saatu myös 30 sekuntia ennen pakastusta tehdyllä glyserolilisäyksellä. NISHIKAWA (1972) on todennut, että oriin sperman pakastuskestävyys on parempi kuin sonnin sperman, mutta yksilöiden väliset erot ovat suuria.

Taulukko 7. HF-20-laimennusnesteellä saadut tiinehtymistulokset vuosina 1966-73 (NISHIKAWA 1975).

Vuosi	Oriiden lkm	Siemennettyjen tammojen lkm	Tiinehtyneiden tammojen lkm	Tiinehtymis- prosentti
1966	1	6	3	50.0
1967	4	105	50	47.6
1968	3	162	76	46.9
1969	3	35	21	60.0
1970	1	40	26	65.0
1971	2	73	49	67.1
1972	3	61	40	65.6
1973	4	90	57	63.3
Yht.		572	322	56.3

Sulatuksen jälkeen tutkittiin 73 oriin sperma, yli 80-prosenttisesti siittiöiden liikkuvuus palautui 49 oriilla. Sensijaan 10 oriilla 21:tä tutkitusta palautui liikkuvuus 60-prosenttisesti.

8.2.3 Saksa

Saksalaiset ovat raportoineet jatkuvasti kohoavia tiinehtymistuloksia pakastesiemennyksistä viime vuosina. Siemennykset on suoritettu Cellen keinosiemennyskeskuksessa, johon otetaan hoidettavaksi runsaasti myös ns. ongelmatammoja, jonka vuoksi tammamateriaali on tuloksissa jaettu viiteen eri luokkaan (I - V) tiinehtymisennusteen perusteella (LIIITE 2).

Vuonna 1978 siemennetyistä tammoista tiinehtyi kaikkiaan 50 % ja luokissa I ja II siemennetyistä tammoista 60 %. Hyvä tulos johtuu osittain siitä, että ns. ongelmatammojen osuus oli pienempi kuin edellisinä vuosina, nyt vain n. 40 % (KLUG ym. 1979).

Taulukko 8. Cellessä vuonna 1978 pakastesiemennettyjen tammojen varhais- ja lopulliset tiinehtymisprosentit (KLUG y. 1979).

Tiinehtymis- luokka	Siemennettyjä		Tiineitä		Tyhjiä		Varhaisluomisia	
	lkm	%	lkm	%	lkm	%	lkm	%
I	76	36.9	44	57.9	19	25.0	13	17.1
II	53	25.7	26	49.0	26	49.0	1	2.0
III	56	27.2	16	28.6	31	53.3	9	16.1
IV	6	2.9	2	33.4	4	66.6	-	-
V	15	7.3	8	53.3	7	46.7	-	-
Yht.	206	100.0	96	46.6	87	42.2	23	11.2

MARTIN ja KLUG (1979) raportoivat saksalaisten kokeilemasta laimentimesta, jolla on saatu 63.2 %:n tiinehtymistulos. Aineisto käsitti 19 tammaa, jotka siemennettiin yhteen kiimaan. Siemennys suoritettiin ovuloivan munasarjan puoleiseen sarveen.

8.2.4 Neuvostoliitto

Neuvostoliitossa kehitettyä LCCY-laimennusnestettä (NAUMENKOV ja ROMANKOVA 1970) on kokeiltu useissa Itä-Euroopan maissa (LIITE 3). Saadut tulokset ovat toisistaan poikkeavia. Jugoslaviaalaiset ja puolalaiset ovat saaneet suuren sikiön varhaiskuolemisprosentin. Sensijaan neuvostoliittolaiset ilmoittavat verrattain hyviä varsomistuloksia.

PLATOV ym. (1974) raportoivat eri siittoloissa vuosina 1968-72 suoritetuista siemennuskokeista, joissa on käytetty LCCY-menetelmää. Tammaryhmiä, joiden koot ovat vaihdelleet 1 - 41, on ollut 18. Ryhmissä, joissa tammamäärä on ollut vähintään 16 tammaa, tiinehtymistulokset ovat vaihdelleet 0 - 76 %. Vuosina 1970-71 saatiin 35 - 67 %:n tiinehtymistulos. Paras tulos (67 %) on saavutettu, kun siittiömäärä siemennysannoksessa on ollut 700×10^6 ja 35 %:n tulokseen on päästy 35×10^6 siittiömäärän sisältävällä annoksella.

ALIEV (1975) on siementänyt LCCY-laimennuksella 30 tammaa, joista on tiinehtynyt 80 %. NAUMENKOV ja ROMANKOVA (1978) ovat verranneet pilleri- ja alumiiniputkipakkausmenetelmiä. Pilleripakastus johti 53 %:n tiinehtymistulokseen ja alumiiniputkipakkaus 63 %:n tulokseen. Kaikkiaan siemennettiin 117 tammaa, joista tiinehtyi ensimmäiseen kiimaan 67 %.

Puolalainen TISCHNER (1975) on käyttänyt LCCY-laimennusta ja saanut 51 %:n tiinehtymistuloksen kuuden viikon kuluttua siemennyksestä, lopullinen varsomisprosentti on ollut vain 28. Sikiön varhaiskuolemia ja luomisia on esiintynyt normaalia enemmän pakastesiemennysten yhteydessä.

PLATOV ym. (1975) raportoivat uudesta VNIİK-3-laimennusnesteestä, joka muistuttaa LCCY-laimenninta. Alustavassa tammojen siemennyskokeessa on tiinehtynyt kuusi tammaa kymmenestä.

PLATOV ja MURAV'EVA (1974) vertasivat VNIİK-3- sekä LCCY-laimennusnesteillä laimennettujen spermänäytteiden sulatuksen jälkeistä liikkuvuutta. Käytettäessä VNIİK-3-laimenninta, on 46.2

prosentilla oriista sperman liikkuvuus ollut 41 - 80 %:n välillä, ja 80 prosentilla oriista 20 - 80 %:n välillä. Sperman liikkuvuus on LCCY-laimennuksella ollut alle 20 % 71.2 prosentilla oriista. Yhdenkään oriin sperman liikkuvuus ei kohonnut yli 41 prosentin. Tutkittuja ejakulaatteja oli 46 kpl.

8.3 Sperman laadun ja pakastuksen vaikutus tiinehtymiseen sekä alkion kokoon

TISCHNER (1979) tutki 36 oriin 200 ejakulaattia. Laimennusnesteenä käytettiin modifioitua NAUMENKOVin ja ROMANKOVan (1970) kehittämää menetelmää (LCCY). Sperma kerättiin avoimella keinoemättimellä (Krakow-72). Suoritetuissa siemennyskokeissa testattiin viiden eri oriin hedelmöittämissäkykyä. Hedelmöittyminen tutkittiin 7 - 9 vrk:n kuluttua siemennyksestä tai astutuksesta huuhtelemalla tamman kohdun sarvet. Tammoja pakastesiemennettiin 44. Näiltä löytyi 14 alkioita. Kun samoista tammoista tuoresiemennettiin ja astutettiin yhteensä 21, havaittiin alkioita 11. Pakastesiemennyksellä tulos jäi siis 20 prosenttiyksikköä heikommaksi.

Löydetyt alkiot olivat normaaleja, rappeutuneita yksilöitä ei löydetty. Alkioiden läpimitoissa havaittiin suuria eroja. Pakastesiemennyksellä aikaansaadut alkiot olivat 7 - 9 vrk:n iässä läpimitaltaan keskimäärin 390 μm (120 - 660 μm), tuoresiemennyksellä keskimäärin 598 μm (508 - 722 μm).

Alkion kokoon vaikuttavia tekijöitä on vaikea tietää, toteaa MAURER (1976), joka on tehnyt tutkimuksia kaneilla. On kuitenkin ilmeistä, että jäädytyksellä on vaikutus alkion entsyymiaktiivisuuteen samoin kuin ravinnon saantiin. Tätä voitaisiin perustella siittiön liikkuvuuden alentumisella ja lyhyemmällä elinajalla sekä alkion hitaammalla kehityksellä.

9. YHTEENVETO

Tuoresiemen säilyy hedelmöittämiskykyisenä korkeintaan muutaman tunnin keräämisen jälkeen, mikäli laimenninta ei lisätä (ALLEN ym. 1976).

Laimennettua tuoresimentä voidaan säilyttää 2 - 8 tuntiin + 4 °C:een lämpötilassa ennen siemennystä. Tiinehtymistulos on ollut vastaavan suuruinen astutustulosten kanssa. Tiinehtymistulos on alentunut huomattavasti, kun säilytysaika on ollut 24 - 28 tuntia (NISHIKAWA 1975).

Pakastamisen yhteydessä suosittelit PACE ja SULLIVAN (1975) glyserolipitoisuudeksi 2 % ja NISHIKAWA (1975) 4 - 5 %.

Glyserolin vaikutusajalla ei ole todettu olevan erikoista merkitystä sperman sulatuksen jälkeiseen liikkuvuuteen (NISHIKAWA 1975).

Kuusi tuntia ovulaation jälkeen suoritettut siemennykset ovat vielä johtaneet tiinehtymiseen (MARTIN ja KLUG 1979).

Pakastesiemennyksessä on havaittu korkeampi sikiön varhaiskuolemaprosentti kuin astutuksessa (TISCHNER 1975)(laimennus LCCY-menetelmällä).

Alustavissa tutkimuksissa on havaittu, että pakastesiemennettyjen tammojen alkioiden koko on keskimäärin pienempi kuin astutettujen tammojen alkioiden koko (TISCHNER 1979).

Ns. ongelmatammojen osuuden on havaittu vaikuttavan siemennystulokseen (KLUG ym. 1979).

OMAT TUTKIMUKSET

Suomessa on alustavia hevosten keinosiemennystutkimuksia suoritettu vuodesta 1965 Valtion hevosjalostuslaitoksella. Muutamille tammoille suoritettiin onnistuneita tuorespermasiirtoja. Vuonna 1967 on tehty oriin sperman pakastamiskokeita, tällöin on kuitenkin rajoitettu tutkimaan siittiöiden liikkuvuutta eri laimennusteissa pakastamisen jälkeen. Pakastespermalla on tehty vain joitakin tuloksettomia tamman siemennysyrityksiä (SOINTU 1968).

Tämän tutkimuksen päätarkoituksena oli selvittää pakastesiemennyksen onnistumismahdollisuuksia Suomen olosuhteissa. Tuloksia verrattiin astutustuloksiin niin siittola- kuin kenttäolosuhteisakin. Ohessa tehtiin havaintoja myös tuoresiemennyksen käyttömahdollisuuksista ja oriin sperman laadusta ja määrästä. Tärkeimmän osan aineistosta muodostivat Valtion hevosjalostuslaitoksen hevoset.

1. ASTUTUKSEN JA PAKASTESIEMENNYKSEN VERTAILU SIITTOLAOLOSUHTEISSA

1.1 Aineisto ja menetelmät

1.1.1 Oriit

Vuosina 1973-79 kerättiin Valtion hevosjalostuslaitoksella spermaa 25 suomenhevos- ja 6 lämminverioriilta. Tutkittuja spermannoksia oli yhteensä 100 kpl. Suurin osa spermasta kerättiin käyttämällä keinoemätintä, jonka toiseen päähän on kiinnitetty kokoojapullo. Osa oriiden n:o 18, 19 ja 20 (Taul. 9) spermasta

kerättiin avoimella keinoemättimellä (fraktiointimenetelmä). Keruuvälit olivat sattumanvaraisia. Mukana olleista oriista oli osa Valtion hevosjalostuslaitoksen ja osa yksityisten omistamia.

Taulukko 9. Sperman keruu- ja käyttötiedot pakaste- ja tuoresiemennyksiin vuosilta 1973, 1974 ja 1979. Alle viivatut oriit olivat mukana vertailukokeessa.

n:o	O r i i n		synt. vuosi	S p e r m a n		Pakastesiemennyksiin käytettyjä eriä	Tuoresiemennyksiin käytettyjä eriä
	nimi	rotu		otto-kertoja	pakastuskertoja		
1	<u>Uskoton</u>	sh	1954	10	6	5	4
2	<u>Pyräys</u>	sh	1967	12	11	7	0
3	<u>Eriilo</u>	sh	1950	12	10	6	1
4	<u>Vetori</u>	sh	1963	3	3	3	0
5	Syrius	lv	1967	6	2	2	4
6	Gerry Hannover	lv	1959	9	2	1	5
7	<u>Vekkuli</u>	sh	1964	4	0	0	0
8	Ohjus	sh	1966	2	-	-	1
9	Ponte	sh	1967	2	-	-	2
10	Poika-Puhe	sh	1971	1	-	-	1
11	Fligth Song	lv	1956	2	2	1	-
16	Vieteri	sh	1967	2	2	2	-
17	Uski	sh	1971	4	4	2	-
18	Vesku	sh	1972	3 + 6 ^{x)}	6	1	3
19	Saari	sh	1969	3 ^{x)}	3	2	-
20	Jonne	sh	1960	3 + 3 ^{x)}	1	1	2

x) Fraktioidusti kerätty sperma

1.1.2 Sperman laadun arvostelu

Sperman ottamisen jälkeen poistettiin siivilöimällä sideharsoitoksen avulla limainen plasmaosa, jonka jälkeen mitattiin ejakulaation tilavuus. Tiheys tutkittiin vuosina 1973-74 vertaamalla spermanäytettä standardisarjoihin silmämääräisesti. Vuonna 1979 on tiheyden määrittämisessä käytetty Thoma-Neulaskukammiota.

Liikkuvuus arvioitiin +35 - +37 °C:n lämpötilassa ennen pakastusta ja laimennusta sekä sulatuksen jälkeen mikroskopoimalla. Sperma pakastettiin LCCY-menetelmällä (LIITE 3). Sperman laatutiedoista laskettiin keskiarvot ja hajonnat.

1.1.3 Tammat

Valtion hevosjalostuslaitoksen tammoista saatiin kokeeseen kaikkiaan 35, joista vuonna 1973 siemennettiin pakastespermalla 17 ja astutettiin 15. Seuraavan vuonna astutus- ja siemennysryhmät vaihdettiin. Tällöin astutettiin 16 ja siemennettiin 18 tammaa. Pakastesiemennyksiä tehtiin siis yhteensä 35 tammalle.

Alunperin tamma-aineisto jaettiin neljän oriin (1, 2, 3, 7) kesken niin, että kaikille tuli sekä astutus- että siemennysryhmä. Nämä piti seuraavana vuonna vaihtaa keskenään. Kuitenkin oriin n:o 7 sperma ei sopinut pakastettavaksi alhaisen siittiötiheydensä vuoksi. Koska oriilla oli jo ehditty astuttaa koetammoja, jouduttiin koejärjestelyjä muuttamaan niin, että myöskin sen siemennysryhmän tammastutettiin. Seuraavana vuonna kaikki oriilla n:o 7 astutetut tammastutettiin sen tilalle valitulla oriilla n:o 4. Toisin sanoen, oriin 7 ainoa koeryhmä on vuoden 1973 astutusryhmä ja oriin 4 ainoa ryhmä on siemennysryhmä vuodelta 1974.

Koska kokeeseen pyrittiin saamaan mahdollisimman suuri tamma-aineisto, jouduttiin kokeeseen ottamaan kaikki mahdolliset hevosjalostuslaitoksen siitostammat. Tästä oli seurauksena, että n. 1/3 tammoista olikin vaikeasti tiinehtyviä eli ns. ongelmatammoja. Tämä vaikeutti kokeen teknistä suoritusta sekä tulosten käsittelyä. Tulosten tarkastelua varten on tamma-aineisto jälkeinpäin luokiteltu viiteen eri luokkaan; iän, aikaisempien tiinehtymisten ja sukuelintoimintojen perusteella seuraavasti:

- Luokka 1a: Terveet tammast, ikä 5 - 18 v
- " 1b: Terveet, imettävät tammast, ikä 5 - 18 v
- " 2: Nuoret, aikaisemmin astuttamattomat tammast, ikä 4 v
- " 3: Vanhat tammast, ikä yli 18 v
- " 4: Sairaast ja kliinisesti tai bakteriologisesti epäilyttävät tammast

Ryhmiin 3 ja 4 tammoja voidaan pitää ns. ongelmatammoina. Ryhmään 2 tammojen munasarjatoiminta oli hyvin epäsäännöllistä johtuen niiden nuoresta iästä.

Aineiston pienuuden lisäksi vaikeutti kokeen suorittamista se, ettei tammoja osattu luokitella aikaisempia tiinehtymistietoja hyväksi käyttäen.

Taulukko 10. Tammojen jakaantuminen eri tiinehtymisluokkiin pakastesiemennys- ja astutusryhmissä vuosina 1973 ja 1974.

Luokka	Pakastesiemennysryhmä			Astutusryhmä		
	1973	1974	Yht.	1973	1974	Yht.
1a	7	5	12	2	10	12
1b	3	6	9	8	3	11
2	5	0	5	1	0	1
3	0	2	2	1	0	1
4	2	5	7	4	2	6
Yht.	17	18	35	16	15	31

Lukuunottamatta luokkaa 2 ovat tammot jakaantuneet tasaisesti eri luokkien sisällä astutus- ja pakasteryhmissä, vuosien välillä sensijaan on suuria eroja.

1.1.4 Siemennysajankohdan määrittäminen

Kiimaisten tammojen munasarjat tutkittiin päivittäin, kiiman loppuvaiheessa kaksi kertaa päivässä (aamulla ja illalla) oikean siemennysajankohdan määrittämiseksi sekä siemennyksen jälkeen ovulaation toteamiseksi. Astutusryhmässä ei kiimakontrolli ollut yhtä tarkka. Kiimatarkkailu perustui ulkoisiin havaintoihin ja mikäli epäselvyyttä esiintyi, suoritettiin joskus rektaalitutkimus kiiman alkuvaiheessa, tavallisesti kuitenkin vasta loppuvaiheessa.

Positiivisen tiinehtymisennusteen sai siemennys, joka oli suoritettu korkeintaan 16 tuntia ennen tai enintään kuusi tuntia ovulaation jälkeen edellyttäen, että siemennys oli onnistunut myös teknisesti.

1.2 Tulokset ja tulosten tarkastelu

1.2.1 Siemennys- ja astutuskerrat

Siemennyksiä suoritettiin 35 tammalle kaikkiaan 102 kpl, keskimäärin 2.9 siemennystä/tamma. Ensimmäiseen kiimaan siemennettiin tammät keskimäärin 1.9 kertaa (35 tammaa), toiseen kiimaan 1.8 kertaa (15 tammaa) ja kolmanteen 1.5 kertaa (yksi tamma).

Astutuksia suoritettiin vastaavasti samoille 31 tammalle yhteensä 76 ($\bar{x} = 1.7$) Ensimmäiseen kiimaan astutettiin tammät keskimäärin 1.7 kertaa (31 tammaa), toiseen kiimaan 1.8 kertaa (13 tammaa) ja kolmanteen yhden kerran (yksi tamma).

1.2.2 Positiivisen tiinehtymisennusteen saaneet pakasteryhmän tammät

Suoritetuista 35 tamman siemennyksistä epäonnistui 11. Nämä eivät saaneet positiivista ennustetta. Kyseisistä tammoista seitsemän ei ovuloinut siemennyksen jälkeen, kaksi tammaa siemennettiin liian aikaisin ja kaksi siemennystä ei onnistunut teknisesti. Koetammamateriaalista on 24 tammalla ainakin yhteen kiimaan suoritettu positiivisen ennusteen saanut siemennys, ts. n. 2/3 tammoista sai positiivisen tiinehtymisennusteen. (Taul. 11).

1.2.3 Pakastesiemennys verrattuna astutukseen

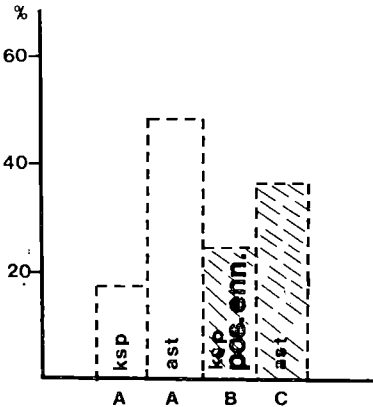
Vuosina 1973-74 siemennetyistä 35 tammasta varsoi kuusi ja astutetuista 31 tammasta varsoi 15. Varsomisprosentti siemennysryhmässä oli 17 ja astutusryhmässä 48.

Taulukko 11. Positiivisen tiinehtymisennusteen saaneiden pakaste-ryhmän tammojen jakaantuminen eri tiinehtymisluokkiin.

Tiinehtymisluokka	Pakastesiemennysryhmä		
	1973	1974	Yht.
1a	6	4	10
1b	2	5	7
2	2	0	2
3	0	1	1
4	2	2	4

	Yht. 12	12	24

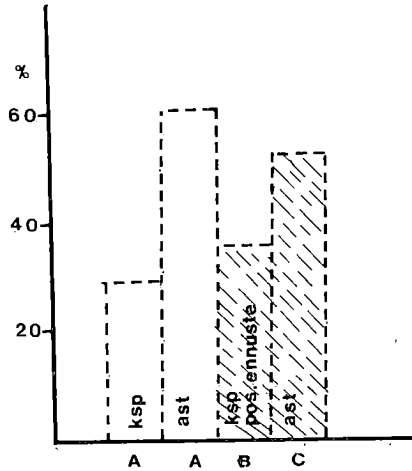
Kaikista siemennetyistä tammoista sai positiivisen tiinehtymisennusteen 24 tammaa, joista varsoi kuusi eli 25 %. Kun samoista tammoista astutettiin 22, varsoi niistä kahdeksan eli 36 %.



KUVA 9. Varsoimisprosentti pakaste- (ksp) ja astutusryhmissä (ast) koko aineistossa (A) ja positiivisen tiinehtymisennusteen saaneiden tammojen ryhmässä (B) sekä vastaavien astutettujen tammojen ryhmässä (C).

1.2.4 Pakastesiemennys verrattuna astutukseen luokissa la ja lb

Kaikista luokassa la ja lb olleista 21 pakastesiemennetystä tammasta varsoi 6 (29 %) ja astutetuista 20 tammasta varsoi 12 (60 %). Positiivisen tiinehtymisennusteen saaneista 17 tammasta varsoi 6 (35 %) ja samoista astutetuista 14 tammasta varsoi 7 (50 %).



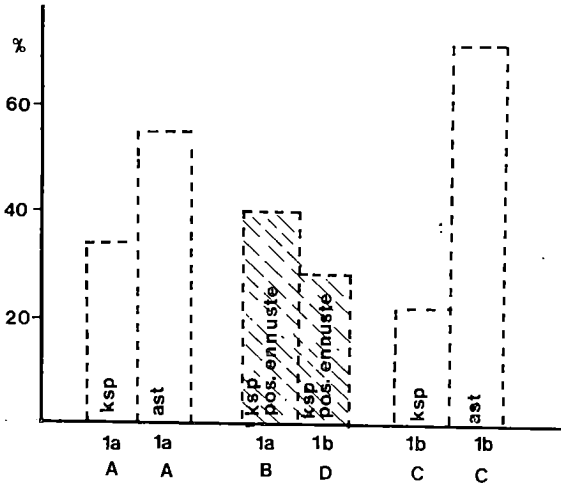
KUVA 10. Luokissa la ja lb saavutetut varsomisprosentit astutus- ja siemennysryhmissä (A) sekä positiivisen tiinehtymisennusteen saaneiden tammojen varsomisprosentti (B) ja vastaavien astutettujen tammojen varsomisprosentti (C).

1.2.5 Varsallisten ja varsattomien tammojen tiinehtymistulosten vertailu erikseen luokissa la ja lb

Pakastesiemennetyistä 12 varsattomasta tammasta, jotka kuuluivat luokkaan la, varsoi neljä tammaa. Samaan luokkaan kuuluneista 11 astutetusta tammasta varsoi 6. Positiivisen tiinehtymisennusteen saaneista varsattomista 10 pakastesiemennetystä tammasta varsoi 4.

Pakastesiemennetyistä yhdeksästä varsallisesta tammasta, jotka kuuluivat luokkaan lb, varsoi vain kaksi. Luokkaan lb ryhmitetyistä astutetuista yhdeksästä tammasta varsoi kuusi. Positiivisen

tiinehtymisennusteen saaneista pakastesiemennetyistä luokan 1b seitsemästä tammasta varsoi kaksi.



KUVA 11. Pakastesiemennyksessä ja astutuksessa saatuja varsomistuloksia kokotamma-aineiston luokissa 1a (A) ja 1b (C) sekä positiivisen tiinehtymisennusteen saaneiden pakastesiemennettyjen tammojen varsomistuloksia luokissa 1a (B) ja 1b (D).

1.2.6 Sikiön varhaiskuolemien esiintyminen

Vuoden 1973 pakastesiemennysryhmässä havaittiin neljä sikiön varhaiskuolemaa, näistä kaksi tapahtui luokassa 1a, yksi luokassa 1b ja yksi luokassa 4.

Vastaavasti vuoden 1974 astutusryhmässä todettiin näillä samoilla neljällä tammalla ja lisäksi yhdellä muulla tammalla sikiön varhaiskuolema. Luokassa 1a todettiin neljä tapausta ja luokassa 4 yksi sikiön varhaiskuolema.

Vaikka varhaiskuolemaprosentti (11) on alle suomenhevosilla havaitun keskimääräisen luvun (16 %) (MOBERG 1972), on mahdollista, että ainakin osassa tapauksia on kysymyksessä tulkintavirhe tiineyden varhaistoteamisessa. Tällainen on voinut aiheutua esim. tammojen sukuelinten sairaalloisesta tilasta. Tähän viittaa tapaus-ten toistuminen.

1.2.7 Pakastesiemennystulosten tarkastelu

Kaikista siemennetyistä tammoista sai positiivisen tiinehtymisen-
nusteen kaksi kolmasosaa (24/35), näistä vielä kolmasosa kuului
nuorten tai ns. ongelmatammojen joukkoon (7/24). Näinollen
17 tammalla arvioitiin olevan hyvät tiinehtymismahdollisuudet.
Kuitenkin näistä varsoi vain kuusi tammaa (35 %). Samoista tam-
moista astutettiin 14 ja näistä varsoi puolet. Tämä osoittaa,
että pakastesiemennyksellä saavutettiin huomattavasti huonompi
varsomistulos kuin astutuksella, vaikka tamma-aines olikin valit-
tua.

Koko aineistossa oli varsomisprosentti pakastesiemennysryhmässä
17 ja astutusryhmässä 50, tämä kuvanee pakastemenetelmän epävar-
muutta, vaikka aineiston pienuuden vuoksi tulokset ovatkin epä-
varmoja.

Tässä työssä osoittautuivat heikoimmin tiinehtyviksi nuoret tam-
mat, joiden sukuelintoiminnot eivät olleet vakiintuneet sekä yli-
ikäiset ja sairaat tammammat.

Jotta voitaisiin välttyä turhalta työltä, jota juuri ns. ongelma-
tammammat aiheuttavat, pitäisi tammojen valinnassa käyttää hyväksi
niiden aikaisempia tiinehtymistietoja. Jo säännöllisen kiiman
omaavat tammammat vaativat tarkan ja työlään follikkelikontrollin
optimaalisen siemennysajankohdan löytämiseksi, ja silti tulos
niidenkin kohdalla on epävarma.

1.2.8 Sperman laatuominaisuudet

Koko aineistosta saadut tilavuus-, tiheys- ja liikkuvuusarvot vastaavat niitä keskiarvoja, joita kirjallisuudessa on esitetty (Taulukko 12).

Suomenhevosen ja lämminverihevosensperman tiheys ja liikkuvuus ovat keskimäärin saman suuruiset, ainoastaan sperman tilavuudessa ja siitä johtuvassa siittiöiden kokonaismäärässä/ejakulaatio on eroa (Taulukot 12 ja 13). Kuitenkin suuret hajonnan arvot osoittavat, että aineisto on ollut heterogeeninen.

Taulukko 12. Vuosina 1973-79 suomenhevosoriilta kerätyn sperman laatuarvostelutiedot (21 oritta, ottokertoja kaikkiaan 73).

Ominaisuus	Keskiarvo	Hajonta	Min.	-	Max.
Tilavuus, ml	101	62	20	-	450
Tiheys, milj./ml	121	101	5	-	500
Liikkuvuus, %	45	17	5	-	80
Eläviä siittiöitä, milj./ml	56	47	2	-	180
Eläviä siittiöitä koko ejakulaatissa, $\times 10^9$	6	8	0	-	63

Taulukko 13. Vuosina 1973-79 lämminverioriilta kerätyn sperman laatuarvostelutiedot (6 oritta, ottokertoja kaikkiaan 15).

Ominaisuus	Keskiarvo	Hajonta	Min.	-	Max.
Tilavuus, ml	57	21	20	-	90
Tiheys, milj./ml	123	111	10	-	400
Liikkuvuus, %	51	13	20	-	70
Eläviä siittiöitä, milj./ml	63	57	4	-	175
Eläviä siittiöitä koko ejakulaatissa, $\times 10^9$	4	4	0	-	11

Fraktiointimenetelmällä kerätyn sperman tilavuus on pienentynyt ja tiheys kohonnut verrattuna sperman arvoihin, jotka on saatu käyttämällä keinoemätintä, jonka päähän kokoojapullo on kiinnitetty (Taulukot 12 ja 14). Saadut alustavat tulokset osoittavat, että fraktioimalla sperma ja kiinnittämällä huomiota sperman keruutiheyteen, voidaan sperman tiheyttä huomattavasti parantaa.

Taulukko 14. Vuonna 1979 fraktioidusti kerätyn sperman laatu-
arvostelutiedot kolmelta suomenhevosoriilta, otto-
kertoja 12.

Ominaisuus	Keskiarvo	Hajonta	Min.	-	Max.
Tilavuus, ml	32	15	10	-	60
Tiheys, milj./ml	250	210	5	-	580
Liikkuvuus, %	31	19	5	-	50
Eläviä siittiöitä, milj./ml	55	57	2	-	180
Eläviä siittiöitä koko ejakulaatissa, $\times 10^9$	2	3	0		11

Eri oriyksilöiden kuten myös oriin omassa spermantuotantokyvyssä esiintyvät suuretkin vaihtelut johtuvat oletettavasti osaksi ulkoisista tekijöistä kuten astutus- ja siemenenottotiheydestä sekä myös ruokinnasta ja liikunnasta (Taulukko 15). Saadut arvot kuvanevat sitä keskimääräistä vaihtelua sperman määrässä ja laadussa, jota esiintyy astutuskauden aikana.

1.2.9 Sperman laadun vaikutus tiinehdyttämiskykyyn

Laatuarvostelussa korkein siittiötiheys oli oriilla n:o 4 ja 5 (Taulukko 16), ja sulatuksen jälkeinen liikkuvuus oli myös hyvä. Kyseisten oriiden pakastespermalla siennettiin yhteensä 13 tammaa, joista positiivisen tiinehtymisennusteen sai seitsemän, yksikään tamma ei kuitenkaan tiinehtynyt.

Taulukko 15. Pakastesiemennyskokeessa mukana olleiden oriiden sperman laatuarvostelu.

Ominaisuus	Ori n:o						\bar{x}	s
	1	2	3	4	5	6		
Tilavuus (siivilöity)	160	107	81	102	68	73	99	34
Tiheys, milj./ml	111	138	43	233	250	68	141	82
Liikkuvuus ennen pakastusta, %	60	46	38	53	60	20	46	23
Eläviä siittiöitä ennen pakastusta $\times 10^6$ /ml	66	71	16	123	150	34	77	51
Liikkuvuus sulatuksen jälkeen, %	30	25	21	30	20	33	27	5
Eläviä siittiöitä sulatuksen jälkeen, $\times 10^6$ /ml	37	20	20	12	50	40	30	21
Eläviä siittiöitä koko ejakulaatissa ennen pakastusta, $\times 10^6$	13	7	1	12	10	3	8	5

Taulukko 16. Pakastesiemennyskokeessa mukana olleiden oriiden pakastukseen käytetyn sperman laatuarvostelutiedot vuosilta 1973-74. Suluisissa olevilla oriilla ei ole astutusryhmää.

Ominaisuus	Ori n:o						\bar{x}	s
	1	2	3	4	(5)	(6)		
Tilavuus (siivilöity)	130	118	64	102	68	70	92	29
Tiheys, milj./ml	135	150	61	233	250	100	155	74
Liikkuvuus ennen pakastusta, %	39	47	39	53	60	20	46	45
Eläviä siittiöitä ennen pakastusta, $\times 10^6$ /ml	77	78	24	123	150	20	79	44
Liikkuvuus sulatuksen jälkeen, %	28	20	31	30	20	40	28	14
Eläviä siittiöitä sulatuksen jälkeen, $\times 10^6$ /ml	36	30	14	70	50	40	40	25
Varsomis-% pakastesiem.	11	27	29	0	0	20		
Varsomis-% astutuks.	44	58	40	40				

Alhaisin siittiötiheys oli oriilla n:o 3 (Taulukko 16), sulatuk-
sen jälkeinen liikkuvuus oli kuitenkin hyvä. Lisäksi liikkuvuuden
aleneminen sulatuksen jälkeen oli pieni, vain 8 %. Ko. oriilla
siemennetyistä seitsemästä tammasta sai positiivisen tiinehtymis-
ennusteen neljä tammaa, joista kaksi tammaa varsoi (Taulukko 17).

Näiden tulosten perusteella näyttää siltä, ettei tässä mitatuilla
laatuominaisuuksilla olisi vaikutusta LCCY-menetelmällä pakaste-
tun sperman hedelmöittämiskykyyn. Aineiston pienuuden vuoksi
tulos on erittäin epävarma.

Taulukko 17. Pakastesiemennettyjen tammojen varhais- ja lopulli-
set tiinehtymiset orikohtaisesti.

Ominaisuus	Ori n:o					
	1	2	3	4	5	6
Siemennettyjä tammoja	9	13	7	6	7	5
Siemennetyt tammät, jotka ovat saaneet posit. ennust	6	9	4	5	2	1
Tiinehtyneet tammät	4	4	2	0	0	1
Sikiön varhaiskuolemia	3	1	-	-	-	-
Syntyneitä varsoja	1	3	2	0	0	1

Verrattaessa eri oriiden varsomisprosentteja koko aineistossa
pakasteryhmässä on prosentti vaihdellut 0 - 29 ja vastaavasti
astutusryhmässä on 40 - 58 prosentin välillä (Taulukko 16).

Luokissa la ja lb koko aineistossa pakasteryhmässä on varsomis-
prosentti ollut 0 - 67 ja astutusryhmässä 33 - 70.

1.2.10 Tiinehtymistuloksen aleneminen v. 1974

Positiivisen tiinehtymisennusteen saaneista tammoista varsoi 1973
pakastesiemennyksestä 33 % ja vuonna 1974 18 %. Vastaavasti vuonna

1973 samoille tammoille tehdyistä astutuksista johti varsomiseen 55 % ja vuonna 1974 18 %. Tiineysprosentin voidaan havaita alentuneen myös niillä kokeeseen kuulumattomilla tammoilla, jotka oli astutettu koeoriilla. Vuonna 1973 oli koeoriiden tiinehdyttämisprosentti astutuksessa 55 (astutettuja tammoja 117), vuonna 1974 samojen oriiden tulos oli 30 % (tammoja 151).

Vuosien välillä olevan eron syyksi voidaan epäillä sattuman lisäksi myös mm. hevosjalostuslaitoksessa vallinnutta hevosinfluenssaa kuin myös lisääntyntä työpainetta (kiimakontrollissa oli mukana liian vähän henkilökuntaa). Joidenkin oriiden astutusrasitus oli ehkä myös liian suuri.

2. MUUT SIEMENNYSKOKEET

2.1 Kenttäolosuhteissa suoritettut pakastesiemennykset

2.1.1 Tamma- ja oriaineisto

Valtion hevosjalostuslaitoksen toimesta tehtiin vuoden 1974 aikana 40 pakastesiemennystä kentällä yksityisten omistamille tammoille. Suomenhevostammoja siemennettiin 28 ja lämminverisiä 12. Siemennykset suoritettiin neljän suomenhevosen (n:ot 1, 2, 3, 4) ja kahden lämminverihevosen (n:ot 5 ja 6) spermalla. Ts. oriit olivat samoja kuin pakastesiemennyskokeessa käytetyt (Taulukko 9).

Tammojen munasarjat tutkittiin rektalisoimalla, ja ne, joilla oli kimmoisa tai pehmeä, keskisuuri tai suuri (3 - 5-asteinen) follikkeli, saivat positiivisen tiinehtymisennusteen. On kuitenkin todennäköistä, että korkeintaan 1/3 näistä tammoista on saattanut ovuloida edes vuorokauden sisällä. Koska tammojen omistajat joutuivat maksamaan matkakustannukset, lähes kaikki tammot jouduttiin siementämään, vaikka tamma ei ollut hyvässä kiimassa.

Kokeessa mukana olleet tammot siemennettiin keskimäärin 1.1 kertaa/kiima. Ts. samaan kiimaan suoritettiin harvoin uusinta.

2.1.2 Varsomistulokset

Siemennetyistä 40 tammasta sai positiivisen tiinehtymisennusteen 18, joista varsoi kolme tammaa. Ts. koko aineiston varsomisprosentti oli 7.5 ja positiivisen ennusteen saaneiden tammojen varsomisprosentti oli 16.7. Tulos vastasi siittolassa saatua kaikkien tammojen tiinehtymistulosta. Tämä osoittanee, ettei pakastesiemennys onnistu samalla lailla kenttäolosuhteissa kuin siittolassa.

Suurin syy tähän lienee huonossa kiimakontrollissa ja siitä aiheutuvassa väärässä siemennysajankohdassa. MERKT ja KLUG (1976) ovat todenneet, että tammojen on kenttäolosuhteissakin oltava vähintään päivittäisessä follikkelikontrollissa toivotun tuloksen saavuttamiseksi.

2.2 Siittolassa ja kenttäolosuhteissa suoritettut tuoresiemennykset

2.2.1 Tamma- ja oriaineisto

Valtion hevosjalostuslaitoksessa suoritettiin vuosina 1973 ja 1974 kiireisimpänä astutuskautena lähinnä oriiden liikarasituksen välttämiseksi 16 tammam tuoresiemennys. Siemennetyistä tammoista oli noin puolet ns. ongelmatammoja sukuelintoimintojensa tai aikaisempien tiinehtymistietojensa perusteella. Spermaa siemennyksiä varten kerättiin neljältä oriilta (n:ot 1, 2, 6 ja 10) (Taulukko 9).

Samoina vuosina suoritettiin myös kentällä yhdeksän tuorespermasiemennystä. Sperma siirrettiin termospullossa jäädyttämättömänä ja laimentamattomana. Kuljetusaika oli n. tunti. Siementä kerättiin neljältä oriilta (n:ot 5, 6, 8 ja 9) (Taulukko 9). Rektalisoimalla tutkitut tammam saivat positiivisen tiinehtymisennusteen mikäli niillä oli 3 - 5-asteinen follikkeli, tai jos follikkeli todettiin juuri puhjenneeksi.

2.2.2 Varsomistulokset

Hevosjalostuslaitoksella siemennetyistä 16 tammasta sai positiivisen tiinehtymisennusteen 10, joista varsoi viisi, eli 50 %. Koko aineistossa varsomisprosentti oli siis 30 %.

Maakunnassa suoritetuista yhdeksästä siemennyksestä johti varsomiseen viisi, joten varsomisprosentiksi saatiin 55. Näistä tammoista sai positiivisen tiinehtymisennusteen seitsemän, joista varsoi viisi eli 71 %.

Taulukko 18. Tuoresiemennyskokeista saadut tulokset siittola- ja kenttäolosuhteissa vuosina 1973-74.

Ori n:o	Tammoja/ ori	Positiivisen tiinehtymis- ennusteen saa- neiden tammojen luku	Varso- neita tammoja	Varsomis-%	
				Kaikki tammat	Posit. ennust. saaneet
S i i t t o l a s s a					
1	8	4	3	38	75
2	2	2	1	50	50
10	1	1	1	100	100
6	5	3	0	0	0
K e n t t ä o l o s u h t e i s s a					
5	4	3	1	25	33
6	3	2	2	67	67
8	1	1	1	100	100
9	1	1	1	100	100
Yhteensä	25	17	10	40	53

JOHTOPÄÄTÖKSET

On ilmeistä, ettei kaikilla tammoilla ole samoja mahdollisuuksia tiinehtyä varsinkaan pakastesiemennyksestä. Tammojen aikaisempien tiinehtymistietojen ja sukuelintoimintojen selvittäminen auttaa karsimaan ns. ongelmatammat. Tämä helpottaa työtä ja parantaa tiinehtymistulosta.

Astutettujen tammojen tuloksiin verrattuna pakastesiemennettyjen tammojen varsomisprosentti jäi alhaiseksi. Kenttäolosuhteissa tulos oli vielä huonompi kuin siittolassa saavutettu. Tämä osoittaa huolellisen kiimatarkkailun merkityksen pakastesiemennyksen yhteydessä.

Tuoresiemennyksellä (välitön siirto) saadut tulokset olivat yhtä hyvät kuin astutustuloskin. Myös tunnin sisällä suoritettut tuoresperman siirrot onnistuivat hyvin.

Sperman laadusta saadut tiedot vastasivat kirjallisuudessa esitettyjä keskiarvoja. Saadut hajonnan arvot olivat suuria, mikä kuvanneekin suuria eroja oriiden välillä sekä myöskin eroja oriyksilöiden omassa spermantuotannossa. Erot johtunevat suureksi osaksi ulkoisista tekijöistä kuten astutusrasituksesta ja sperman keruutiheydestä.

Tässä tutkimuksessa arvioiduilla sperman laatuominaisuuksilla ei havaittu olevan vaikutusta tiinehtymistuloksiin.

On huomioitava, että kaikki tässä tutkimuksessa käytetyt aineistot olivat pieniä ja hajanaisia, eivätkä oikeuta varmojen johtopäätösten tekoon. Tuloksia voitaneekin käyttää apuna tulevien kokeiden suunnittelussa.

KESKUSTELUA

Hyvin järjestetyllä ja valvotulla keinosiemennystoiminnalla on ollut lähes vallankumouksellinen merkitys jalostustyössä yleensä. Myös hevosten keinosiemennyksen tutkimustoimintaa olisi kehitettävä ja laajennettava voimakkaasti käytäntöön soveltuvan menetelmän kehittämiseksi.

Tällä hetkellä ainoastaan muutamat yksityiset oriin omistajat käyttävät keinosiemennystä tuoreen sperman jakamiseksi tammoille lähinnä infektiovaaran vähentämiseksi. Soveltava keinosiemennystutkimus on keskittynyt Valtion hevosjalostuslaitokselle.

Käytännön keinosiemennysorganisaation luominen meille lienee ennenaikaista, koska pakastesiemennyksellä saadut tulokset ovat olleet huonoja koeolosuhteissakin eikä tuoresperman siirtomahdollisuuksia ole riittävästi tutkittu. Kuitenkin lienee mahdollista melko nopeasti kehittää toimiva organisaatio hevosten keinosiemennystä varten.

Mikäli hevosia ei keinosiemennyksen teknisen toteuttamisen vuoksi tarvitse koota yhteen, voitaisiin tutkia yhteistyömahdollisuuksia nautakarjan keinosiemennysorganisaation kanssa. Täydentämällä seminologien koulutusta hevosten lisääntymisfysiologialla ja tammojen keinosiemennystekniikalla saataisiin nopeasti ammattitaitoista henkilökuntaa kenttätöihin. Mikäli tammät täytyy koota isompiin ryhmiin keinosiemennyksen mahdollistamiseksi, voisi vaihtoehto olla raviratojen yhteydessä toimivat vierastallit (kesäaika) ja klinikat eläinlääkärihenkilökuntineen.

TIIVISTELMÄ

Tutkimuksen päätarkoituksena oli selvittää pakastesiemennyksen onnistumista Suomen olosuhteissa (LCCY pakastamismenetelmä). Saatuja siemennystuloksia verrattiin astutustuloksiin siittola- ja kenttöolosuhteissa.

Valtion hevosjalostuslaitoksen siitokseen valituista 35 tammasta 17 siemennettiin ja 15 astutettiin vuonna 1973. Seuraavana vuonna astutus- ja siemennysryhmät vaihdettiin keskenään, pyrittiin siis vertailuryhmän saamiseen. Tällöin siemennettiin 18 tammaa ja astutettiin 16 tammaa.

Pakastesiemennyksistä 35 tammasta varsoi vain kuusi, sensijaan astutetuista 31 tammasta varsoi noin puolet eli 15. Tämä vastaa likimain suomenhevosen keskimääräistä tiinehtymistulosta.

Vuonna 1974 suoritettiin kenttöolosuhteissa 40 pakastesiemennystä. Näistä varsoi vain kolme. Kiimatarkkailun suorittaminen oli puutteellista kenttöolosuhteissa, mistä vielä siittolaolosuhteisakin saatua alhaisempi tiinehtymistulos todennäköisesti johtui.

Vuosina 1973-79 tutkittiin lähes sata ejakulaattia (20 oritta). Eri oriyksilöiden välillä kuten myös oriin omassa spermantuo- tannossa havaittiin suurta vaihtelua sekä määrässä että laadussa. Tämän voidaan ajatella johtuvan lähinnä ulkoisista tekijöistä, kuten mm. astutusrasituksesta ja siemenen keräämistihydestä.

Kaikki käytetyt aineistot olivat pieniä ja hajanaisia eikä niiden perusteella voida tehdä varmoja johtopäätöksiä. Kuitenkin koe osoitti, että pakastesiemennysmenetelmän käyttäminen on työlästä ja tulos on vielä melko epävarma. Pakastesiemennyksen tuomat monet edut puolustavat kuitenkin menetelmän edelleenkehittä- mistä.

KIIITOKSET

Työni valmistuttua minulla on mieluinen tehtävä kiittää professori Mikko Varoa, jonka aloitteesta agronomi Osmo Aalto, MMK Matti Ojala ja allekirjoittanut pääsivät tieteellis-teknisen yhteistyön puitteissa vierailemaan Neuvostoliitossa v. 1973. VNIİK'n hevostutkimuslaitoksella oli mahdollisuus tutustua hevososen pakastesiemennykseen. Samana keväänä aloitettiin Ypäjällä Valtion hevosjalostuslaitoksella siemennyskokeet Neuvostoliitosta saadulla menetelmällä.

Kiitän myös professori Varoa ja professori Ulf Lindströmiä saamastani ohjauksesta sekä professori Ralph Mobergia opettavasta yhteistyöstä. Valtion hevosjalostuslaitokselle ja sen henkilökunnalle, erityisesti johtajille Osmo Aalto ja Leea Rauvala sekä tallimestareille haluan esittää kiitokset saamastani avusta ja tuesta.

KIRJALLISUUSLUETTELO

- AAMDAL, J. 1979. Fertility and infertility in stallions. EAAP (European Association of Animal Production), Harrogate, moniste, 4 s.
- ALIEV, A. 1975. Usovershenstvovannaya tekhnologiga zamorazivaniya spermy. Konievodstvo i konnyi sport 1975, 9: 13.
- ALLEN, W.R., BOWEN, C.J., FRANK, L.B., JEFFCOTT, L.B. & ROSSDALE, P.D. 1976. The current position of A.I. in horse breeding. Equine vet. J. 8: 72-74.
- ANDERSSON, J. 1945. The semen of animals and its use for artificial insemination. (Ref. Bader, H. & Hüttenrauch, O. 1966).
- BADER, H. von & HÜTTENRAUCH, O. 1966. Fraktionierte Ejakulatgewinnung beim Hingst. Tierärztl. Wschr. 21: 547-548.
- BADI, M., O'BRYNE, T.M. & CUNNINGHAM, E.P. 1978. The incidence of embryonic loss in thoroughbred mares. EAAP, Stockholm 1978, moniste, 4 s.
- BANE, A. 1976. Konferens om hästsemin. Svensk Husdjursskötsel Meddelande 1976, 81: 11-14.
- BELLONJE, P.C. & NIEREK, C.H. van 1975. A review of the influence of nutrition upon the estrus cycle and early pregnancy in the mare. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 167-169.
- BERLINER, V. 1947. The artificial insemination of farm animals. New jersey. (Ref. Bader, H. & Hüttenrauch, O. 1966).
- BIELANSKI, W. 1975. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 19-24.
- & KACMARSKI, F. 1971. Ultrastructure changes in the heads of stallion spermatozoa after freezing in liquid nitrogen. Bull. Acad. pol. Sci. CI. II. Sci. Biol. 19: 139-144.
- & KACMARSKI, F. 1979. Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility J. Reprod. Fert., Suppl. 27: 39-45.
- BLANDAU, R.J. 1961. Biology of eggs and implantation. Sex and Internal Secretions. Vol. 2. (Ref. Niemi, M. 1976).
- BLOM, E. 1949. Über Spermauntersuchungsmethoden beim Bullen. Wien tierärztl. Wschr. 36: 49-168.

- DARENIUS, K. 1981. Djupfrysning av hingstesperma. Ridsport 1981, 13:9.
- EVANS, J. 1977. The Horse. Reproduction in the horse, p. 351-398. San Francisco.
- GÖTZE, R. 1949. Besamung und Unfruchtbarkeit der Haustiere. Hannover. (Ref. Bader, H. & Hüttenrauch, O. 1966).
- HUGHES, J.P., STABENFELDT, G.H. & EVANS, J.W. 1972. Clinical and endocrine aspects of the estrus cycle of the mare. Proc. A.A.E.P.: 119. (Ref. Evans, J. 1977).
- , STABENFELDT; G.H. & EVANS, J.W. 1975. The estrus cycle of the mare. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 161-166.
- HYLAND, H. & BRISTOL, F. 1979. Synchronization of estrus and timed insemination of mares. J. Reprod. Fert., Suppl. 27: 251-255.
- IRWIN, C.F.P. 1975. Early pregnancy testing and its relationship to abortion. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 485-488.
- JOKINEN, L. 1980. IX kansainvälinen keinosiemnyskongressi, Madrid, 1980. Matkaraportti, 17 s. Tampereen Ksy, Pirkkala.
- JONES, W.E. 1973. Genetics of the horse. p. 74-78.
- KLUG, E. 1977. Übertragung von tiefgeriersamen beim Pferd- Auswahl von Hengsten und zyklussteuerende massnahmen bei der Stuten. EAAP, Brüssel 1977, moniste, 9 s.
- , MARTIN, J.C. & BREDE, D. 1979. Besamungstation im Landgestüt Celle Ergebnisbericht aus der Saison 1978. Hannoversches Pferd 1979, 58-59.
- KNUDSEN, O. 1971. Har ni ston som är svåra att få dräktiga? Trav och Galoppronden. Vinternummer 1971.
- KOSNIAK, K. 1975. Characteristic of the successive jets of ejaculated semen of stallions. J. Reprod. Fert., Suppl. 32: 59-61.
- McKENNIE, F.F. 1940. Collecting and fractinating equine semen. Bericht über den II: tierärztz. Kongress. für künstl. Besamung in Foggia. p. 212-214. Milano. (Ref. Bader, H. & Hüttenrauch, O. 1966).
- MARTIN, J.C. & KLUG, E. 1979. Zur Samenübertragung beim Pferd. Spermakonservierung in Kunststoffrörchen. Der Praktische Tierarzt. 3: 196-204.
- MAUER, R.R. STRANZINGER, G.F. & PAUFLER, S.K. 1976. Embryonic development in rabbits after insemination with spermatozoa stored at 37,5 or -196°C for various periods. J. Reprod. Fert. 48: 43-49. (Ref. Tischner, M. 1979).

- MERKT, H. 1966. Fohlenrosse und Fruchtresorption. Zuchthygiene 1: 102-108.
- & KLUG, E. 1976. Fortpflanzungsprobleme im Rahmen der künstlichen Besamung beim Pferd. Dtsch. Tierärztl. Wsch. 12: 539-542.
 - , KLUG, E., HEINZE, H. & MARTIN, J.C. 1978. Aktuelles zur Samenübertragung beim Pferd. Tierärztl. Prax. 6: 345-350.
 - , JACOBS, K.-O., KLUG, E. & AUKES, E. 1979. An analysis of stallion fertility rates (foals born alive) from the breeding documents of the Landgestut Celle over a 158 year period. J. Reprod. Fert., Suppl. 27: 73-77.
- MOBERG, R. 1972. Untersuchungen über das Auftreten und die Ätiologie von embryonalen Fruhtod bei der Stute. VII Internationaler Kongress für tierische Fortpflanzung, München. 1: 779-784.
- NAUMENKOV, A. & ROMANKOVA, N. 1970. Semen diluent. Konievodstvo i konnyi Sport. 1970., 5: 23. (Ref. Tischner, M. 1979).
- , ROMANKOVA, N.K. & FOMINA, E.L. 1977. Improvement of method of long preservation of stallion sperm in deepfrozen state. EAAP, Brüssel 1977, moniste, 10 s.
 - & ROMANKOVA, N. 1978. Freezing stallion semen. Konievodstvo i konnyi Sport. 1978, 9:13.
- NIEMI, M. 1975. Hedelmöitys ja alkion ensimmäinen elinviikko. Lääketieteellinen kehitysbiologia. p. 53-72. Helsinki.
- NISHIKAWA, Y. 1972. Motility and fertilizing ability of frozen horse spermatozoa. Atti del VII Simposio Int. Zootech., Milano, 155-167. (Ref. Nishikawa, Y. 1975).
- 1975. Studies on the preservation of raw and frozen horse semen. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 99-104.
 - , IRITANI, A. & SHINOMIYA, S. 1972. Studies on the protective effects of egg yolk and glucerol on the freezability of horse sperm. Proc. 7th Int. Cong. Anim. Reprod. & A.I. München, 2, 1545-1549.
- PACE, M.M. & SULLIVAN, J.J. 1975. Effect of timing insemination, number of spermatozoa and extenders components of the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 115-121.

- PICKETT, B.W. & VOSS, J.L. 1973. Reproductive Management of the Stallion. General Series 934. A.A.E.P. (American Association of Equine Practitioner) p. 501-531.
- & VOSS, J.L. 1975. The effect of semen extenders and sperm numbers on mare fertility. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 95-98.
- PLATOV, E.M. & MURAVEVA, L. 1974. Synthetik diluent for frozen horse semen. Konievodstvo i konnyi Sport. 1974, II 32. (Ref. A.B.A. 34: 2170).
- , FOMINA, E.L., ROMANKOVA, N.K., KOTYAGINA, V.A. & ALIEV, A.I. 1974. Long-term storage of stallion semen. (Ref. A.B.A. 42: 22).
- , FOMINA, E.L. & MURAVEVA, L.N. 1975. Freezing of stallion semen. Zhivotnovodstvo 1975, 8: 73-76.
- RAJAKOSKI, E. & TANHUANPÄÄ, E. 1973. Munasarjamuutokset tamman seksuaalisyykluksen aikana. Suom. Eläinlääk. 79: 3-4.
- RAJAMAN, A.H.J., ZEMJAMIS, R. & ELLERY, J. 1968. Freezing and fertility studies with stallion semen. Proc. 6th Int. Cong. Anim. Reprod. & A.I., Paris, 2, 1601-1604. (Ref. Nishikawa, Y. 1975).
- ROSSDALE, P.D. 1975. Das Pferd-Fortpflanzung und Entwicklung. 142 p. Basel.
- SALISBURY, G.W. & DEMARK, N.L. van. 1961. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. Freeman & Comp. 639 p.
- SOINTU, H. 1968. Tutkimuksia hevosten keinosiemennyksestä. Helsingin Yliopiston kotieläinten jalostustieteen laitos. Laudatur-työ, 51 s.
- SULLIVAN, J.J. & PICKETT, B.W. 1975. Influence of ejaculation frequency of stallions on characteristics of semen and output of spermatozoa. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 29-34.
- SUOMINEN, J. & NIEMI, M. 1972. Human seminal trypsin inhibitors. J. Reprod. Fert. 29: 163-172.
- SWIERSTA, E.E., GEBAUER, M.R. & PICKETT, B.W. 1975. The relationship between daily sperm production as determined by quantitative testicular histology and daily sperm output in the stallion. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 35-39.
- TISCHNER, M. 1975. Results of artificial insemination of horse in Poland in the post-war period. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 111-114.
- 1979. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. J. Reprod. Fert., Suppl. 27: 53-59.

- TISCHNER, M., KOSNIAK, K. & BIELANSKI, W. 1974. Analysis of the pattern of ejaculation in stallion. J. Reprod. Fert. 41: 329-335.
- VOSS, J.L. & PICKETT, B.W. 1975. The effect of rectal palpation on the fertility of cyclic mares. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 285-290.
- & PICKETT, B.W. 1976. Reproductive Management of the Broodmare. General series 961. Dedicate to Mr. Ed. H. Honen. 29 p. Colorado State University.
- WHITE, J.C. 1958. Biochemical aspects of mammalian semen. A.B.A. 26: 109-123. (Ref. Smidt, D. & Ellendorf, F. 1969).
- WITHERSPOON, D.M. 1972. An inside look at the equine ovary. Hoof Beets 1972, 5: 25, 52-53.

LIITE 1

Orin siemennesteen koostumus (WHITE 1958).

Ominaisuus	Mitta	\bar{x}
Tilavuus	ml	70 (30 - 300)
Siittiöiden lkm	$\times 10^6$	120 (30 - 800)
		7.4
P _H		
H ₂ O	g/100 ml	98
CO ₂	ml/100 ml	24
Na	mg/100 ml	70
K	"	60
Ca	"	20
Mg	"	3
Cl	"	270 (90 - 450)
P (yht.)	"	19
N (")	"	165
Fruktoosi	"	2 (0 - 10)
Sitruunahappo	"	50 (30 - 100)
(Jäätymispiste)	C ⁰	0.60 (0.58 - 0.62)

Orin siemenplasman koostumus (ROSSDALE 1975).

Ominaisuus	Mitta	\bar{x}
Ominaispaino	g	1.012
Ergotioniini	mg/ 100 ml	7.6
Sitruunahappo	"	26
Fruktoosi	"	15
Fosfori	"	17
Maitohappo	"	12
Virtsa-aine	"	3

LIITE 2

Tammojen luokitus tiinehtymisennusteen perusteella Saksassa
(KLUG ym. 1979).

Ryhmä I

Ensikertaiset ja kantavat tammät, joilla ei ole
kliinisiä tai bakteriologisia löydöksiä 70 - 100 %

Ryhmä II

Vuoden tyhjänä olleet tammät, joilla ei ole
kliinisiä tai bakteriologisia löydöksiä 50 - 70 %

Ryhmä III

Tammät, jotka ovat olleet tyhjinä pitempään
kuin yhden vuoden. Ei kliinisiä tai bak-
teriologisia löydöksiä 25 - 50 %

Ryhmä IV

Tammät, joilla on kliinisiä sairauksia suku-
elimissä tai ovat bakteriologisesti epäi-
lyttäviä 0 - 25 %

Ryhmä V

Tammät, joilla on runsaasti kliinisiä sai-
rauksia tai jotka jostain muusta syystä
(esim. yli-ikäisyys) ovat todennäköisesti
hedelmöittymiskyvyttömiä lähes 0 %

LIITE 3

LCCY-laimennusnesteen kemiallinen koostumus (NAUMENKOV ym. 1977).

Aqua dest	100 ml
Laktoosi	11 g
EDTA	0.1 g
Na-bikarbonaatti	0.2 ml
Munankeltuainen	1.6-2.0 g
Glyseroli	3.5 ml
Penisilliini	50 IU
Sreptomysiini	50 mg
pH	6.45

Sperma on kerätty fraktioidusti tai siitä on suodatettu siittiö-
rikkaimmat osat.

Laimennussuhde on ollut tiheydestä ja elävyydestä riippuen joko
1:3 tai 1:4.

Antibioottilisäystä ei ole aina tehty. Tässä tutkimuksessa ei
ollenkaan.

Jäähdytysaika on ollut 2 - 2.5 h pienillä tilavuuksilla ja suu-
ria tilavuuksia laimennettua spermaa on pidetty 2 - 2.5 tunnin
lisäksi 0.5 h jäävedessä, loppulämpötila +4 °C.

Pakkauksena on käytetty ohuiksi puristettuja alumiiniputkia,
läpimitta 4 - 5 mm, pituus 120 - 125 mm ja tilavuus 12 - 15 ml.

Putket on pakastettu nestemäisen tyypen yläpuolella (1 cm) pitä-
mällä niitä 6 - 10 minuuttia tyypen höyryssä. Säilytys on tapahtu-
nut nestemäisessä tyypessä.

Siemennysannokset on sulatettu vesihauteessa (40 °C), jossa an-
nosta on pidetty kevyesti liikutellen 50 sekuntia.

Siemennysannoksen tilavuus on ollut keskimäärin 25 ml ja se on
sisältänyt n. 300 miljoonaa siittiötä.

SARJASSA ILMESTYNYT VUODESTA 1980 LÄHTIEN:

40. RUOHOMÄKI, HILKKA, 1980. Lihakarjakokeiden tuloksia IV. 29 s.
41. JALOSTUSPÄIVÄ 9.4.1980. 43 s.
42. LAMMASPÄIVÄ 24.4.1980. 33 s.
43. SIRKKOMAA, S., 1980. Simulointitutkimus sukusiitoksen ja voimakkaan valinnan käytöstä munijakanojen jalostuksessa. Pro gradu-työ, 90 s.
44. RUOHOMÄKI, HILKKA, 1980. Eri rotuisten lihanautojen elopainot ja iät 160, 180, 210 ja 250 kilon teuraspainossa. 13 s.
45. MAIJALA, K., 1981. Kotieläinten perinnöllisen muuntelun säilyttäminen. 52 s.
46. RUOHOMÄKI, HILKKA, 1981. Lihakarjakokeet vuosina 1960—1980. 30 s.
47. JÄLKEÄISARVOSTELUSEMINAARI 12.5.1981. 44 s.
48. MAIJALA, K., 1981. Jalostus ja lisääntyminen vaikuttavina tekijöinä lihanaudan tuotannossa. 20 s.
49. SYRJÄLÄ-QVIST, LIISA, BOMAN, MARJATTA & MOISIO, S., 1981. Lammastalouden rakenne ja merkitys elinkeinona Suomessa, 25 s.
50. LEUKKUNEN, ANU, 1982. Keinosiemennyskarjujen jälkeläisarvostelu tyttären porsimistulosten perusteella. Liseniaattityö, 88 s.
51. LAURILA, TERHI, 1982. Kilpailutulosten käyttö ratsuhevosten suorituskyvyn mittaamisessa. Pro gradu-työ, 84 s.
52. LINDSTRÖM, U., 1982. Merkkigeenien ja -aineiden käyttöarvosta kotieläinjalostuksessa, 13 s.
53. LEUKKUNEN, ANU, 1982. Heikkolaatuisen rehun hyväksikäytön geneettinen edistäminen, 24 s.
54. OJALA, M., 1982. Eri kudoslajien kasvurytmi naudoilla, 22 s.
55. OJALA, M., 1982. Vanhempien tuotantotietojen ja eräiden ympäristötekijöiden yhteys sonnien kasvukoetuloksiin. Laudaturtyö, 54 s.
56. OJALA, M., 1982. Kilpailutulosten käyttöarvosta ravihevosten jalostuksessa. Liseniaattityö, 16 s.
57. KENTTÄMIES, HILKKA, 1982. Naudanlihantuotantoon vaikuttavista geneettisistä tekijöistä ja ympäristötekijöistä sekä kasvun mittaamisesta kenttäkokeissa. Liseniaattityö, 104 s.
58. HUHTANEN, P., 1982. Suomenkarjan kokonaistaloudellisuus muihin rotuihin verrattuna. Laudaturtyö, 82 s.
59. KUOSMANEN, S., 1983. 305 pv:n maitotuotoksen ennustaminen osatuotostietojen perusteella. Pro gradu-työ, 100 s.
60. HEISKANEN, MINNA-LIISA, 1983. Hevosen keinosiemennys tuore- ja pakastespermalla. Pro gradu-työ, 63 s.

ISBN 951-45-3065-9

ISSN 0356-1429

Helsingin yliopiston monistuspalvelu
Painatusjaos Helsinki 1983