

**β-KAROTEENIN VAIKUTUS NUORSONNIN SPERMAN
LAATUUN**

Johanna Kakko
Maisterin tutkielma
Kotieläintiede
Helsingin yliopisto
Maataloustieteiden osasto
Lokakuu 2020

Tiedekunta Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Koulutusohjelma Maataloustieteiden maisteriohjelma	
Tekijä Johanna Kakko			
Työn nimi Porkkanan sisältämän β -karoteenin vaikutus nuorsonnin sperman laatuun			
Oppiaine/Opintosuunta Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji Maisterintutkielma		Aika Lokakuu 2020	Sivumäärä 29
<p>Tiivistelmä</p> <p>β-karoteeni on lisääntymiselimistön toimintoja säätelevän A-vitamiinin esiaste sekä solukalvon rasvahappoja vapaiden radikaalien hapettavilta vaikutuksilta suojaava antioksidantti, jonka saannilla on havaittu olevan positiivinen vaikutus siittiöiden laatuun. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää porkkanan sisältämän β-karoteenin vaikutusta nuorsonnien sperman laatuun, sekä selvittää parantaako β-karoteeni sperman laatua niin, että sperma-annokset täyttävät niille asetetut laatuvaatimukset aikaisemmin.</p> <p>Koeasetelmassa 38 sonnia jaettiin pareihin. Koeryhmän sonneille annettiin porkkanaa 2 kg/pv 34 viikon iästä lähtien. Sonnien A-vitamiinin- ja energiansaanti oli kokeen aikana ruokintasuositusten mukainen. Porkkanasta saadulla energialla ei ollut merkittävää vaikutusta koeryhmän sonnien energiansaantiin. Sonnien siittiöiden elävyys, liikkuvuus ja sperman siittiötiheys määritettiin ennen pakastusta sekä pakastuksen jälkeen. Raja-arvot alittavaa spermaa ei pakastettu (tiheys ≤ 500 miljoonaa siittiötä/ml, elävyys ja liikkuvuus ≤ 70 %). Tuloksia tarkasteltiin 37-52 viikon ikäisiltä sonneilta. Tilastollinen testaus tehtiin varianssianalysillä (SAS-ohjelmiston Mixed-proseduuri).</p> <p>Sperman laatu parani kaikkien mitattujen ominaisuuksien suhteen sonnien kasvaessa. Sperman tiheydessä, elävyydessä, liikkuvuudessa, ejakulaatin tilavuudessa, siittiöiden lukumäärässä ja hylättyjen näytteiden osuudessa ennen pakastusta ei ollut eroja ruokintaryhmien välillä. Ensimmäinen hyväksytty näyte saatiin vertailuryhmässä suuntaa antavasti aiemmin (307 vs. 324 pv, $P=0,07$). Pakastuksen jälkeen koeryhmän sperman tiheys oli suuntaa antavasti suurempi (61,4 vs. 64,1 miljoonaa siittiötä/ml, $P=0,07$). Vastaavasti siittiöiden elävyys oli suurempi vertailuryhmässä (64,4 vs. 57,7 %, $P=0,002$). Siittiöiden liikkuvuudessa tai sonnien päiväkasvussa ei ollut eroa ruokintaryhmien välillä. Kokeen lopussa mitattu veren β-karoteenipitoisuus oli suurempi ($P=0,002$) koeryhmän sonneilla. Kivesten ympärystä oli vertailuryhmässä suuntaa antavasti suurempi ($p=0,099$).</p> <p>β-karoteenilisä kasvatti sperman siittiötiheyttä, mutta siittiöiden elävyys oli suurempi vertailuryhmässä. Siittiöiden liikkuvuuteen β-karoteenilisällä ei ollut vaikutusta. β-karoteeni ei parantanut sperman laatua siten, että tavallista nuoremmilta sonneilta olisi saatu kerättyä laatuvaatimukset täyttäviä sperma-annoksia. Sonnien ikäero ensimmäisen hyväksytyt näytteen kohdalla ei todennäköisesti johtunut β-karoteenista vaan puberteetin alkamisajankohdasta.</p>			
Avainsanat Sperma, siittiö, tiheys, liikkuvuus, elävyys, sonni, β -karoteeni, A-vitamiini			
Ohjaaja Yliopistonlehtori Tuomo Kokkonen			
Säilytyspaikka Maataloustieteiden osasto ja HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto			

Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Degree Programme Master's programme in Agricultural Sciences	
Author Johanna Kakko			
Title Effect of β -carotene in carrot on semen quality of young bulls			
Subject/Study track Animal nutrition			
Level Master's thesis	Month and year October 2020	Number of pages 29	
<p>Abstract</p> <p>β-carotene is a precursor of vitamin A which regulates the functions of the reproductive system and it is also one of the antioxidants that protect fatty acids in cell membrane from the oxidizing effects of free radicals. Based on previous reports the intake of β-carotene may have a positive effect on sperm quality. The purpose of this study was to research the effect of β-carotene in carrot on the quality parameters of semen of young bulls and to find out, if β-carotene can improve sperm quality so that the sperm doses which meet quality requirements can be collected earlier.</p> <p>In the experimental setup 38 bulls were divided into pairs. The bulls in the experimental group were given 2 kg of carrots per day since the age of 34 weeks. The vitamin A and the energy intake during the experiment followed feeding recommendations for bulls. The energy content of carrots did not have a significant effect on the energy intake of the bulls in the experimental group. Sperm viability, motility, and sperm density of bull's semen were determined both before and after freezing. Semen below the quality limits were not frozen (sperm density \leq 500 million sperm cells / ml, viability and motility \leq 70%). The results were examined from bulls aged 37-52 weeks. Statistical testing was performed by analysis of variance (Mixed procedure in SAS software).</p> <p>The quality of the sperm improved in all the measured quality parameters as the bull grew. There were no differences between feeding groups in sperm density, viability, motility, ejaculate volume, sperm count and proportion of rejected samples before freezing. The first approved sample tended to be earlier in the control group than in the experimental group (307 vs. 324 days, $P = 0.07$). After freezing the sperm, density in the experimental group was tended to be higher (61.4 vs. 64.1 million sperm / ml, $P = 0.07$). Sperm viability was higher in the control group (64.4 vs. 57.7%, $P = 0.002$). There was no difference in sperm motility or daily growth of bulls between the feeding groups. Blood β-carotene concentration was higher ($P = 0.002$) in the experimental group in the end of the experiment. The testicular circumference was tended to be larger in the control group ($p = 0.099$).</p> <p>β-carotene increased sperm density, but sperm viability was higher in the control group. β-carotene had no effect on sperm motility. β-carotene did not improve sperm quality in a way that would allow to collect high-quality sperm doses from younger bulls. The age difference of the bulls at the time of first approved sample most likely did not result from β-carotene but from the differences in the onset of puberty.</p>			
Keywords Semen, sperm, sperm density, motility, viability, bull, beta-carotene, vitamin A			
Supervisor University lecturer Tuomo Kokkonen			
Where deposited Department of Agricultural Sciences and HELDA - University of Helsinki Digital Archive			

Sisällys

1. Johdanto	6
2. β -karoteenin merkitys siittiölle	6
2.1 Siittiön toiminnan edellytys on ehjä solukalvo	6
2.2 β -karoteeni on antioksidantti ja A-vitamiinin esiaste.....	7
2.3 β -karoteenin vaikutukset spermantuotantoon.....	8
2.4 Ruokinnan vaikutukset näkyvät viiveellä.....	9
3. Tutkimuksen tavoitteet.....	9
4. Aineisto ja menetelmät.....	9
4.1 Tutkimusnavetta ja eläimet	9
4.2 Rehu ja ruokinta	10
4.2.1 Seosrehun A-vitamiinipitoisuus.....	11
4.2.2 Koerehu.....	11
4.3 Näytteenotto ja analyysimenetelmät	12
4.3.1 Rehunäytteet	12
4.3.2 Sperman keruu	12
4.3.3 Sperman laatu	12
4.3.4 Seeruminäytteet	13
4.3.5. Sonnien päiväkasvu ja kivesten ympäröymitta	13
4.4 Tilastollinen analyysi	14
5. Tulokset.....	14
5.1 Rehunäytteet.....	14
5.1.1 Rehuanalyysitulokset.....	14
5.1.2 Koerehun β -karoteenipitoisuus.....	15
5.2 Sperman laatu	15
5.2.1 Sperman laatu ennen pakastusta	15
5.2.2 Hylätyt näytteet.....	16
5.2.3 Sperman laatu pakastuksen jälkeen	17
5.3 Sonnien päiväkasvu ja kivesten koko.....	17
5.4 Sonnien veren β -karoteenipitoisuus	18
6. Tulosten tarkastelu	18
6.1 Sonnien energiansaanti ja päiväkasvu	18
6.2 Sonnien A-vitamiinin tarve ja rehun A-vitamiinipitoisuus	18

6.3	Sonnien veren β -karoteenipitoisuus	19
6.4	Sperman laatu	20
6.4.1	Tuoresperman laatu	20
6.4.2	Sperman laatu pakastuksen jälkeen	20
6.4.3	Rehun energiapitoisuuden vaikutus sperman laatuun.....	21
6.5	Sonnien kivesten koko.....	21
6.6	Sonnin iän vaikutus sperman laatuun	22
6.7	Spermatogeneesin kesto	22
6.8	Tutkimuksen rajoitukset	23
7.	Johtopäätökset	23
8.	Kiitokset	24
	Lähteet	25

1. Johdanto

Keinosiemennyksellä on merkittävä asema naudan jalostuksessa. Hyvälaatuinen sperma on yksi onnistuneen siemennyksen edellytyksistä. Keinosiemennykseen päätyvien sonnien spermasta tutkitaan useita laadullisia ominaisuuksia, kuten siittiöiden morfologista rakennetta, sperman siittiötiheyttä ja siittiöiden liikkuvuutta. Keinosiemennyssonneiksi eivät päädy sonnit, joiden sperman laatu on tutkittavien ominaisuuksien suhteen heikko, sillä sperman pakastaminen usein heikentää sekä siittiöiden liikkuvuutta että hedelmöityskykyä (Ahmed ym. 2019).

Sukukypsäksi tultuaan sonni kykenee tuottamaan hedelmöityskykyistä spermaa. Yksilöstä ja rodusta riippuen sonni saavuttaa sukukypsyyden 7-13 kk ikäisenä (Lunstra 1982). Ruokinnalla on vaikutusta sukukypsyyden alkamisajankohtaan (Barth ym. 2008, Dance ym. 2016) sekä sperman laadullisiin ominaisuuksiin. Ravinnosta saatavien karotenoidien, kuten β -karoteenin on todettu parantavan siittiöiden laatua (Zareba ym. 2011, Tizkar ym. 2015).

Tämä tutkimus sai alkunsa, kun Viking Geneticsin sonninetalla päätettiin koeluontoisesti lisätä porkkana nuorsonnien päivittäiseen ruokintaan siittiöiden laadun paranemisen toivossa. β -karoteenin vaikutuksia sonnien spermantuotantoon ovat tutkineet Schmidt ym. (1953) sekä Weiss ym. (1979).

2. β -karoteenin merkitys siittiölle

2.1 Siittiön toiminnan edellytys on ehjä solukalvo

Liikkuvuus on yksi siittiön hedelmöityskykyyn vaikuttavista ominaisuuksista (Frandsen ym. 2003). Seminaaliplasma, eli siemennesteen nestemäinen osa, sisältää siittiölle tärkeitä ravintoaineita, kuten sokereita, joista siittiö saa liikkumiseensa tarvittavaa energiaa (Frandsen ym. 2003). Siittiön liikkuvuus voi heikentyä solun ulkopuolisen nesteen ionipitoisuuksien muuttuessa tai siittiön solukalvon vaurioituessa (Zaneveld ym. 1982). Eräitä merkittävimpiä solukalvon vaurioiden aiheuttajia ovat vapaat happiradikaalit, jotka hapettaessaan siittiön solukalvon rasvahappoja tuhoavat solukalvon rakennetta (Zini ym. 2009).

Siittiöiden heikentynyt hedelmöityskyky korreloi sperman lisääntyneen happiradikaalipitoisuuden kanssa (Koskimies ym. 2010, Majzoub ym. 2017). Sukusolut ovat hapettuessaan alttiita DNA-vaurioille (Almbro ym. 2011). Siittiöiden DNA:n pilkkoutuminen, eli DNA-fragmentaatio, lisääntyy siemennesteen happiradikaalipitoisuuden kasvaessa ja siittiöiden lisääntynyt DNA-vaurioiden määrä heikentää niiden hedelmöityskykyä (Koskimies ym. 2010, Majzoub ym. 2017).

Antioksidantit suojaavat solukalvon rasvoja vapaiden radikaalien hapettavilta vaikutuksilta (Zini ym. 2009). Antioksidantteja saadaan ravinnosta tai niitä voidaan lisätä sperman laimennuksessa käytettyyn liuokseen ennen sperman pakastamista (Tsandartiolou ja Sapanodou 2018). On olemassa jonkin verran tutkimustuloksia eri antioksidanttien vaikutuksista sperman laadun parantamiseksi. Ei ole kuitenkaan selvää, mitkä antioksidantit tuovat selkeitä parannuksia sperman laatuun (Tsandartiolou ja Sapanodou 2018).

2.2 β -karoteeni on antioksidantti ja A-vitamiinin esiaste

Karotenoidit jaetaan tyypillisesti kahteen ryhmään, karoteeneihin ja ksantofylleihin. Karoteenien ryhmään kuuluvan β -karoteenin antioksidanttipotentiaali perustuu sen pitkään, herkästi hapettuvaan hiilivetyketjuun (McDonald ym. 2011). Miehillä veren matalat karotenoidipitoisuudet on yhdistetty hedelmättömyyteen (Ghyasvand ym. 2015). Rottakokeissa β -karoteenin on havaittu vähentävän vapaiden radikaalien pitoisuuksia plasmassa, maksassa, aivoissa ja kiveksissä pienentäen samalla vapaiden radikaalien toksisia vaikutuksia (El-Demerdash ym. 2004).

β -karoteenilla on vaikutusta lisääntymistoimintoihin eri eläinlajeilla. Rowe ym. (2012) havaitsivat linnuilla tehdyssä tutkimuksessa β -karoteenin kirkastavan koiraiden höyhenpuvun värejä. Näyttävä ja värikäs höyhenpuku toimii naaraille signaalina koiraan siittiöiden tuotannosta ja hedelmöityskyvystä. Myös naarailla β -karoteeni vaikuttaa lisääntymiselimistön toimintaan (Pas de Arruda ym. 2010, Meza-Herrera ym. 2013, Meza-Herrera ym. 2014).

β -karoteeni on yksilön kasvua ja lisääntymiseen liittyviä toimintoja säätelevän A-vitamiinin, eli retinolin, esiaste (Rode ym. 1995, McDonald ym. 2011). A-vitamiini on yksi antioksidanteista, jonka lisäksi sitä tarvitaan testosteronin tuotannossa (Arruda ym. 2010).

A-vitamiinin puutos hidastaa solujen uusiutumista ja voi heikentää esimerkiksi kivesten vaurioiden paranemista (Almbro ym. 2011). Sonneilla A-vitamiinin puutteen on havaittu heikentävän siittiöiden liikkuvuutta sekä lisäävän epänormaalien siittiöiden määrää siemennesteessä (Pas de Arruda ym. 2010).

2.3 β -karoteenin vaikutukset spermantuotantoon

Tutkimuksissa on osoitettu, ettei β -karoteenilla yksinään ole siittiön laatua parantavia vaikutuksia (Ashizawa ym. 2000, Keogh ym. 2018). β -karoteenista saatava hyöty on havaittu, kun β -karoteenia on käytetty yhdessä toisen antioksidantin kanssa (Almbro 2011, Zareba ym. 2013, Tizkar ym. 2015). Zareba ym. (2013) osoittivat, että β -karoteeni yhdessä luteiin kanssa paransi miesten siittiöiden liikkuvuutta. Tizkar ym. (2015) havaitsivat siittiöiden liikkuvuuden paranevan, kun kultakaloille syötettiin β -karoteenia ja astaksantiinia. Almbro ym. (2011) tutkimuksessa havaittiin, että E-vitamiinin ja β -karoteenin yhteisvaikutus paransi siipikarjan sperman hedelmöityskykyä enemmän kuin kumpikaan niistä yksinään. Tutkijoiden mukaan syy oli todennäköisesti siinä, että vapaiden radikaalien neutraloinnin jälkeen E-vitamiini muuttui itse radikaaliksi, jonka β -karoteeni neutraloi edelleen. Eri antioksidantit toimivat näin ollen ketjussa.

Antioksidanttien positiivisia vaikutuksia on havaittu myös yhdessä monitydyttymättömien rasvahappojen kanssa. Niiden samanaikainen saanti ravinnosta kohensi siittiöiden elävyyttä ja paransi niiden morfologisia ominaisuuksia. Aivan kuten elimistön omiakin rasvahappoja, antioksidantit suojelevat hapettumiselta myös ravinnosta saatavia rasvahappoja (Strzezek ym. 2004, Hlungwani ym. 2015).

β -karoteenin vaikutuksista sonnien spermantuotantoon on saatavilla melko vähän tutkimustuloksia. Schmidt ym. (1953) tekivät ruokintakokeen käyttäen sekä vaaleita että punaisia porkkanoita sonnien ruokinnassa. Punaisia porkkanoita syöneiden sonnien sperman tiheys sekä sperman ja siittiöiden määrä olivat suurempia kuin vaaleita porkkanoita syöneiden sonnien. Parempi sperman laatu yhdistettiin β -karoteeniin porkkanoiden punaisemman värin vuoksi. Weiss ym. (1979, ref. Pas de Arruda ym. 2010) havaitsivat β -karoteenin puutteen heikentävän nuorien sonnien siittiöiden liikkuvuutta sekä heikentävän siittiöiden morfologisia ominaisuuksia.

2.4 Ruokinnan vaikutukset näkyvät viiveellä

Pas de Arruda ym. (2010) havaitsivat β -karoteenin puutteen heikentävän siittiöiden laatua vasta 27 viikon kuluttua ruokintakokeen alkamisesta. Kruk ym. (2008) havaitsivat härkien veren A-vitamiinitasojen laskevan voimakkaasti 50. päivän kohdalla A-vitamiinilisän aloittamisesta, jolloin he huomasivat myös veren β -karoteenitasojen laskevan. Härkien normaali ruokinta sisälsi vain vähän β -karoteenia, joten mahdollisesti A-vitamiinipitoisuuden voimakas nousu veressä aiheutti aluksi karotenoidien vapautumisen maksasta verenkiertoon ja vasta karoteenivarastojen ehtyminen maksasta ja muista kudoksista tehosti β -karoteenin muuntamista A-vitamiiniksi.

Happiradikaalit voivat haitata siittiön solukalvorakenteen muodostumista spermatogeneesin aikana (Zini ym. 2010). β -karoteenin ja A-vitamiinin mahdolliset vaikutukset sperman laatuun saattavat vaatia näkyäkseen ainakin spermatogeneesiin, eli uusien siittiöiden muodostumiseen, tarvittavan ajan, joka sonnilla on noin kaksi kuukautta (Amann ja Schanbacher 1983, Frandson ym. 2003, McDonald ym. 2011).

Sonnin sperman laatuun vaikuttavat ravitsemuksellisten tekijöiden lisäksi myös muun muassa sonnin perimä (Karoui ym. 2011), sonnin ikä (Fuerst-Waltl ym. 2006) sekä ympäristön lämpötila (Fuerst-Waltl ym. 2006, Yadav ym. 2019).

3. Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää porkkanan sisältämän β -karoteenin vaikutusta nuorsonnien spermasta määritettäviin laatuparametreihin, joita olivat sperman siittiöitiheys, siittiöiden elävyys sekä siittiöiden liikkuvuus. Tarkoituksena oli selvittää, parantaako β -karoteeni sperman laatua niin, että nuorsonneilta voitaisiin kerätä laatuvaatimukset täyttäviä sperma-annoksia nykyistä aikaisemmin.

4. Aineisto ja menetelmät

4.1 Tutkimusnavetta ja eläimet

Koe suoritettiin Viking Geneticsin sonniasemalla Hollolassa syksyn 2016 – kevään 2017 aikana. Kokeessa oli yhteensä 38 sonnia, joista 30 sonnia oli ayrshire- ja kahdeksan

holsteinrotuisia. Kokeeseen osallistuvia sonneja pidettiin yksilökarsinoissa Hollolan sonniaseman tuotantonavetassa.

Sonnit jaettiin koeasetelmassa pareihin siten, että toinen sonneista kuului koe- ja toinen vertailuryhmään. Nuorsonneja tuli Viking Geneticsin tuotantonavettaan jatkuvasti ja siitä syystä parien jaossa pyrittiin huomioimaan se, että parin kumpikin sonni oli navetassa yhtä aikaa ja se, että parin sonnit olivat keskenään saman rotuisia. Sonnit aloittivat kokeen kahdeksan kuukauden ikäisinä ja olivat kokeessa vähintään niin kauan, että niiltä saatiin kerättyä kahdeksan pakastuskelpoista spermanäytettä. Koe päättyi jokaisen sonnin osalta kuitenkin viimeistään silloin, kun sonni oli vuoden ikäinen.

4.2 Rehu ja ruokinta

Seosrehu valmistettiin ruokintasuunnitelman mukaan (Pro Agria, Karjakompassi) juuri ennen sen jakoa seosrehuvaunulla. Rehua jaettiin 16-17 kg sonnia kohden kerran päivässä kello 13-14. Rehua oli aina sonnien saatavilla. Rehujäte kerättiin pois ennen uuden rehun jakoa. Navettaan valmistettavan seosrehun määrää lisättiin ja vähennettiin, jos sonneilta kerätyn jäännösrehun kokonaismäärä ylitti tai alitti 4 % jaetusta määrästä. Muutokset tehtiin vasta, jos jäännösrehun määrä poikkesi vähintään kahtena peräkkäisenä päivänä. Vertailu- ja koeruokinnassa seosrehu ja sen jakomäärä oli sama.

Seosrehureseptiä muokattiin kokeen aikana aina kun uusi rehuerä otettiin käyttöön. Sonnin päivittäinen rehuannos muodostui nurmisäilörehusta ja kuivaheinästä tai oljesta siten, että rehuannos sisälsi keskimäärin 44 %, eli 7,3 kg, kuiva-ainetta päivässä. Karkearehun osuus oli keskimäärin 74 % rehuannoksen kuiva-aineesta. Sonnin rehuannos sisälsi muuntokelpoista energiaa keskimäärin 10,1 MJ/kg eli 73,7 MJ päivässä. Ohutsuolesta imeytyvä valkuainen (OIV) oli keskimäärin 94 g/kg ka ja pötsin valkuaiastase (PVT) 26 g/kg ka.

Tutkimuksen aikana sonnien ruokinnassa käytettiin seitsemää eri nurmisäilörehuerää, jotka oli säilötty laakasiiloon, pyöröpaaleihin sekä tuubeihin. Pyöröpaaleihin säilötty nurmisäilörehu oli korjattu ensimmäisestä sadosta ilman säilöntäainetta. Sitä oli käytössä sonnien ruokinnassa koko tutkimuksen ajan. Tuubeihin ilman säilöntäainetta säilöttyä toisen sadon nurmisäilörehua oli käytössä syksyn ja talven aikana. Laakasiiloon säilötyn nurmiheinän säilönnässä oli käytetty muurahaihappoa sisältävää AIV Ässä Na-

säilöntäainetta (Eastman/Taminco Finland Oy, Oulu). Se oli korjattu toisesta sadosta ja sitä käytettiin sonnien ruokinnassa kevään aikana. Seosrehua täydennettiin syksyllä kuivaheinällä ja talven ja kevään aikana oljella.

Rehuannokseen kuului noin 2 kg rypsipuristetta (Avena, Kirkkonummi), jonka osuus oli 23 % rehuannoksen kuiva-aineesta. Kivennäislisänä annettiin 150 g Fosfori-Melliä (Lantmännen Feed, Turku), jonka osuus oli 2 % rehuannoksen kuiva-aineesta sekä vitamiinilisänä 20 g Vita-Melliä (Lantmännen Feed, Turku), jonka osuus rehuannoksen kuiva-aineesta oli 1 %.

Sonnien kiinniottolanteissa käytettiin päivittäin houkutusrehuna pieni määrä Raimix Vilja täydennysrehua (Lantmännen Feed, Turku), jota ei tutkimuksessa huomioitu kummankaan ryhmän ruokinnassa.

4.2.1 Seosrehun A-vitamiinipitoisuus

Seosrehuun lisätty Fosfori-Melli sisälsi retinolimuoitoista A-vitamiinia 112 mg/kg ja Vita-Melli 60 mg/kg. Laskennallisesti kukin sonni sai ruokintakerralla 18 mg A-vitamiinia. Fosfori-Mellistä 17 mg ja Vita-Mellistä 1 mg. Rehun muiden raaka-aineiden A-vitamiini- ja β -karoteenipitoisuuksia ei erikseen huomioitu.

4.2.2 Koerehu

Koerehuna käytettiin kotimaista porkkanaa (Toukolan vihannestila, Asikkala), jota jokainen koeryhmän sonni sai seosrehun lisäksi 2 kg päivässä. Sonnit aloittivat koerehun syömisen 8 kk iässä, kuukautta ennen kuin spermaa alettiin keräämään. Sonnit söivät koerehua koko tutkimuksessa olon ajan.

Porkkanan kuiva-aine pitoisuus on rehutaulukoiden mukaan 120 g/kg ja muuntokelpoista energiaa porkkanassa on 12,6 MJ/kg ka (Luke 2015). Kokeessa käytetyn porkkanan kuiva-ainepitoisuutta ei määritetty. Porkkanan sisältämää energiaa ei huomioitu sonnien päivittäisessä ruokinnassa vaan sonneille jaettiin seosrehua sama määrä ruokintaryhmästä riippumatta. Porkkanat toimitettiin navettaan pienissä erissä, jotta niiden varastointi navettaolosuhteissa pysyi mahdollisimman lyhyenä. Juuri ennen eläimille jakoa porkkanat pilkottiin oksasilppurin avulla. Porkkanat jaettiin kerran päivässä yhdellä antokerralla ja annosteltiin annosmitalla.

4.3 Näytteenotto ja analyysimenetelmät

4.3.1 Rehunäytteet

Kokeen aikana sonnien ruokinnassa käytetyt säilörehu- ja nurmiheinäerät oli pääosin analysoitu ennen kokeen alkua (Seilab, Seinäjoki, Suomi). Lisäksi näytteitä otettiin kokeen aikana kuudesta rehuerästä. Rehuista määritettiin kuiva-ainepitoisuus kuivattamalla näytettä vuorokauden ajan 80 °C. D-arvo (sulavan orgaanisen aineen osuus kuiva-aineesta), raakavalkuainen, NDF-kuitu, sokeri ja tuhka määritettiin NIR-menetelmällä. Ammoniakityppi, liukoinen typpi, maito- ja muurahaishappo sekä haihtuvat rasvahapot määritettiin titraamalla. Muuntokelpoinen energia, OIV ja PVT määritettiin laskennallisesti sekä pH määritettiin pH-mittarilla.

Porkkanoista otettiin näytteitä β -karoteenipitoisuuden määrittämistä varten kolme kertaa kokeen aikana, alussa, kokeen keskivaiheilla sekä lopussa. Näytteeksi pilkottiin pieni erä porkkanoita, joiden β -karoteenipitoisuus määritettiin laboratoriossa (Eurofins scientific Finland Oy, Raisio, Suomi) nestekromatografia käyttäen (Eurofins CLF 2020).

4.3.2 Sperman keruu

Nuoret sonnit saivat kokeilla hyppäämistä pukille tai niin sanotun teasersonnin selkään yhdeksän kuukauden iästä lähtien. Sperma otettiin talteen heti, kun sitä saatiin kerättyä. Sperma kerättiin suoraan koeputkeen, joka sijaitsi liukastetun, paineistetun ja 40-43 °C lämmitetyn keruuastian, eli tekovaginän, kärjessä. Spermankeruun jälkeen koeputki toimitettiin suoraan laboratorioon laatuparametrien määrittämistä varten. Spermaa kerättiin kaikilta sonneilta kaksi kertaa viikossa, 2-3 päivän välein.

4.3.3 Sperman laatu

Sperma-annoksesta määritettiin seuraavat parametrit: siittiöiden elävyys ja liikkuvuus sekä sperman siittiötiheys. Lisäksi sperma-annos, eli ejakulaatti, punnittiin. Sperman laatu määritettiin ensimmäisen kerran heti sperman keruun jälkeen ennen sen laimentamista ja pakastamista. Toisen kerran sperman laatu määritettiin 1-5 vuorokauden kuluttua siitä, kun sperma-annokset oli pakastettu, eli säilötty -196 °C nestemäiseen tyypeen. Sperman keruu ja pakastus tapahtuivat peräkkäisinä päivinä. Sperma-annosten tuli täyttää vaaditut raja-arvot elävyyden, liikkuvuuden ja tiheyden osalta, jotta sperma pakastettiin.

Siittiöiden elävyyden sekä liikkuvuuden tuli kummankin olla vähintään 70 % ennen pakastusta. Tiheyden raja-arvo oli 500 miljoona siittiötä / ml ejakulaattia.

Siittiöiden elävyys sekä sperman siittiöitiheys määritettiin virtausytometrillä (CyFlow, Sysmex Partec). Siittiön elinkyvyn arviointi perustuu solukalvon eheyteen. Ehjän siittiön solukalvo ei läpäise määrittämisessä käytettyä väriainetta, jonka vuoksi ehjät siittiöt fluoresoivat eri väristä valoa kuin siittiöt, joiden solukalvo on rikkonainen (Althouse ja Hopkins 1991). Siittiöiden liikkuvuus, eli motiliteetti, arvioitiin ihmissilmällä mikroskoopin avulla.

Ejakulaatti punnittiin ja kunkin ejakulaatin tilavuus laskettiin kirjallisuudesta saadun seminaaliplasman painon (1,053 g/ml) avulla (Kocks ja Broekhuijse 2014). Sperman siittiöitiheydestä ja ejakulaatin tilavuudesta laskettiin siittiöiden määrä ejakulaattia kohden.

4.3.4 Seeruminäytteet

Sonneilta otettiin kaksi verinäytettä kaulalaskimosta. Ensimmäinen kokeen alussa ja toinen kokeen jälkeen. Kokoverinäytteet sentrifugoitiin (3000 rpm 10 min), ja kummastakin näytteestä pipetoitiin seerumia cryoputkeen (Viking Geneticsin erikoislaboratorio, Hollola, Suomi). Näytteet pakastettiin ennen lähetystä β -karoteenimääritykseen (IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Saksa).

4.3.5. Sonnien päiväkasvu ja kivesten ympärysmitta

Sonnien elopaino määritettiin kolme kertaa ennen koetta ja kerran kokeen aikana käyttäen mittanauhaa. Määrityskertojen välille laskettiin päiväkasvut. Ensimmäinen paino mitattiin sonnin tullessa Viking Geneticsin karanteeninetettiin noin neljän kuukauden ikäisenä, toinen mittaus tehtiin sonnin lähtiessä karanteeninetettiin noin viiden kuukauden ikäisenä, kolmas mittaus sonnin ollessa seitsemän kuukauden ikäinen ja viimeinen mittaus sonnin ollessa kymmenen kuukauden ikäinen.

Päiväkasvut mittausten välillä laskettiin jakamalla painojen erotus kuluneiden päivien lukumäärällä. Päiväkasvu syntymästä kymmenen kuukauden ikään laskettiin olettaen, että sonnin syntymäpaino oli 42 kg. Punnitusajankohdat olivat sonninetettiin tavanomaisesti käytössä ja laskukaavat olivat Viking Geneticsin omassa tilastoinnissa käytössä olleita laskentamalleja.

Sonnien kivesten ympärystymitta mitattiin kaikilta sonneilta 10 kk ikäisenä käyttäen mittanauhaa.

4.4 Tilastollinen analyysi

Tulosten tilastollinen testaus tehtiin varianssianalyysillä käyttäen SAS 9.4-ohjelmiston (SAS Institute, Cary, NC, USA) Mixed-proseduuria. Sperman laatua kuvaavista parametreista laskettiin viikkokeskiarvot ennen tilastollista analyysia. Sperman laatua kuvaavat parametrit analysoitiin toistuvien mittausten mallilla, jossa kiinteinä tekijöinä olivat ruokintaryhmä ja sonninin ikä viikkoina. Pari oli mallissa satunnaistekijä.

Kuuden sonninin tuloksia ei voitu tarkastella sperman laatuparametrien osalta. Yksi sonneista ei hypännyt lainkaan. Kolmen sonninin sperma-annokset hylättiin epänormaalin ulkonäön vuoksi. Sperma oli vetistä eikä sisältänyt siittiöitä. Sonnien spermanäyteitä tarkasteltiin aikaväliltä, jolloin sonnit olivat 37-52 viikon, eli 253-364 päivän ikäisiä. Kahdelta sonnilta ei ollut tuloksia tältä aikaväliltä.

Sonnien päiväkasvu, ikä ensimmäisen hyväksytyyn spermanäytteen aikaan, hylättyjen spermanäytteiden osuus sekä veren β -karoteenipitoisuus analysoitiin mallilla, jossa ruokinta oli kiinteänä tekijänä ja pari satunnaisena tekijänä. Aineiston normaalijakautuneisuus tutkittiin residuaalien jakauman perusteella, käyttäen SAS-ohjelmiston Univariate-proseduuria. Muuttujille, jotka eivät olleet normaalijakautuneita tehtiin logaritminmuunnos (lukujen suuruudesta riippuen joko luonnollinen tai kymmenkantainen logaritmi) ennen lopullista tilastollista analyysia. Kahden sonninin poikkeavat päiväkasvut poistettiin, jotta tulos oli normaalijakautunut.

5. Tulokset

5.1 Rehunäytteet

5.1.1 Rehuanalyysitulokset

Karkearehujen analyysitulokset on esitetty keskiarvoina taulukossa 1. Nurmisäilörehuerät on taulukoitu säilöntätavan mukaan.

Taulukko 1. Rehuanalyysitulokset.

Rehu	Säilörehu tuubi	Säilörehu laakasiilo	Säilörehu paali	Kuivaheinä	Olki
n (rehuerä)	1	1	5	2	1
Kuiva-aine (g/kg)	314	274	489	769	320
Tuhka (g/kg ka)	85	86	61		83
D-arvo (g/kg ka)	665	675	678	670	409
Raakavalkuainen (g/kg ka)	111	120	141	138	67
Kuitu (NDF) (g/kg ka)	569	555	647	564	882
Sokeri	86	110	95	113	
pH	4,82	4,13	5,47		
Ammoniakkityppi (g/kg -N)	28	28	21		
Liukoinen typpi (g/kg -N)	577	389	458		
Maito- ja muurahaishappo (g/kg ka)	0	44	4		
Haihtuvat hapot (g/kg ka)	17	15	7		

5.1.2 Koerehun β -karoteenipitoisuus

Porkkanan β -karoteenipitoisuus määritettiin kolme kertaa kokeen aikana. Lokakuussa porkkanan β -karoteenipitoisuus oli 79 mg/kg, tammikuussa 66 mg/kg ja huhtikuussa 90 mg/kg.

5.2 Sperman laatu

5.2.1 Sperman laatu ennen pakastusta

Spermanäytteitä kerättiin yhteensä 776 kappaletta. Laatuparametrien tuloksista laskettiin keskiarvo saman viikon aikana kerätyille näytteille. Samana päivänä kerätyistä näytteistä analysoitavaksi valittiin tiheyden perusteella parempi. Analysoitavia viikkokeskiarvoja oli lopulta 182 kappaletta. Sperman laatua kuvaavat parametrit on esitetty taulukossa 2.

Sperman tiheydessä ($p=0,18$), ejakulaatin tilavuudessa ($p=0,66$) ja siittiöiden lukumäärässä ($p=0,21$), elävyydessä ($p=0,23$) sekä liikkuvuudessa ($p=0,13$) ei ollut eroja ruokintaryhmien välillä. Ejakulaatin tilavuus kasvoi ja sperman laatu kaikilta osin parani sonnin kasvaessa ($p<0,001$).

Taulukko 2. Sonnin iän ja β -karoteenin vaikutus tuoresperman laatuun.

Sperman laatu	n	Vertailuryhmä	Koeryhmä	SEM	p-arvo ruokinta	p-arvo ikä
Elävyys (%)	182	81,3	79,1	1,43	0,23	<0,001
Liikkuvuus (%)	182	75,4	73,4	1,06	0,13	<0,001
Tiheys (miljardia siittiötä/ml)	182	0,81	0,69	0,06	0,18	<0,001
Tiheys (logaritimuunnettu)	182	-0,12	-0,19	0,33	0,13	<0,001
Ejakulaatin tilavuus (ml)	182	3,4	3,3	0,23	0,66	0,0014
Tilavuus (logaritimuunnettu) ¹	182	1,2	1,1	0,07	0,60	<0,001
Siittiöiden lukumäärä (miljardia siittiötä/ejakulaatti)	182	2,9	2,4	0,29	0,21	<0,001
Siittiöiden lukumäärä (logaritimuunnettu) ¹	182	0,9	0,8	0,09	0,16	<0,001

¹) Muunnoksessa käytetty luonnollista logaritmia

5.2.2 Hylätyt näytteet

Näytteitä, jotka eivät ylittäneet laatuparametreille asetettuja raja-arvoja, ei pakastettu. Hylätyjen näytteiden osuudessa ei ollut eroa ruokintaryhmien välillä ($p=0,20$). Ensimmäinen hyväksytty näyte saatiin vertailuryhmässä suuntaa antavasti aiemmin kuin koeryhmässä ($p=0,07$). Pakastuskelvottomien spermanäytteiden osuus ja sonnin ikä ensimmäisen hyväksytyt näytteen aikaan on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Pakastuskelvottomat spermanäytteet.

Sperman laatu	n	Vertailuryhmä	Koeryhmä	SEM	p-arvo ruokinta
Hylätyjen näytteiden osuus (%)	38	47,1	58,5	6,01	0,20
Ensimmäinen hyväksytty näyte sonnin ikä (pv)	34	307	324	7,0	0,07
Ensimmäinen hyväksytty näyte (logaritimuunnettu) sonnin ikä (pv)	34	2,49	2,51	0,009	0,08

5.2.3 Sperman laatu pakastuksen jälkeen

Spermaa ei pakastettu niiltä tutkimukseen osallistuneilta sonneilta, joilla ei ollut jalostuksellista arvoa, vaikka sperma olisi ollut laadullisesti riittävän hyvää. Pakastuksen jälkeisiä tuloksia saatiin 12 koeryhmän ja 11 vertailuryhmän sonnilta (Taulukko 4).

Koeryhmän sonnien sperman tiheys oli pakastuksen jälkeen suuntaa antavasti suurempi kuin vertailuryhmän sonnien sperman tiheys ($p=0,07$). Siittiöiden liikkuvuudessa ei ollut eroa ruokintaryhmien välillä ($p=0,83$). Siittiöiden elävyys pakastamisen jälkeen oli suurempi vertailuryhmän sonneilla kuin koeryhmän sonneilla ($p=0,002$).

Sonnin ikääntyessä siittiöiden elävyys ($p<0,001$) ja liikkuvuus ($p=0,004$) paranivat. Myös sperman tiheys kasvoi sonnien kasvaessa ($p=0,04$).

Taulukko 4. Sperman laatua kuvaavat parametrit pakastuksen jälkeen.

Sperman laatu ¹	n	Vertailuryhmä	Koeryhmä	SEM	p-arvo ruokinta	p-arvo ikä
Elävyys (%)	112	64,4	57,7	1,99	0,002	<0,001
Liikkuvuus (%)	112	51,4	51,8	1,35	0,83	0,004
Tiheys (miljoonaa siittiötä/ml)	112	61,4	64,1	1,78	0,07	<0,04

¹⁾ Määritykset tehty laimennetulle spermalle

5.3 Sonnien päiväkasvu ja kivesten koko

Koe- ja vertailuryhmän sonnien päiväkasvuissa (taulukko 5) ei 10 kk kasvatusaikana ollut eroa ruokintaryhmien välillä ($p\geq 0,35$).

Taulukko 5. Sonnien päiväkasvu (g/pv).

Sonnin ikä (kk)	n	Vertailuryhmä	Koeryhmä	SEM	p-arvo ruokinta
4-5	38	1223	1161	54,6	0,35
5-7	38	1115	1107	29,5	0,84
7-10	38	1098	1126	26,8	0,45
0-10	38	997	1000	34,3	0,96

Kivesten ympärysmittassa oli suuntaa antava ero koe- ja vertailuryhmän välillä ($p=0,099$). Koeryhmän sonnien kivesten ympärysmitta oli keskimäärin 29,7 cm ja vertailuryhmän 30,8 cm ($SEM=0,45$).

5.4 Sonnien veren β -karoteenipitoisuus

Kokeen alussa koeryhmän sonnien veren β -karoteenipitoisuus (Taulukko 6) oli suuntaa antavasti suurempi ($p=0,09$). Kokeen lopussa mitatut β -karoteenipitoisuudet olivat suurempia koeryhmän sonneilla ($p=0,007$).

Taulukko 6. β -karoteenipitoisuus veren seeruminäytteessä ($\mu\text{g/l}$).

	n	Vertailuryhmä	Koeryhmä	SEM	p-arvo ruokinta
Kokeen alussa	38	3622	3671	315,5	0,09
Kokeen lopussa	38	5224	6831	531,6	0,007
Kokeen lopussa (logaritimuunnettu)	38	3,7	3,8	0,04	0,003

6. Tulosten tarkastelu

6.1 Sonnien energiansaanti ja päiväkasvu

Sonnien energiansaanti oli kokeen aikana energiansaantisuosituksen mukainen. Vertailuryhmän sonnit saivat energiaa 73,7 MJ ME päivässä saantisuosituksen ollessa 73 MJ ME (Luke 2015) Koeryhmän sonnien energiansaanti oli keskimäärin 76,7 MJ ME päivässä. Porkkanat toivat 4 % energianlisäyksen koeryhmän sonnien ruokintaan.

Sonnien päiväkasvuissa ei ollut eroja koeryhmien välillä Koeryhmän sonnit kasvoivat 7-10 kk iässä 1130 g/pv ja vertailuryhmän sonnit puolestaan 1100 g/pv. Päiväkasvu vastasi kummankin ruokintaryhmän osalta Viking Geneticsin tavoitetta 1100 g/pv.

6.2 Sonnien A-vitamiinin tarve ja rehun A-vitamiinipitoisuus

Tutkimuksen sonnien A-vitamiinin saantisuositus on 5 mg päivässä (Luke 2015). Siitoskäytön on arvioitu lähes kaksinkertaistavan A-vitamiinin tarpeen (Pesonen 2013). Sonnit

saivat ruokintakerralla 18 mg A-vitamiinia seosrehuun lisätyistä vitamiini- ja kivennäisvalmisteista. Ruokintasuosituksen mukainen A-vitamiinin saanti sekä siitoskäytön oletettu lisätarve täyttyivät sonneilla hyvin pelkästään vitamiini- ja kivennäisvalmisteiden sisältämän A-vitamiinin ansiosta.

Koerehun syöttömäärä päätettiin ennen kuin porkkanoiden β -karoteenipitoisuudesta oli saatavissa analyysituloksia. Sonnien päivittäisen porkkana-annoksen arvioitiin kaksinkertaistavan sonnien A-vitamiinin saannin. Analysoidun porkkanan β -karoteenipitoisuus oli keskimäärin 78 mg/kg. Koeryhmän sonnit saivat porkkanoista keskimäärin 156 mg β -karoteenia päivässä. Tutkimuksessa käytetyn porkkanan β -karoteenipitoisuus oli moninkertainen Väänänen (2012) maisterin tutkielman β -karoteenipitoisuuteen, joka kokonaisuudessa porkkanassa oli 10-16 mg/kg. Finelin (2020) mukaan porkkanan karotenoidipitoisuus on 113 mg/kg. Karotenoidien yhteismäärä kuvaa kaikkien porkkanan sisältämien karotenoidien pitoisuutta eikä β -karoteenipitoisuutta ei ole eritelty. USDA (2020) mukaan porkkanan β -karoteenipitoisuus on 82 mg/kg.

β -karoteenimolekyylistä hydrolysoidaan kaksi A-vitamiinimolekyyliä (McDonald 2011), minkä vuoksi porkkanoiden sisältämän A-vitamiinin määrä on enintään puolet β -karoteenin määrästä. Todellisuudessa A-vitamiinin määrä ei ole suoraan verrattavissa β -karoteenin määrään. Karoteenien hyväksikäyttö on lypsylehmillä noin 78 % (Pyörälä ja Tiihonen 2005). Huomattava osa ravinnon karoteeneista ja A-vitamiinista saattaa hajota jo pötsissä (Pyörälä ja Tiihonen 2005). McDonaldin ym. (2011) mukaan märehitjät muuntavat β -karoteenia retinoliksi keskimäärin suhteessa 6:1, jolloin 6 milligrammaa β -karoteenia muunnetaan yhdeksi milligrammaksi retinolia.

Ylimäärä A-vitamiinia varastoituu maksaan (Pyörälä ja Tiihonen 2005, Arnett ym. 2009). A-vitamiinin liikasaannilla ei todennäköisesti ole haittavaikutuksia siittiöille, mutta varmaa tietoa ei asiasta ole. A-vitamiinin turvallisuusmarginaali on märehitjillä 30-kertainen sen saantisuositukseen verrattuna. Karkearehun β -karoteenista suuri osa tuhoutuu rehun säilönnässä ja kuivatuksessa (Pyörälä ja Tiihonen 2005).

6.3 Sonnien veren β -karoteenipitoisuus

Ravinnosta saatavien antioksidanttien osalta on oltava varma niiden imeytymisestä sekä eläimen kyvystä hyväksikäyttää niitä (Tsandartiolou ja Sapanodou 2018). Porkkanan

sisältämä β -karoteeni imeytyi, sillä koeryhmän sonnien veren β -karoteenipitoisuus oli kokeen jälkeen suurempi kuin vertailuryhmän sonnien veren β -karoteenipitoisuus. Veren kohonnut β -karoteenipitoisuus ei kuitenkaan kerro elimistön kyvystä muuntaa β -karoteenia A-vitamiiniksi.

Sonnien veren β -karoteenipitoisuus oli kokeen alussa koeryhmässä 3,7 mg/l ja vertailuryhmässä 3,6 mg/l. Kokeen lopussa pitoisuudet olivat 6,8 mg/l ja 5,2 mg/l. Kaikki havaitut pitoisuudet sijoittuvat Yasarin ja Abdullahin (2006) esittämälle naudnan veren β -karoteenipitoisuuden vaihteluvälillä 3-12 mg/l. Jukolan (1994) tutkimuksessa (ref. Pyörälä ja Tiihonen 2005) lypsylehmien veren β -karoteenipitoisuus oli keskimäärin 13,7 mg/l ja vasikoiden 3,3 mg/l.

6.4 Sperman laatu

6.4.1 Tuoresperman laatu

Tuoresperman tiheydessä, elävyydessä ja liikkuvuudessa ennen pakastusta ei ollut eroja ruokintaryhmien välillä. Myöskään ejakulaatin tilavuus tai siittiöiden lukumäärä ejakulaatissa ei poikennut ruokintaryhmien välillä. Vastaavan tuloksen saivat Zareba ym. (2013) havaitessaan, että β -karoteenin saannilla ei ollut yhteyttä miesten siemennesteen tiheyteen tai siittiöiden lukumäärään.

Sonnien muiden antioksidanttien, kuten E-vitamiinin ja sinkin, saanti ei poikennut ruokintaryhmien välillä. Muiden antioksidanttien vaikutus sperman laatuun voi selittää laatuerojen vähäisyyttä ruokintaryhmien välillä.

6.4.2 Sperman laatu pakastuksen jälkeen

Pakastukseen hyväksyttiin vain raja-arvot täyttävät sperma-annokset. Hylättyjen näytteiden osuudessa tai siittiöiden liikkuvuudessa ei ollut eroja ruokintaryhmien välillä. Koeryhmän sonnien sperman siittiötiheys oli pakastuksen jälkeen vertailuryhmän sonneja suurempi. Schmidtin ym. (1953) saama tulos oli sperman tiheyden suhteen vastaava. Heidän tutkimuksessaan punaisia porkkanoita syöneiden sonnien sperman tiheys oli suurempi kuin vaaleita porkkanoita syöneiden sonnien. Rode ym. (1995) havaitsivat tutkimuksessaan, että A-vitamiini vaikutti positiivisesti sonnien sperman ja siittiöiden määrään.

Sperman siittiöitiheys oli pakastuksen jälkeen koeryhmässä suurempi kuin vertailuryhmässä, mutta siittiöiden elävyys vastaavasti heikompi. Tulos voisi viitata siihen, että mukana oli kuolleita tai viallisia siittiöitä lisäämässä koeryhmän sonnien sperman tiheyttä muttei elävyyttä. Virtaussytometrillä ei saatu selvitettyä kuolleiden siittiöiden osuutta, sillä sen avulla tarkasteltiin lähinnä solukalvon kuntoa. β -karoteenin oletettu antioksidanttivaikutus ei tässä tutkimuksessa parantanut siittiön solukalvon kykyä kestää pakastusta.

Jotta sonnien sperma-annokset hyväksyttiin pakastuksen jälkeen keinosiemennyskäyttöön ja voitiin myydä kentälle, tuli siittiöiden elävyyden olla pakastamisen jälkeen vähintään 40 % ja liikkuvuuden vähintään 50 %. Sekä koe- että vertailuryhmän tulokset olivat riittäviä pakastuksen jälkeisten laatuvaatimusten osalta.

6.4.3 Rehun energiapitoisuuden vaikutus sperman laatuun

Rehun energiapitoisuus vaikutti Dancen ym. (2016) tutkimuksessa positiivisesti sperman määrään. Sonneilta, joita ruokittiin 30 % yli ruokintasuositusten, saatiin kerättyä 9 % enemmän spermaa kuin ruokintasuositusten mukaan ruokituilta sonneilta. Sonnien sperma sisälsi kuitenkin enemmän kuolleita siittiöitä, vaikka elävien siittiöiden lukumäärässä ei ollut eroja. Kivesten rasvoittumista runsaan energiansaannin seurauksena on pidetty yhtenä syynä huonoon sperman laatuun, sillä kivespusseihin kertynyt liiallinen rasva voi vaikeuttaa kivesten lämmönsäätelyä, jolla on siittiöiden laadun kannalta oleellinen merkitys (Brown 1994). Porkkanoista saatava lisäenergia oli kuitenkin tässä koeksessä pieni, vain 4 %. On epätodennäköistä, että siitä saatu lisäenergia olisi vaikuttanut negatiivisesti spermantuotantoon.

6.5 Sonnien kivesten koko

Roden ym. (1995) tutkimuksessa A-vitamiinia saaneiden sonnien kivesten ympärysmitta oli suurempi kuin vertailuryhmässä. Dancen ym. (2016) tutkimuksessa sonnien kivesten koko korreloi sperman määrän kanssa, vaikka sperman laatua kivesten kasvanut koko ei kuitenkaan parantanut. Tässä tutkimuksessa koeryhmän sonnien kivesten ympärysmitta oli suuntaa antavasti pienempi kuin vertailuryhmässä. Vaikka erot sperman laadussa eivät todennäköisesti selity kivesten koolla, ei koon merkitystä voi täysin poissulkea.

6.6 Sonnin iän vaikutus sperman laatuun

Sperman laatu parani sonnin kasvaessa molemmissa ruokintaryhmissä sekä ennen pakastusta että pakastamisen jälkeen. Sperman laadun paraneminen on tavanomaista ja odotettavaa nuorsonnin kasvaessa (Kallio 1979). Ensimmäinen hyväksytty näyte saatiin vertailuryhmän sonneilta suuntaa antavasti aikaisemmin, joten porkanoista saadulla β -karoteenilisällä ei ollut positiivista vaikutusta sonnien spermantuotannon alkamisaikaan. Vertailuryhmän sonnit tuottivat laatuvaatimukset täyttävää spermaa koeryhmän sonneja aikaisemmin. Ero ryhmien välillä johtui mahdollisesti eroista sonnien sukukypsyyden alkamisajankohdissa, huolimatta siitä, että sonnit jaettiin käsittelyihin pareittain eikä sonnien päiväkasvuissa ollut eroa.

Sonnin sukukypsyyden alkamiselle tärkeiden, siittiöiden ravinnonsaannista huolehtivien Sertolin solujen jakautuminen loppuu 20-25 viikon iässä, eikä tämän jälkeen tapahtuneella ruokinnalla ole vaikutusta sukukypsyyden alkamisajankohtaan (Amann ja Schanbacher 1983, Barth ym. 2008). Koerehun syöttö alkoi sonnien ollessa 8 kuukauden, eli noin 34 viikon ikäisiä. Tämänkaltaisella ruokintakokeella ei näin ollen voida vaikuttaa sonnien puberteetin alkamisajankohtaan ja sen vaikutuksiin sperman laatuominaisuuksiin, sillä muutokset ruokinnassa on tehtävä aiemmin. Dancen ym. (2016) tutkimuksessa sonnien runsasenerginen ruokinta ennen 31 viikon ikää aikaisti niiden puberteetin alkua.

Aiemmin alkaneen puberteetin ansiosta vertailuryhmän sonnit olivat seksuaalisessa kehityksessä jatkuvasti hieman koeryhmän sonneja edellä. Se voi vaikeuttaa tulosten tulkitusta. Sonnin ikää ensimmäisen hyväksytyn näytteen aikaan olisi voinut kokeilla kovarianttimuuttujana tilastollisessa analyysissä, jotta olisi mahdollisesti voitu korjata ikävaikutusta ja ryhmien välinen vertailu olisi riippumatonta muista seksuaaliseen kehitykseen vaikuttavista seikoista.

Tavanomaisesti nuorsonnien spermaa aletaan keräämään Viking Geneticsin tuotantonavetassa 10 kk (40 vko) ikäisiltä sonneilta, eikä tämän tutkimuksen tuloksiin nojaten ole syytä muuttaa nykyistä toimintatapaa.

6.7 Spermatogeneesin kesto

β -karoteenin ja A-vitamiinin mahdolliset vaikutukset sperman laatuun vaativat aikaa. Spermatogeneesi, eli uusien siittiöiden muodostuminen, kestää sonnilla noin kaksi

kuukautta (Amann ja Schanbacher 1983, Frandson ym. 2003, McDonald ym. 2011). Pelkästään sen perusteella voidaan olettaa, että β -karoteenin vaikutukset sperman laatuun alkoivat näkyä aikaisintaan viikolla 42. Spermanäyteitä tarkasteltiin aikaväliltä, jolloin sonnit olivat 37-52 viikon ikäisiä. Tulosten tilastollinen tarkastelu sonnien ollessa 42-52 viikon ikäinen saattaisi poistaa spermatogeneesiin vaikuttavan ajan vaikutuksen. Pakastuksen jälkeisiä tuloksia saatiin sonnien ollessa vähintään 40 viikon ikäisiä, joten tulokset niiden osalta saattavat olla vertailukelpoisia spermatogeneesiin vaadittava aika huomioiden. On kuitenkin mahdollista, että tulokset olisivat olleet toisenlaisia, jos koe olisi kestänyt kauemmin tai vastaavasti, jos koerahun syöttö olisi aloitettu jo paljon ennen sonnien puberteetti-ikää.

6.8 Tutkimuksen rajoitukset

Tutkimus suoritettiin sonniaseman arjessa ja yritystoiminta asetti tietyt rajoitukset tutkimuksen toteuttamiselle. Tutkimukseen saadun eläinmäärän rajallisuuden vuoksi spermanäytteitä kerättiin myös sonneilta, joiden spermaa ei jalostusindeksien antamien tietojen pohjalta ollut tarkoituskaan pakastaa. Tällaiset sonnit haluttiin myös mahdollisimman nopeasti pois navetasta tilaa viemästä ja sen vuoksi hyväksytyjen sperma-annosten määrä rajattiin kahdeksaan. Määrä saattoi olla spermatogeneesiin vaadittava aika huomioiden liian vähäinen, jotta β -karoteenin vaikutukset sperman laatuun olisivat olleet nähtävissä.

7. Johtopäätökset

Porkkanasta saadusta β -karoteenilisästä ei ollut hyötyä nuorsonnien sperman laadun parantamiseksi tässä kokeessa. β -karoteenilisä kasvatti sperman tiheyttä, mutta elävyys oli suurempi vertailuryhmässä. Siittiöiden liikkuvuuteen β -karoteenilla ei ollut vaikutusta. Siittiöiden määrän lisääntyminen ei välttämättä paranna sperman hedelmöityskykyä, jos siittiöiden muut laatuominaisuudet eivät kasva.

β -karoteenilla ei ollut vaikutusta sperman laadun paranemiseen siten, että sonneilta olisi voitu kerätä laatuvaatimukset täyttäviä sperma-annoksia aikaisemmin. Ensimmäinen hyväksytty näyte saatiin vertailuryhmässä suuntaa antavasti aiemmin.

Sonnien perusruokinta vitamiinien saannin osalta tuki todennäköisesti riittävästi spermantuotantoa, eikä lisähyötyä ollut mahdollista saavuttaa porkkanasta saatavalla β -

karoteenilla. Erot koeryhmien välillä johtuivat todennäköisesti muista spermanlaatuun vaikuttavista seikoista kuin β -karoteenista, kuten yksilön genetiikasta ja sonnin puberteetin alkamisajankohdasta.

8. Kiitokset

Haluan kiittää Viking Geneticsiä mahdollisuudesta tämän tutkielman tekoon. Kiitokset Angelo Carluccio Netolle, Anne Oloselle sekä kaikille muille tutkimuksessa mukana olleille. Erityiset kiitokset työni ohjaajalle Tuomo Kokkoselle.

Lähteet

- Ahmed, H., Andrabi, S.M.H, Shah, S.A.H & Jahan, S. 2019. Effect of cryopreservation on casa characteristics, mitochondrial transmembrane potential, plasma and acrosome integrities, morphology and in vivo fertility of buffalo bull spermatozoa. *Cryo Letters* 40: 173-180.
- Almbro, M., Dowling, D.K. & Simmons, L.W. 2011. Effects of vitamin E and betacarotene on sperm competitiveness. *Ecology Letters* 14: 891-895.
- Althouse, G. & Hopkins, S.M. 1995. Assessment of board sperm viability using a combination of two fluorophores. *Theriogenology* 43: 595-603.
- Álvarez, R, Meléndez-Martínez, A.J, Vicario. I.M. & Alcalde, M.J. 2015. Carotenoid and vitamin A contents in biological fluids and tissues of animals as an effect of the diet: a review. *Food Reviews International* 31: 1–22.
- Amann, R.P & Schanbacher, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science* 57: 380-403.
- Arnett, A.M, Dikeman, M.E, Daniel, M.J., Olson, K.C, Jaeger, J. & Perrett. 2009. Effect of vitamin A supplementation and weaning age on serum and liver retinol concentrations, carcass traits, and lipid composition in market beef cattle. *Meat Science* 81: 596-606.
- Arruda, R.P, Silva, D.F, Alonso, M.A, Amdrade A.F.C, Nascimento, J., Gallego, M.S., Massami, M.K & Granato, T.M. Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallions. 2010. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39: 393-400.
- Ashizawa, K., Yoshifumi, T., Chikako K. & Yasuhiro, T. 2000. In vitro effects of β -carotene for the motility, ATP, and intracellular free calcium concentrations of fowl spermatozoa. *Molecular reproduction and development* 56: 99-104.
- Barth, A.D. & Kastelic, J.P. 2008. The effect of nutrition on sexual development of bulls. *Theriogenology* 70: 485-494.
- Berg, H.F., Kommisrud, E., Bai, G., Gaustad, E.R, Klinkenberg, G., Standerholen, F.B, Thorkildsen, L.T, Waterhouse, K.E, Ropstad, E., Heringstad, B. & Alm-Kristiansen, A.H. 2018. Comparison of sperm adenosine triphosphate content, motility and fertility of immobilized and conventionally cryopreserved Norwegian Red bull semen. *Theriogenology* 121:181-187.

- Dance, A. Thundathil, J., Blodin, P. & Kastelic, J. 2016. Enhanced early-life nutrition of Holstein bulls increases sperm production potential without decreasing postpubertal semen quality. *Theriogenology* 86: 687-694.
- El-Demerdash, F.M, Yousef, M.I, Kedwany, F.S & Baghdadi, H.H. 2004. Role of α -tocopherol and β -carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hematobiochemical parameters, and semen quality of male rats. *Journal of Environmental Science and Health – Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 39: 443-459.
- Eurofins CLF. 2012. Determination of vitamin A (retinol), vitamin E ((\pm)- α -tocopherol) and β -carotene in foodstuffs by HPLC-UV. European Standard DIN EN 12823-2. https://members.aoac.org/AOAC_Docs/SPSFAM/INGR-14.pdf. Eurofins CLF specialised nutrition testing. Julkaistu 2012. Viitattu 10.12.2019.
- Fineli. 2020. Porkkana.
<https://fineli.fi/fineli/fi/elintarvikkeet/300?q=porkkana&foodType=ANY&portionUnit=G&portionSize=100&sortByColumn=points&sortOrder=asc&component=2331>&. Terveysten ja hyvinvoinninlaitos. Julkaistu 2020. Viitattu 22.9.2020.
- Frandsen, R.D., Wilke, W.L. & Fails, A.D. 2003. *Anatomy and physiology of farm animals*. Kuudes painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 481 s.
- Fuerst-Waltl, B., Schwarzenbacher, H., Perner, C. & Sölkner, J. 2005. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Australian Simmental bulls. *Animal Reproductive Science* 95:27-37.
- Ghyasvand, T., Goodarzi, M.T, Amiri I., Karimi, J. & Ghorbani, M. 2015. Serum levels of lycopene, beta-carotene, and retinol and their correlation with sperm DNA damage in normospermic and infertile men. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 13: 787-792.
- Hlungwani, C., Siebrits, F.K & Nedambale, T.L. 2015. Effects of inclusion of polyunsaturated fatty acids and antioxidants on spermatozoa morphology of Potchefstroom koekoek cockerels. *Open Journal of Animal Science* 5: 157-162.
- Jukola, E. 1994. Selenium, vitamin E and beta-carotene status of cattle in Finland, with special reference to epidemiological udder health and reproduction data. Väitöskirja. Eläinlääketieteellinen korkeakoulu. Helsinki. 195 s.
- Kallio, M. 1979. Sperman määrän ja laadun perinnöllisyydestä Salpausselän keinosiemennysyhdistyksen sonneilla. Kotieläinten jalostustieteen laitos. Helsingin yliopisto. 90 s.

- Karoui, S., Díaz, C., Serrano, M., Cue, R., Celorrio, I. & Carabaño, M.J. 2011. Time trends, environmental factors and genetic basis of semen traits collected in Holstein bulls under commercial conditions. *Animal Reproductive Science* 124: 28-38.
- Keogh, L.M, Byrne, P.G. & Silla, A.J. 2018. Effect of long-term dietary beta-carotene supplementation on sperm concentration and motility in an endangered amphibian. *Animal Reproductive Science* 195: 259-265.
- Kocks, J.E.M. & Broekhuijse, M.L.W.J. 2014. The practical use of density of whole bull semen to determine the volume of an ejaculate at AI laboratories. *Animal Reproduction Science Journal* 146: 98-102.
- Koskimies, A.I., Savander, M., Nordström, A-M., & Kurunmäki, H. 2010. Siittiöiden DNA:n vauriot ja miehen hedelmättömyys. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 126: 2837-2842.
- Kruk, Z.A, Bottema, C.D.K, Davis, J.J, Biebert, BD, Harper, G.S, Di, J. & Pitchford, W.S. 2008. Effects of vitamin A on growth performance and carcass quality in steers. *Livestock Science* 119: 12-21.
- Luke. 2015. Rehutaulukot ja ruokintasuositukset. Luonnonvarakeskus. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-326-054-2>.
- Lunstra, D. 1982. Testicular Development and Onset of Puberty in Beef Bulls. *Beef Research Program* 1:26-27.
- Majzoub, A., Agarwal, A. & Esteves, S.C. 2017. Antioxidants for elevated sperm DNA fragmentation: a mini review. *Translational Andrology and Urology* 6: 647-648.
- McDonald, P., Edwards, R.A, Greenhalgh, J.F.D, Mogan, C.A, Sinclair, L.A & Wilkinson, R.G. 2011. *Animal nutrition. Seitsemäs painos*. Harlow: Pearson. 692 s.
- Meza-Herrera, C.A, Reyes-Avila, J.M., Tena-Sempere, M., Veliz-Deras, F.G, Macias-Cruz, U., Rodriguez-Martinez, R. & Arellano-Rodriguez, G. 2014. Long-term betacarotene supplementation positively affects serum triiodothyronine concentrations around puberty onset in female goats. *Small Ruminant Research* 116: 176-182.
- Meza-Herrera, C.A., Vargas-Beltran, F., Tena-Sempere, M., González-Bulnes, A., Macias-Cruz, U. & Veliz-Deras, F.G. 2013. Short-term beta-carotene-supplementation positively affects ovarian activity and seruminsulin concentrations in a goatmodel. *Journal of Endocrinological Investigation* 36: 185-189.

- Meza-Herrera, C.A., Vargas-Beltran, F., Vergara-Hernandez, H.P., Macias-Cruz, U., Avendaño-Reyes, L., Rodriguez-Martinez, R., Arellano-Rodriguez, G. & Veliz-Deras, F.G. 2013. Betacarotene supplementation increases ovulation rate without an increment in LH secretion in cyclic goats. *Reproductive Biology* 13: 51-57.
- Pesonen, M. 2013. Emojen ja kasvavien nautojen kivennäisten tarve. MTT <https://core.ac.uk/download/pdf/52249034.pdf>. Julkaistu 2013. Viitattu 10.1.2020.
- Paes de Arruda, R, Franco da Silva, D, Alonso, M.A, Cesar de Andrea, A.F, Nascimento, J, Mejia Gallego, A, Massami, S.M, Martins, K. & Granato, T.M. 2010. Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallion. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39:393-400.
- Pyörälä, S. & Tiihonen, T. 2005. Nautojen sairaudet. Helsingin Yliopisto. Eläinlääketieteellinen tiedekunta. Oppimateriaalia 6. Helsinki. <http://hdl.handle.net/1975/544>
- Rode, L.M, Coulter, G.H, Kastelic, J.P & Bailey, R.D.C. 1995. Seminal quality and sperm production in beef bulls with chronic dietary vitamin A deficiency and subsequent re-alimentation. *Theriogenology* 43: 1269-1277.
- Rowe, M, Tourville, E.A. & McGraw, K.J. 2012. Carotenoids in bird testes: Link to carotenoid supplies plumage coloration, body mass and testes mass in house finches (*Carpodacus mexicanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology – B Biochemistry and Molecular Biology* 163: 285-291
- Strzezek J., Fraser, L., Kuklinska, M., Dziekonska, A. & Lecewicz, M. 2004. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reproductive Biology* 4:271-287
- Tizkar, B, Kazemi, R, Alipour, A., Seidavi, A., Naserlavi, G. & Ponce-Palafox, J.T. 2015. Effects of dietary supplementation with astaxanthin and β -carotene on the semen quality of goldfish. *Theriogenology* 84: 1111-1117.
- Tsantarliotou, M.P & Sapanidou, V.G. 2018. Importance of antioxidants in sperm quality and in vitro embryo production. *Journal of Veterinary Andrology* 1: 1-12.
- USDA. 2020. Carrots, raw. Agricultural research service. U.S. Department of agriculture. USA. <https://ndb.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170393/nutrients>. Julkaistu 2019. Viitattu 22.9.2020.
- Väänänen, S. 2012. Prosessoinnin vaikutus ammattikeittiössä käytettyjen porkkanatuotteiden ravintosisältöön. Maisterin tutkielma. Itä-Suomen yliopisto. 48 s.

- Weiss, R.R., Klug, E. & Ahlswede, L. 1979. Características do sêmen de touros jovens alimentados com carência de β -caroteno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 3:7-16.
- Yasar, C.A. & Abdullah, G. 2006. Relationship between vitamin A and beta-carotene levels during the postpartum period and fertility parameters in cows with and without retained placenta. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 50: 93-96.
- Zaneveld, L. J.D & Chatterton, R.T. 1982. *Biochemistry of mammalian reproduction*. New York: John Wiley & Sons. 561 s.
- Zareba, P., Colaci, D.S., Afeiche, M., Gaskins, A.J., Jørgensen, N., Mendiola, J., Swan, S.H. & Chavarro, J.E. 2013. Semen quality in relation to antioxidant intake in a healthy male population. *Fertility and Sterility* 100:1572-1579.
- Zini, A., San Gabriel, M. & Baazeem, A. 2009. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *Journal of Assist Reproductive Genetic* 26: 427-432.