



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Könsselektering av spermier från lantbrukets husdjur

Carolina Markey

Examensarbete, 15 hp

Agronomprogrammet - Husdjur, examensarbete för kandidatexamen

Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Uppsala 2011

Sveriges lantbruksuniversitet



Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Könsselektering av spermier från lantbrukets husdjur

Sex selection of sperm in farm animals

Carolina Markey

Handledare:

Anders Johannisson, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Examinator:

Andrzej Madej, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Kandidatarbete i husdjursvetenskap

Kurskod: EX0553

Program: Husdjursagronom

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2011

Omslagsbild: -

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Könsselektering, sperma, nöt, häst, får, gris, användning, nackdelar

Key words: Sexing, sperm, bovine, horse, sheep, swine, application, disadvantages

Abstract

Millions of preselected progeny have been born since the development of The Beltsville Sperm Sexing Technology 1986. The method is based on flow cytometry and sorting is done on the basis of DNA difference of the X- and Y-chromosomes. Preselection of progeny provides an opportunity to obtain genetic gain and increased production as well as increased animal welfare and decreased environmental impact. However, the method is associated with low fertility, high costs and uncertainty whether the sorting process contributes to DNA damage and thereby results in genetically impaired progeny. Today, sex sorted sperm is only commercially available in the bovine industry, due to the fact that bull sperm is more suitable for selection than sperm from other species. Application of sex selected sperm leads to high fertility results in sheep and a commercialization might soon be available but the profitability of the production is questioned. The sorting process is too slow to sort the high amount of sperm that is needed for successful insemination of pigs. However, deep intrauterine insemination (DUI) with a Fireflex® catheter might be a future alternative for application of sex sorted sperm in the swine industry. Insemination of stallion sperm with hysteroscopy has been proven successful but the method is limited due to high costs and low fertility results. For commercialization of sex sorted sperm on any other animal species than bovine, the technology of the sorting process has to be simplified and made more effective, and more studies have to be done to investigate the impact of the sorting process on the sperm.

Sammanfattning

Miljontals förselekterade avkommor har fötts sedan utvecklandet av The Beltsville Sperm Sexing Technology 1986. Metoden baseras på flödescytometri och sorteringen sker med avseende på skillnaden i X- och Y-kromosomernas DNA-innehåll. Förselektering av avkommor innebär en möjlighet till ökat genetiskt framsteg och högre produktion såväl som ökad djurvälstånd och minskad miljöpåverkan. Metoden förknippas dock med låg fertilitet och höga kostnader samt spekulationer om huruvida sorteringsprocessen kan skada DNAt och därmed resultera i avkommor med genetiska defekter. Könnsselektering av spermier görs idag kommersiellt endast på nöt då dessa spermier lämpar sig bättre för sortering än spermier från andra arter. På får erhålls höga fertilitetsnivåer och en kommersialisering kan snart komma att ske. Dock ifrågasätts produktionens lönsamhet. Sorteringsprocessen är för långsam för att sortera det stora antal spermier som behövs för insemination av gris. Dock kan deep intrauterine insemination (DUI) med hjälp av en Fireflex® kateter erbjuda ett framtida alternativ för användning av könnsselekterade spermier inom grisproduktionen. Inseminering av hingstsperma med hjälp av hysteroskopi har visat sig vara framgångsrikt men metoden begränsas fortfarande av höga kostnader och låga fertilitetsnivåer. För att en kommersialisering av könnsselekterad sperma på andra djurslag än nöt skall vara aktuell, krävs en förenkling och effektivisering av sorteringsprocessen samt vidare studier för att utreda sorteringsprocessens effekt på spermerna.

Introduktion

Könnsselektering av spermier anses idag vara ett av de mest revolutionerande framstegen inom reproduktionsteknologin (Vazquez et al., 2009) då det innebär en möjlighet att dra fördel av och utnyttja könsbegränsade och könsinfluerade egenskaper hos djuren (Foote & Miller, 1971). Därmed kan större genetiska framsteg och högre produktion (Johnson et al., 1989; Rath et al., 2009), såväl som ökad djurvälstånd och minskad miljöpåverkan uppnås, vilket

vidare resulterar i förbättrad ekonomi för producenten (Welch & Johnson, 1999; Rath et al., 2009).

Idag är The Beltsville Sperm Sexing Technology den enda kommersiellt applicerbara metoden inom könsselektering av spermier (Johnson et al., 1989; de Graaf et al., 2009) och miljontals förselektade avkommor av olika arter har fötts sedan utvecklandet av metoden 1986 (Johnson & Pinkel, 1986; Johnson et al., 1989; Garner, 2009). Metoden lanserades kommersiellt år 2000 i Storbritannien (Seidel, 2003b) och anammades av svenska Viking Genetics år 2008 (Stålhammar, 2011 personligt meddelande). Idag används metoden i flera länder runt om i världen, men främst i USA där efterfrågan på kvigor för rekrytering är som störst (Rath et al., 2009). Selektionen baseras på flödescytometrisk sortering av gameterna med avseende på skillnaden mellan X- och Y-kromosomernas DNA innehåll (Johnson & Pinkel, 1986), där X-kromosomen alltid innehåller mer DNA än Y-kromosomen (Johnson, 1992). Hos domesticerade däggdjur skiljer sig innehållet av DNA i X- och Y-kromosom med 3,6 - 4,2 % beroende på art (Johnson & Welch, 1999).

Efterfrågan på könsselektade spermier är beroende av ekonomisk vinning, effektivitet och användbarhet (Johnson, 2000; Maxwell et al., 2004). Detta begränsar användningen av könsselektade spermier på grund av brister i teknologin förknippade med framförallt minskad fertilitet (Johnson et al., 1989; Maxwell et al., 2004) och höga kostnader (Johnson et al., 2005). Trots att metoden har genomgått en rad förbättringar under åren, kvarstår det faktum att funktionen till viss del får ge vika för brister i teknologin (de Graaf et al., 2009). Detta har lett till att nya metoder har testats men inga har hittills lyckats tillgodose kraven på precision och bibehållen fertilitet (Seidel, 2007).

Selektion av spermier kan idag göras på alla produktionsdjur utom fjäderfä (Maxwell et al., 2004; Garner, 2006) då könen hos dessa bestäms av ägget och ej av spermien (Seidel, 2003b). Vid sortering kan en säkerhet på över 90 % uppnås (Johnson et al., 1989). Skillnader i olika arters såväl som olika rasers (Garner et al., 1983) reproduktionsfysiologi och anatomi (de Graaf et al., 2009) leder dock till skillnader vad gäller metodens applicerbarhet på det specifika djuret och idag används könsselektade spermier kommersiellt endast inom nötproduktionen (Rath & Johnson, 2008, Vazquez et al., 2009). Det finns även individuella skillnader vad gäller sortering av det enskilda handjurets spermier och vissa individer lämpar sig därför bättre för detta ändamål (Garner, 2006; de Graaf et al., 2009).

Könsselektering av spermier kan även användas inom uppfödning av sport- och sällskapsdjur och för bevarande av utrotningshotade arter (Seidel & Johnson, 1999; Maxwell et al., 2004). Inom humanmedicinen kan metoden användas för att minska risken för könsbundna sjukdomar genom att undvika födsel av pojkar, vilka löper större risk att drabbas av de X-kromosombundna sjukdomarna (Fugger, 1999; Seidel & Johnson, 1999). I denna litteraturstudie kommer dock endast produktionsdjuren nöt, gris och får samt häst att behandlas. Syftet är att utreda den befintliga kommersiella användningen av könsselektering av spermier och anledningen till att denna endast appliceras på nöt. Framtida utsikter för en bredare och än mer ekonomiskt försvarbar användning av metoden inom djurproduktionen kommer att utredas såväl som skillnader inom de olika djurslagen.

Metoder för sortering

Hastigheten för sortering beror på orienteringen av spermier (Garner, 2001) och dagens ”high-speed-sorting-system” kan sortera uppemot 15 miljoner spermier/timme av vardera kön (Johnson et al., 2005). Skillnaden i mängden DNA mellan X- och Y-kromosomerna såväl som spermernas huvudform har betydelse för hur lätt och med vilken hastighet separationen kan ske. Ju större skillnaden är i DNA-innehåll desto lättare identifieras en X- respektive Y-kromosombärande spermie (Johnson & Welch, 1999) och ju plattare och ovalare huvudet är, desto lättare orienteras spermierna då de mäts i flödescytometern (Garner, 2006).

Flödescytometri

Vid separering av spermier med hjälp av flödescytometri inkuberas ett spätt spermieprov med den ljusblåfluorescerande färgen Bisbenzimid Hoechst 33342 (Johnson & Pinkel, 1986; Seidel, 2007). Färgen penetrerar cellmembranet och binder till den dubbelsträngade DNA-helixen varvid infärgning av cellen sker proportionellt till mängden DNA (Seidel, 2007; Rath & Johnson, 2008). För identifiering av döda och skadade spermier tillsätts röd livsmedelsfärg (FD & C # 40) vilken dämpar fluorescensen från Hoechst 33342 hos spermier med skadat cellmembran (Johnson & Welch, 1999; Garner, 2006). Efter inkuberingen passerar spermiespädningen under tryck genom en flödescytometer (Rens et al., 1998; Evans et al., 2004; Johnson et al., 2005). Med hjälp av ett orienteringsmunstycke orienteras spermierna till en UV-laser med specifik våglängd (Rens et al., 1998), där de belyses en och en. Styrkan på fluorescensen från spermies kant samt från dess platta sida mäts (Seidel & Garner, 2002; Johnson et al., 2005; Vazquez et al., 2009) med hjälp av detektorer placerade i 0° och 90° vinkel i relation till excitationsskällan (Seidel & Garner, 2002; Johnson et al., 2005). Då spermierna lämnar flödescytometern omsluts de av droppar vilka bildas av vätskan i spermiespädningen till följd av vibration med hög hastighet i flödescytometerns mynning (Johnson, 1992; Seidel, 2007). Baserat på skillnaden i det fluorescerande ljuset får de Y-kromosombärande dropparna en positiv laddning och de X-kromosombärande dropparna en negativ laddning (Seidel & Garner, 2002) varefter de kan separeras, med hjälp av elektriska fält, till två olika rör (Johnson, 1992; Seidel & Garner, 2002; Rath et al., 2009). De droppar som inte innehåller någon eller för många spermier samt de droppar som innehåller celler som inte har den önskade fluorescensen förblir oladdade och faller rakt ner i området mellan rören och reduceras på så vis från de erhållna spermieproven (Johnson, 1992; Seidel, 2007). Rören till vilka de separerade spermierna sorteras är behandlade med bovint serum-albumin (BSA) för att undvika att spermierna fastnar på väggarna. De innehåller dessutom äggula (Rath et al., 2009) vilket bidrar till en gynnsam miljö för bibehållen viabilitet (Johnson et al., 1999; Seidel & Garner, 2002). För att kunna förvaras och därmed användas för artificiell insemination (AI) koncentreras spermierna genom centrifugering (Johnson et al., 2005; Rath et al., 2009). Därefter späds de med ett medium vilket lämpar sig bättre för förvaring under längre tid (Johnson et al., 1999; Rath et al., 2009).

Efter sortering valideras andelen X- och Y-kromosombärande spermier i spermadoserna genom reanalys (Johnson et al., 1989; Welch & Johnson, 1999), fluorescence in situ hybridization (FISH) (Johnson et al., 2005) eller PCR (Welch et al., 1995).

Sexcess®

För att minimera reduceringen av könsslekterade spermiers fertiliserande förmåga har en utveckling av Beltsville Sperm Sexing Technology skett, vilken går under namnet Sexcess®. Förändringarna innefattar bland annat temporär inhibering av spermierna under sorteringsprocessen med hjälp av fluorider, supplementering med antioxidanter samt en

nedkylning i tre steg till 4° C. Vidare har den vattenkylda Argonlasern bytts ut mot en pulslaser (Rath & Johnson, 2008). Sexcess® huvudsakliga effekt är att öka livslängden på spermerna efter upptining genom att bidra till bibehållen motilitet, viabilitet och akrosomal integritet. Initiala resultat från studier utförda på nöt har visat likvärdiga resultat, vad gäller antal födda kalvar, efter insemination med osorterade spermier och spermier sorterade efter Sexcess® protokoll. Vidare indikerar en utvärdering av spermernas kvalitet inte på några skillnader mellan selekterade och oselecterade spermier (Rath et al., 2009).

Nackdelar med teknologin

Under sorteringsprocessen genomgår spermerna många steg vilka kan stressa, skada eller döda dem. Dessa innefattar den tid spermerna är *in vitro*, höga grader av utspädning, infärgning av kärnan, UV-strålning, högt tryck (Rath et al., 2009) samt centrifugering, inkubering och elektrisk laddning (Rath et al., 2009). Teknologin är dessutom relativt långsam och kräver dyra och immobila instrument samt extremt kunnig personal (Blecher et al., 1999).

Mutagena effekter

Forskare har länge diskuterat huruvida faktorer under sorteringsproceduren kan påverka spermernas DNA och därmed leda till genetiska defekter på avkommor (Garner 2001). Detta gäller främst infärgning med Hoechst 33342 och belysning med UV-strålning (Seidel, 2007). Då de flesta nukleinsyrefärger är mutagena (Garner, 2009) spekuleras det i huruvida detta även innefattar Hoechst 33342 (Evans et al., 2004). Risken för detta är dock mindre då Hoechst 33342 binder till DNA:s ”minor groove” snarare än till DNA-strängarna, och färgen torde därför vara relativt icke-toxisk (Evans et al., 2004). Studier har visat att DNA-strukturen i somatiska celler tar skada vid infärgning med Hoechst 33342 (Garner, 2009) men Catt et al. (1997) fann ingen påverkan på spermiers DNA efter att ha utsatts för höga koncentrationer av färgen.

Även om Hoechst 33342 i sig inte påverkar spermerna negativt kan infärgning i kombination med UV-laser göra det (Rath & Johnson, 2008). I en studie på hamsterspermier genomförd av Libbus et al. (1987) kunde inga abnormiteter i kromosomstrukturen på grund av Hoechst 33342 påvisas. Däremot uppstod en ökning av kromosomala aberrationer till följd av att spermier färgade med Hoechst 33342 utsattes för UV-strålning. I studien visade 38 % av spermerna kromosomala abnormiteter, jämfört med 4-7% av äggen. Det bör dock beaktas att spermerna i detta experiment kan ha tagit skada av den omilda behandling de utsattes för innan injektion i äggen (Garner, 2009). Vidare visade en studie genomförd på grisar av Parrilla et al. (2004) att varken Hoechst 33342 eller UV-strålning resulterade i kromosomala abnormiteter.

Än så länge har inga uppenbara genetiska defekter på avkommor producerade med könsslekterade spermier observerats (Seidel, 2003b; Garner, 2009). I en omfattande studie gjord på 1169 kalvar från sorterad och 793 från osorterad sperma av Tubman et al. (2004) observerades inga skillnader i antal levande födda kalvar, längden på dräktighet, födelsevikt eller vikt vid avvänjning. Inte heller observerades någon ökning i aborter, neonatala dödsfall eller kalvningssvårigheter varför slutsatsen drogs att kalvar från sorterad sperma utvecklas normalt både post- och prenatalt. Inte heller i en studie av Seidel et al. (1999b) observerades någon ökning i missfall mellan första och andra dräktighetsmånaden och väldigt få från andra månaden fram till kalvning. Möjligen kan det faktum att spermiers DNA är tätare packat och därmed bildar stabilare kromatinstrukturer än hos somatiska celler innebära att dessa är mindre känsliga för infärgning med Hoechst 33342 och UV-ljus (Maxwell et al., 2004).

Fertilitet och embryoutveckling

Användning av könsselektad sperma har visat sig minska andelen dräktiga djur i flertalet studier (Cran et al., 1997; Seidel et al., 1999a; Grossfeld et al., 2005). Även inom nötköttsproduktionen, där metoden har använts i ett decennium, är fertiliteten efter sortering och frysning av spermier fortfarande varierande (Rath et al., 2009). En anledning till detta kan vara det reducerade antalet spermier i AI-doser av könsselektad sperma. Sortering med hjälp av flödescytometri resulterar idag i upp till 20 miljoner spermier/timme. Trots att detta är en markant förbättring sedan utvecklandet av metoden, sorteras spermier fortfarande en och en vilket gör att metoden är relativt ineffektiv (Seidel, 2007; Johnson et al., 1999; Rath & Johnson, 2008). Andelen levande spermier minskar ytterligare om spermier fryses efter sortering (Maxwell et al., 2004). Till följd av dessa faktorer krävs färre spermier per AI-dos, jämfört med konventionella doser, för att tekniken skall vara ekonomiskt försvarbar (Rath et al., 2009).

Ytterligare en förklaring till den försämrade fertiliteten kan vara minskad motilitet hos könsselektade spermier på grund av infärgning med Hoechst 33342. För infärgning av 150×10^6 spermier/ml krävs ca $75 \mu\text{M}$ Hoechst 33342 (Johnson et al., 1999) och en studie på grisar utförd av Vazquez et al. (2002) visade ingen skillnad i motiliteten hos spermier koncentrerade till 30 miljoner/ml vilka infärgats med 9, 18 och $27 \mu\text{M}$ Hoechst 33342. Däremot minskade motiliteten signifikant vid infärgning med $60 \mu\text{M}$ och efter infärgning med $90 \mu\text{M}$ var spermier helt immobiliserade. I studien observerades inte heller någon minskning i fertilitet hos saggisar inseminerade med spermier vilka färgats med $27 \mu\text{M}$. Förändringar i spermiers motilitet vid höga doser Hoechst 33342 kan enligt Vazquez et al. (2002) bero på att processen leder till minskat syreupptag och minskad metabolisk aktivitet hos spermier.

Hoechst 33342 kan överföras från spermien till pronukleus under befruktningen vilket kan fördröja embryots utveckling (Garner, 2009). I en studie av Lu et al. (1999) observerades inga skillnader i utvecklingen från oocyt till pronukleus mellan sorterad och osorterad sperma, dock fördröjdes och minskade produktionen av blastocyster från pronukleus. Detta går emot en studie av Zhang et al. (2003) där inga signifikanta skillnader i utvecklingen av blastocyster påvisades, däremot observerades en minskning av blastocysternas delningsgrad. Enligt författarna kan skillnaden mellan studier bero på vilka tjurar som används då resultaten tyder på att skillnader i utveckling av blastocyster likväl som delningsprocessen förekommer mellan individer. Vidare resulterade en studie av Palma et al. (2008) i minskad delningsgrad samt minskad utveckling av blastocyster efter befruktning med sorterade spermier. Studien visade även att könsselektade spermier hade sämre motilitet jämfört med oslektade, vilket korrelerade väl med den minskade utvecklingen av blastocyster ($r^2 > 0.70$). I studien framkom dessutom att blastocyster producerade med hjälp av könsselektade spermier innehöll mindre andel organeller så som rough ER, mitokondrier och kärnmembran, vilket kan vara en bidragande faktor till den reducerade embryoutvecklingen. En studie av Morton et al. (2007) visar dessutom att embryon befruktade med sorterad sperma innehåller minskad andel genprodukter från generna glukos-3 transporter (Gluc-3) och glukos-6-fosfat dehydrogenas (G6PD), vilka är viktiga för den embryonala utvecklingen.

Även belysning med UV-strålning kan påverka den embryonala utvecklingen. En studie utförd på gris av Guthrie et al. (2002) visar att strålning med UV-laser på 125mW inte påverkar andelen befruktade ägg eller hastigheten på den embryonala utvecklingen. Dock minskade andelen befruktade ägg samt embryonas utvecklingshastighet vid en sänkning av laserintensiteten från 125 mW till 25 mW . Ingen skillnad på embryots normala utveckling

observerades dock vid behandling med de olika intensiteterna eller efter befruktning med osorterad sperma, vilken ej belystes med UV-ljus.

I ett försök av Garner & Suh (2002) framkommer det att den mekaniska stressen har större inverkan på spermernas livsduglighet än Hoechst 33342 och UV-strålning. Detta innefattar bland annat effekter av utspädning och flödestryck. I en studie genomförd av Suh et al. (2005) observerades en ökning i spermernas motilitet vid en sänkning av trycket från 50 psi till 25 psi. Dock innebär en sänkning i tryck även reducerad sorteringshastighet varför en allt för stor sänkning kan te sig ineffektivt för de arter vilkas spermier är svårare att sortera (Garner, 2006). Numera passerar spermerna under ett tryck på 40 psi och studien av Suh et al. (2005) visar att sänkningen av trycket från 50 psi ökar spermernas motilitet utan att påverka sorteringshastigheten. Sänkningen har även visat sig ha en gynnsam effekt på den embryonala utvecklingen (Garner, 2009).

Under sorteringsprocessen späds spermerna innan och efter infärgning samt i flödescytometern och spädningsgraden kan i vissa fall uppgå till 4000 (Maxwell et al., 2004). Då spädning innebär att viktiga komponenter i seminalplasman, så som antioxidanter och membranstabiliserande proteiner, får reducerad effekt till följd av minskad koncentration (Maxwell et al., 2004) påverkas spermernas motilitet och vitalitet och därav även dess befruktande förmåga (Catt et al., 1997; de Graaf et al., 2009). Att tillföra 10 % seminalplasma vid infärgning förebygger dock förändringar i cellmembranen och tillsatts av seminalplasma i uppsamlingsmedier ökar spermernas vitalitet (Maxwell et al., 1996). Frånvaro av antioxidanter har visat sig ha stor påverkan på spermernas vitalitet då dessa skyddar mot de reaktiva syreföreningar (ROS) som uppkommer under sorteringsprocessen och som reducerar spermernas mitokondriella aktivitet (Klinc & Rath, 2007). Vidare kan den elektriska laddningen, enligt Rath et al. (2009), bidra till att membranen i spermernas mittstycke depolariseras.

Bakgrunden till den reducerade fertiliteten, huruvida det beror på skador på spermier (Guthrie et al., 2002) eller dess DNA eller huruvida det beror på andra omkringliggande faktorer så som storlek på dos, tidpunkt för inseminering eller reducerad vitalitet för spermerna i honans reproduktiva organ är fortfarande okänt (Maxwell et al., 2004). En studie av Frijters et al. (2009) visade att den reducerade fertiliteten till två tredjedelar orsakades av det låga antalet spermier och resterande del orsakades av skador på spermerna. Vidare tyder resultat från en studie av Schenk et al. (2009) på att den reducerade fertiliteten orsakas helt av det låga antalet spermier i könsslekterade AI-doser.

Den försämrade fertiliteten innebär att användandet av könssorterad sperma kräver extremt noggrann hantering och timing vid sortering, insemination och lagring för att uppnå optimala förutsättningar för befruktning (Seidel & Garner, 2002; Rath et al., 2009). Kort livslängd i honans reproduktiva organ för sorterade spermier innebär att det är av stor vikt att insemination sker i samband med ovulationen (Maxwell et al., 2004).

Ekonomi

Implementering av könsslekterad sperma i produktionen innebär stora investeringar och få seminföretag har det kapital som krävs för att genomföra detta (Garner, 2006). Kostnaden för en modifierad flödescytometer är cirka 350 000 dollar (Seidel, 2007). Till detta tillkommer höga kostnader för installation och underhåll av utrustning. Seidel (2003a) uppskattade att kostnaderna det första året av produktionen kan komma att överstiga 2 miljoner dollar. De höga fixa kostnaderna innebär att sortering ofta sker 14-16 timmar per dag eller mer (Seidel,

2007) varvid höga kostnader för utbildad personal tillkommer (Seidel, 2003b; Rath & Johnson, 2008).

För lantbrukaren innebär användning av könsslekterade spermier högre kostnader för semindoser samt kostnader som uppkommer till följd av lägre fertilitet (De Vries et al., 2008), så som foderkostnader för hållning av djur som ej producerar (Seidel, 2003b). Kostnaden för en dos könsslekterad tjursperma är cirka tre gånger så hög som för en konventionell dos (Stålhammar, 2011 personligt meddelande).

Applicering inom olika djurslag

Nöt

Könsslekterade spermier används inom mjölkproduktionen för produktion av kvigkalvar för rekrytering till den egna besättningen eller till försäljning. Genom att använda semin från de tjurar med bäst mjölkegenskaper till de bästa avelskorna/kvigorna erhålls ett genetiskt framsteg för mjölkproduktion (Hohenboken, 1999; Rath & Johnson, 2008). Det kor som inte längre platsar för avel av mjölkdjur kan istället ingå i avel för kött-mjölkraskorsningar (Hohenboken, 1999; Seidel, 2007). Då kvigkalvar väger ca 2 kg mindre än tjurkalvar (Seidel, 2007) innebär födsel av kvigkalvar minskad risk för dystocia (Norman et al., 2010). Å andra sidan korrelerar avkommans födelsevikt och kons mjölkavkastning positivt, varför födsel av kvigkalvar kan missgynna mjölkproduktionen. Inom köttproduktionen är tjurar mer eftertraktade än kvigor då tjurarna har en högre tillväxt (Foote & Miller, 1971). Vidare kan förselekterade kvigor och tjurar användas som avelsdjur inom både mjölk- och köttproduktionen (Hohenboken, 1999; Seidel, 2007). I Sverige är användningen av könsslekterad sperma fortfarande relativt begränsad och står för cirka 2-4% av insemineringarna (Stålhammar, 2011 personligt meddelande).

Könsslekterad sperma rekommenderas främst till kvigor, då det på kor resulterar i allt för få kalvningar (Rath & Johnson, 2008; Norman et al., 2010). Om könsslekterad sperma ändå används på kor uppnås bästa resultat på andra- och tredjegangskalvare vilka visar stark brunst (Viking Genetics, 2011).

Tjurspermier lämpar sig bättre för könsslektering än spermier från andra arter (Rath & Johnson, 2008) tack vare en area på spermiers huvud på $34,5 \mu\text{m}^2$ samt en skillnad i X- och Y-spermiernas DNA innehåll på 3,8 %. Dessa attribut resulterar i ett selektionsindex, det vill säga en uppskattning av spermiers sorterbarhet, på 131 (Garner, 2006). Skillnader mellan raser förekommer dock då till exempel Jerseykons DNA skiljer sig mer än DNA från Holstein, Hereford och Angus (Garner et al., 1983). Frysning lämpar sig oftast bättre för tjursperma än för sperma från andra arter. Detta beror dels på stora skillnader mellan olika tjurar vad gäller spermiers kvalitet och dels på att inseminering sker lättare på nöt än på andra produktionsdjur. Dessutom är infrastrukturen kring transport och försäljning av tjursperma mer utvecklad än för andra arter. Dessa faktorer har bidragit till att en kommersialisering av könsslekterade spermier har varit möjlig inom nötproduktionen (Seidel, 2003b).

En sorterad AI-dos innehåller 15-20 miljoner tjurspermier (Frijters et al., 2009), jämfört med en dos könsslekterade tjurspermier vilken innehåller ca 2 miljoner levande spermier (Rath & Johnson, 2008). Detta trots att det tycks krävas fler än 2 miljoner spermier för att uppnå

önskvärda dräktighets- och kalvningsnivåer (Andersson et al., 2006). Studier har visat att 2 miljoner könsslekterade spermier inseminerade i livmoderhornet resulterar i dräktiga kvigor med såväl färsk (Seidel et al., 1997) som frusen och därefter tinad (Seidel et al., 1999a) sperma. Försöken resulterade dock i sämre fertilitetsnivåer. Trots framsteg inom teknologin är inseminering med sorterad tjursperma fortfarande bristfällig (de Graaf et al., 2009) och studier har visat på fertilitetsnivåer hos kvigor på 60-90% jämfört med oselektad sperma (Schenk et al., 2009). Dock visar andra studier med noggrant utförd inseminering av sperma från tjurar med hög fertilitet på fertilitetsnivåer jämförbara med osorterad sperma (de Graaf et al., 2009).

Gris

Könsslekterade spermier inom grisproduktionen skulle med fördel användas i framförallt avelsbesättningarna för att producera djur med höga avelsvärden (Garner, 2006). Tekniken torde vara speciellt fördelaktig för producenter vilka säljer gyttor för smågrisproduktion, där hanar ses som en biprodukt (Vazquez et al., 2009). Användandet av spermier selekterade för att producera gyttor/suggor kan dessutom erbjuda en alternativ lösning på problemet med kastration av smågrisar (Johnson et al., 2005; Rath & Johnson, 2008; Vazquez et al., 2009).

Konventionell AI används idag av de flesta smågrisproducenter (Vazquez et al., 2008) men på grund av suggans/gyttans unika anatomi på livmodern krävs ett stort antal spermier (3 miljarder) för att uppnå acceptabel fertilitet (Johnson, 2000). Då endast ett relativt lågt antal spermier kan erhållas vid sorteringsprocessen, är användning av könsslekterade spermier i kombination med konventionell AI för kommersiella syften för närvarande inte ekonomiskt försvarbart (Vazquez et al., 2009).

Galtspermier lämpar sig väl för separering tack vare den platta och ovala formen på spermiers huvud med en area på $37,5 \mu\text{m}^2$ samt en skillnad i X- och Y-spermiers DNA på 3,6 %, vilket resulterar i ett selektionsindex på 115 (Garner, 2006). Dock tycks galtspermier vara känsligare för sorterings- och postsorteringsprocessen än spermier från tjur och bagge (Rath & Johnson, 2008; Vazquez et al., 2009). Grisens spermier har förvisso en stabil kromatinstruktur vilket skulle kunna vara till fördel vad gäller skador på grund av Hoechst 33342 (Rodriguez-martinez et al., 1990). En studie av Vazquez et al. (2002) visade att spermiers motilitet inte påverkades av de koncentrationer som används vid infärgning. Inte heller observerades någon skillnad i fertilitet, grisionsnivå, storlek på kullar eller antal missbildade kultingar med eller utan en koncentration av $27 \mu\text{M}$ Hoechst. Galtspermiers membran är extra känsliga för frysningsprocessen, jämfört med tjurspermiers, (Johnson & Welch, 1999), varför AI av frysta galtspermier resulterar i låga fertilitetsnivåer (Vazquez et al., 2009). Dock är befruktning med frysta, könssorterade spermier möjligt vid kirurgisk insemination (Johnson, 2000).

För att möjliggöra användandet av könsslekterade spermier i jordbruket krävs reproduktionstekniker vilka kräver ett lägre antal spermier (Garner, 2006). En sådan utveckling är deep intrauterine insemination (DIU), vilket innebär att en mindre mängd spermier kan insemineras, med hjälp av en Firflex® kateter, långt in, nära livmoderhornen (Vazquez et al., 2008). I en studie av Martinez et al. (2002) inseminerades 50 miljoner spermier med hjälp av DIU utan att varken fertilitet eller kullstorlek reducerades. Dessa suggor var dock behandlade med hormonerna eCG och hCG för att inducera brunst och därmed säkerställa att inseminering sker i nära anslutning till ägglossning. Denna metod är dessutom bara applicerbar på suggor och ej på gyttor (Rath & Johnson, 2008) och trots det reducerade antalet spermier är dosen fortfarande för stor för att applicering i lantbruket skall vara aktuellt (Rath et al., 1999; Vazquez et al., 2009).

Får

Könsselektad sperma inom fårproduktionen kan med fördel användas för att erhålla högre köttproduktion genom högre andel födda bagglamm. Metoden kan även tillämpas vid rekrytering av tackor samt i korsningsprogram liknande de i nötköttsproduktionen. Det vill säga, i de raser där främst tackorna svarar för produktionsegenskaperna skulle framförallt tacklamm avlas fram och i de raser där baggarna är framstående i produktionen produceras främst bagglamm (Foote & Miller, 1971).

Baggens spermier skiljer sig med 4,2 % med avseende på mängden DNA och arean på spermiers huvud är $26,6 \mu\text{m}^2$, vilket ger ett selektionsindex på 112 (Garner, 2006). Rapporter angående hur många spermier per dos som krävs för att erhålla rimlig fertilitet vid insemination av får varierar. Minimum för rekommenderad dos är dock 20-25 miljoner levande spermier (Evans et al., 2004; de Graaf et al., 2007).

Tidigare har en kommersialisering av könsselektad sperma på får varit begränsad på grund av spermernas reducerade livslängd i tackan (Maxwell et al., 2004) och flertalet studier visar att sorteringsprocessen leder till en reducerad funktion av baggspermier (de Graaf et al., 2007). Den första studien vilken bevisar att lamm kan födas efter insemination med en låg dos, sorterad och fryst sperma, utfördes av Hollinshead et al. (2002). Studien resulterade i dräktiga tackor efter insemination med $2-4 \times 10^6$ frysta och därefter upptinade, selekterade spermier. Dock var andelen dräktiga tackor efter inseminering med selekterad sperma signifikant lägre (25 % för X och för 14,6% Y) än andelen dräktiga tackor inseminerade med oselektad sperma (54,3%). Enligt Hollinshead et al. (2002) torde en ökning av antalet spermier i dosen samt en mer exakt tidpunkt för inseminering, öka andelen dräktiga djur. Tvärt emot dessa resultat har senare studier visat att frusen, könsselektad sperma från baggar har samma eller till och med högre fertilitet vid insemination än osorterad frusen sperma (de Graaf et al., 2009). En studie av de Graaf et al. (2007) visar att insemination med 50 eller 15 miljoner osorterade spermier och insemination med 1 eller 5 miljoner sorterade spermier resulterade i lika stor andel dräktiga djur och födda lamm. Vidare gav insemination med 1 eller 5 miljoner spermier fler dräktiga djur och födda lamm jämfört med lika många osorterade spermier. Enligt de Graaf et al. (2006) beror detta på att sorterad baggsperma har högre motilitet, vitalitet, akrosomal integritet och mitokondriell aktivitet än osorterad baggsperma.

Anledningen till dessa goda resultat vad gäller baggspermiers fertiliserande förmåga efter sortering, jämfört med andra arters, är ännu inte känd. Möjligen kan det bero på att dessa spermier är mer resistent mot de stressande moment de utsätts för under sorteringsprocessen. Alternativt kan det vara tvärtom, att spermier från baggar istället är mer känsliga för sorteringsprocessen. I och med infärgningen med livsmedelsfärg och orienteringen sorteras fler spermier med morfologiska abnormiteter och skador på DNA bort, varvid selektionen för de överlägsna spermerna blir högre och bättre fertilitet uppnås (de Graaf et al., 2009).

Häst

Vad gäller sällskapsdjur, och däribland hästar, styr ofta känslor mer än ekonomi. Selektion på kön sker därmed främst med avseende på personliga preferenser, något många hästägare är villiga att betala för (Seidel & Johnson, 1999; Seidel, 2003b). Vad gäller hästar som högpresterande sportdjur, är ekonomin av större betydelse. Hingstar och valacker är ofta mer eftertraktade än ston (Seidel, 2003b). Vid en eventuell kommersialisering kommer

hingstsperma att sorteras för planerade, individuella parningar snarare än för användning av samma hingst till hundratals olika ston som för tidigare nämnda arter (Seidel, 2003b). Dock lär värdet av en enstaka dos täcka de höga produktionskostnaderna (Rath & Johnson, 2008).

Rekommenderad minsta dos för intrauterin insemination på ston är 500×10^6 spermier (Morris et al., 2000). Hingstpermiers DNA skiljer sig med 3,9 % mellan X- och Y-kromosombärande spermier och huvudets area är $15,2 \mu\text{m}^2$. Detta ger ett selektionsindex på 59 (Garner, 2006) vilket gör att selektionseffektiviteten är lägre för häst än för nöt, gris och får (Rath & Johnson, 2008). Oftast behöver hingstsperma separeras från seminalplasman innan sorteringsprocessen vilket bidrar till extra påfrestning på spermerna (Garner, 2006). Vidare visade en studie gjord av Mari et al. (2010) att sorteringsprocessen inte hade någon inverkan på spermernas vitalitet och mitokondriella aktivitet. Däremot påvisades en signifikant reduktion i motilitet och den akrosomala integriteten var, precis som på får, högre för sorterad sperma än osorterad. I övrigt är tillgången på information rörande hingstpermiers kvalitet efter sortering begränsad (Mari et al., 2010).

Inseminering av låga spermiedoser, med hjälp av hysteroskopi, har med framgång använts på häst. Metoden innebär att spermerna kan placeras mer exakt tack vare ett endoskop (Morris et al., 2000; Lindsey et al., 2002a). En studie av Morris et al. (2000) utförd med hysteroskopisk insemination av 5×10^6 osorterade spermier resulterade i 75 % dräktiga ston, vilket är jämförbart med konventionell intrauterin AI. Vidare visade en studie av Lindsey et al. (2002a) inga signifikanta skillnader mellan antal dräktiga ston efter hysteroskopisk inseminering med 5×10^6 sorterade ($5/20 = 25\%$) och osorterade spermier ($5/10 = 50\%$). I en senare studie av Lindsey et al. (2002b) påvisades inga signifikanta skillnader i antal dräktiga ston efter hysteroskopisk inseminering med osorterade, färska spermier ($4/10 = 40\%$), sorterade, färska spermier ($6/16 = 37,5\%$) och osorterade, frysta spermier ($6/16 = 37,5\%$). Dock sjönk andelen dräktiga djur något vid insemination med frysta, sorterade spermier ($2/15 = 13,3\%$).

Sortering av hingstsperma anses problematiskt på grund av låga fertilitetsnivåer vid användandet av hysteroskopi (de Graaf et al., 2009). Dessutom begränsas användningen av hysteroskopisk inseminering av höga kostnader för utrustning (Garner, 2006). Den största begränsningen är dock det faktum att det förekommer stor variation i spermernas sorterbarhet mellan hingstar och mellan ejakulat (Rath & Johnson, 2008).

Diskussion

Möjligheten att förselektera avkommor är positivt ur miljösynpunkt då det leder till att färre individer behövs för att producera en viss mängd mat. Även ur djurskyddssynpunkt är könsselektering positivt då problem som avlivning av tjurkalvar inom mjölkproduktionen och kastrering av hangrisar elimineras. Problemet med kastration av hangrisar är dock redan på väg att elimineras tack vare att detta kan göras med hjälp av vaccination och att selektera för gyltor till slak är därför måhända ej av intresse. Dock kvarstår det faktum att könsselektering är en alternativ lösning till detta problem om vaccination i framtiden av någon anledning skulle visa sig vara ofördelaktigt. Förselektion av avkommor kan även vara en del av lösningen på det ökade produktionsbehovet, till följd av den ökande befolkningstillväxten, men tekniken har fortfarande brister. Redan 1971 förutspådde Foote & Miller att de möjliga nackdelarna med könsselektad sperma skulle komma att bli ökade kostnader, skador på det genetiska materialet och ökad inavel. Idag finns inga bevis för att sortering orsakar skador på det genetiska materialet, men trots att Hoechst 33342, eller något annat moment i könsselekteringsprocessen, tycks ha liten eller ingen genotoxisk verkan på spermernas DNA

(Garner, 2009) krävs vidare utredning för att fastställa detta (Garner, 2009). Inte heller Hoechst 33342s effekt på honans reproduktionsorgan är känt och även detta bör utredas vidare (Garner, 2009).

Vad gäller möjliga kostnader görs stora investeringar i och med inseminering med könsslekerad sperma. För att öka användandet inom jordbruket måste fördelarna med könsslekerade avkommor överstiga de förhöjda kostnaderna, i form av exempelvis högre kostnader per dos och kostnader relaterade till utebliven dräktighet. Det mest essentiella för att uppnå detta är fertilitetsnivåer vilka bör vara nästintill desamma som för oselekerad sperma (Rath et al., 2009). Vidare måste priset på spermadoserna vara tillräckligt lågt för att lantbrukaren skall gå med vinst men tillräckligt högt för att produkten fortfarande skall anses som lukrativ (Rath & Johnson, 2008). Även värdet på slutprodukten bör beaktas. Då den årliga produkten från en mjölkko är värt mer än produkten från exempelvis ett får, samtidigt som kostnaden för en dos sperma är ungefär densamma för alla arter (Seidel, 2003b) krävs möjligen fler avkall på kostnaderna inom vissa produktionsgrenar.

För att en kommersialisering av könsslekerad sperma på andra djurslag än nöt skall vara aktuellt, krävs en förenkling och effektivisering av sorteringsprocessen. Detta skulle till exempel kunna vara minskad utspädning av spermier i uppsamlingsrören genom modifiering av orienteringsmunstycket. Vidare skulle sterilisering av instrumenten mellan varje separering underlättas om orienteringsmunstyckets provinjektionsystem var rakt istället för välvt samt utbytbar (Garner, 2006). Andra aktuella förändringar kan vara tillsatts av seminalplasma vid olika tillfällen under transporten samt förbättrade postsorteringsprocesser (Maxwell et al., 2004). Genom liknande förändringar minskar risken för skador på spermier varvid förhöjda fertilitetsnivåer erhålls. Förmågan att frysa spermier är av vikt för en kommersialisering då frysning är essentiellt för flexibilitet vad gäller plats för insemination och ovulationstidpunkt (Rath & Johnson, 2008). Enligt Johnson et al. (2005) är frysning av sorterad sperma samt tekniken för låg-dos insemination de områden vilka kan utvecklas mest med bättre sortering som resultat. Seidel (2007) tror dock att ett effektivare system för att sortera flera spermier samtidigt kommer att utvecklas inom en snar framtid, varför låg-dos insemination inte kommer att vara nödvändigt. Vidare hävdar Garner (2006) att en optimering av sorteringsprocessen, anpassad till de enskilda djurslagen, kan vara nödvändigt för att framsteg ska ske. I vilket fall som helst, behövs mer detaljerade utredningar på sorteringsprocessens inverkan på spermier (Maxwell et al., 2004). Först då grunden till problemet är känd, kan adekvata förändringar i sorteringsprocessen göras varvid könsslekering inom alla djurslag kan bli ekonomiskt försvarbart. Sexcess® kan vara ett steg i rätt riktning men vidare utredning krävs för att metoden skall rekommenderas kommersiellt (Rath et al., 2009).

Vad gäller nötproduktionen ökar användandet av könsslekerade spermier, trots metodens begränsningar (Rath & Johnson, 2008) vilket torde tyda på en lönsamhet inom produktionen. På sikt kan detta dock ändras då en högre produktion av kvigkalvar bidrar till ett överskott på mjölkkor. Om tillgången därefter överstiger efterfrågan kommer värdet på rekryteringsdjur att sjunka (De Vries et al., 2008) varvid försäljningen av kvigor för rekrytering kan missgynnas. I och med en stigande mjölkavkastning kommer priset på mjölk att sjunka, vilket i och för sig gagnar konsumenterna (De Vries et al., 2008). De höga priserna på selekterade spermier må vara adekvata så länge efterfrågan på rekryteringskvigor är hög men i och med sjunkande mjölk- och kvigpriser minskar också värdet på sperman (Rath & Johnson, 2008). I det långa loppet kan dessa teorier dock ifrågasättas då den befintliga produktionen inte täcker det behov

av mat som uppkommer i och med en ökad befolkning. Måhända kommer det diskuterade överskottet att vägas upp av ökade produktionskrav.

Det faktum att användningen av könsslekerad sperma, är begränsad till kvigor eller välskötta köttkor kan anses vara ett problem (de Graaf et al., 2009). Detta innebär en hög omsättning av kor i produktionen och då förstagångskalvare i regel mjölkar mindre än andra- och tredjegångskalvare (Åkerstedt, 2011 personligt meddelande) torde detta ha en negativ effekt på mjölkavkastningen. Måhända kompenseras detta dock av det faktum att de nya kvigorna borde vara genetiskt överlägsna de äldre djuren vad gäller mjölkavkastning. Dessutom kan den högre mjölkavkastningen hos andra- och tredjegångskalvare utnyttjas då dessa kan användas för produktion av kött-mjölkraskorsningar. Frågan är dock hur mycket mer den enskilda kon kan mjölka utan att få allt för stora problem med juverhälsa och negativ energibalans i samband med topplaktation.

I och med att skillnaden i sorterbarhet mellan olika tjurars spermier är så pass stor borde det finnas en metod för att förutsäga om en tjur lämpar sig för selektion av spermier eller ej. Möjligen kan den reducerade fertiliteten vara ett resultat av kommersiella krav på att få könssorterad sperma från de tjurar med högst avelsindex, även om dessas spermier inte lämpar sig för sortering (de Graaf et al., 2009).

Det faktum att höga fertilitetsnivåer uppnås trots ett lågt antal spermier är av betydelse för en framtida kommersialisering av könsslekerad sperma på får, då lägre antal spermier per dos vidare resulterar i en reducerad kostnad per dos (Rath & Johnson, 2008). Får är troligen det djurslag vilket är närmast en kommersialisering av könsslekerade spermier (Rath et al., 2009) men även om detta kan vara aktuellt inom en snar framtid är det måhända ej tillräckligt lönsamt för att anammas av svenska lantbrukare. Metoden kan dock vara lönsam i större produktioner liknande de i Australien och på Nya Zeeland (Rath & Johnson, 2008).

Johnson et al. (2005) menar att sorterad grissperma kommer att användas inom lantbruket först när en teknik för färre spermier samt en snabbare sorteringsprocess har utvecklats. Till dess är användningen begränsad till specialiserade produktionssystem. För de arter där sorteringsprocessen är begränsande, exempelvis gris, kan in vitro fertilisering (IVF) och embryo transfer (ET) med könsslekerade spermier vara ett alternativ. Frågan är dock om dessa teknologier är tillräckligt effektiva för att anammas kontinuerligt i lantbruket.

Enligt Rath & Johnson (2008) kommer en kommersialisering av könsslekerade spermier för häst ske först när mer konstanta fertilitetsnivåer efter sortering och frysning, fler hingstar från vilka spermier kan sorteras samt en förbättring av hysteroskopisk inseminering uppnås. Den höga omsättningen av pengar i hästnäringen bevisar dock att hästägare är villiga att lägga stora summor pengar på sina djur. Utan tvekan skulle detta även kunna innefatta förselekerade avkommor och enstaka sorteringar skulle kunna ske till hästägare vilka har möjlighet och är villiga att betala.

Slutsats

Könsslektering av spermier sker med hjälp av flödescytometri, baserat på skillnaden i X- och Y-kromosomernas DNA-innehåll. Metoden appliceras idag endast på nöt då dessa spermier är lättast att separera, varvid acceptabla fertilitetsnivåer kan erhållas. För att en kommersialisering av könsslekerad sperma på andra djurslag än nöt skall vara aktuellt, krävs en förenkling och effektivisering av sorteringsprocessen samt vidare studier för att

utreda sorteringsprocessens effekt på spermerna och honans reproduktiva organ. Ett steg i rätt riktning kan vara utvecklandet av Sexcess®.

Referenser

- Andersson, M., Taponen, J., Kommeri, M. & Dahlbom, M. 2006. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 41, 95-97.
- Blecher, S.R., Howie, R., Li, S., Detmar, J. & Blahut, L.M. 1999. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology* 52, 1309-1321.
- Catt, S.L., O'Brien, J.K., Maxwell, W.M.C. & Evans, G. 1997. Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry. *Reproduction in Domestic Animals* 32, 251-258.
- Cran, D.G., McKelvey, W.A.C., King, M.E., Dolman, D.F., McEvoy, T.G., Broadbent, P.J. & Robinson, J.J. 1997. Production of lambs by low dose intrauterine insemination with flow cytometrically sorted and unsorted semen. *Theriogenology* 47, 267.
- de Graaf, S.P., Evans, G., Maxwell, W.M.C., Downing, J.A. & O'Brien, J.K. 2007. Successful low dose insemination of flow cytometrically sorted ram spermatozoa in sheep. *Reproduction in Domestic Animals* 42, 648-653.
- de Graaf, S.P., Evans, G., Maxwell, W.M.C. & O'Brien, J.K. 2006. In vitro characteristics of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa after sex sorting and re-freezing. *Reproduction Fertility and Development* 18, 867-874.
- de Graaf, S.P.d., Beilby, K.H., Underwood, S.L., Evans, G. & Maxwell, W.M.C. 2009. Sperm sexing in sheep and cattle: the exception and the rule. *Theriogenology* 71, 89-97.
- De Vries, A., Overton, M., Fetrow, J., Leslie, K., Eicker, S. & Rogers, G. 2008. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *Journal of Dairy Science* 91, 847-856.
- Evans, G., Hollinshead, F.K. & Maxwell, W.M.C. 2004. Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. *Reproduction Fertility and Development* 16, 455-464.
- Foote, R.H. & Miller, P. 1971. What might sex ratio control mean in the animal world? Sex ratio at birth-prospects for control. A symposium., 1-9.
- Frijters, A.C.J., Mullaart, E., Roelofs, R.M.G., Hoorne, R.P.v., Moreno, J.F., Moreno, O. & Merton, J.S. 2009. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology* 71, 64-67.
- Fugger, E.F. 1999. Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-chromosome bearing sperm. *Theriogenology* 52, 1435-1440.
- Garner, D.L. 2001. Sex-sorting mammalian sperm: Concept to application in animals. *Journal of Andrology* 22, 519-526.
- Garner, D.L. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65, 943-957.
- Garner, D.L. 2009. Hoechst 33342: the dye that enabled differentiation of living X- and Y-chromosome bearing mammalian sperm. *Theriogenology* 71, 11-21.
- Garner, D.L., Gledhill, B.L., Pinkel, D., Lake, S., Stephenson, D., Vandilla, M.A. & Johnson, L.A. 1983. Quantification of the X-chromosome-bearing and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic-animals by flow-cytometry. *Biology of Reproduction* 28, 312-321.
- Garner, D.L. & Suh, T.K. 2002. Effect of Hoechst 33342 staining and laser illumination on the viability of sex-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 57, 746.
- Grossfeld, R., Klinc, P., Sieg, B. & Rath, D. (2005). Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. *Theriogenology* 63(8), 2269-2277.
- Guthrie, H.D., Johnson, L.A., Garrett, W.M., Welch, G.R. & Dobrinsky, J.R. 2002. Flow cytometric sperm sorting: Effects of varying laser power on embryo development in swine. *Molecular Reproduction and Development* 61, 87-92.

- Hohenboken, W.D. 1999. Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology* 52, 1421-1433.
- Hollinshead, F.K., O'Brien, J.K., Maxwell, W.M.C. & Evans, G. 2002. Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y-chromosome-bearing spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development* 14, 503-508.
- Johnson, L.A. 1992. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. *Journal of Animal Science* 70, 8.
- Johnson, L.A. 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Animal reproduction science* 60, 93-107.
- Johnson, L.A., Flook, J.P. & Hawk, H.W. 1989. Sex preselection in rabbits – live births from X-sperm and Y-sperm separated by DNA and cell sorting. *Biology of Reproduction* 41, 199-203.
- Johnson, L.A. & Pinkel, D. 1986. Modification of a laser-based flow cytometer for high-resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry* 7, 268-273.
- Johnson, L.A., Rath, D., Vazquez, J.M., Maxwell, W.M.C. & Dobrinsky, J.R. 2005. Preselection of sex of offspring in swine for production: current status of the process and its application. *Theriogenology* 63, 599-624.
- Johnson, L.A. & Welch, G.R. 1999. Sex preselection: High-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 52, 1323-1341.
- Johnson, L.A., Welch, G.R. & Rens, W. 1999. The Beltsville sperm sexing technology: High-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI. *Journal of Animal Science* 77, 213-220.
- Klinc, P. & Rath, D. 2007. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reproduction in Domestic Animals* 42, 63-67.
- Libbus, B.L., Perreault, S.D., Johnson, L.A. & Pinkel, D. 1987. Incidence of chromosome-aberrations in mammalian sperm stained with Hoechst-33342 and UV-laser irradiated during flow sorting. *Mutation Research* 182, 265-274.
- Lindsey, A.C., Morris, L.H.A., Allen, W.R., Schenk, J.L., Squires, E.L. & Bruemmer, J.E. 2002a. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. *Equine Veterinary Journal* 34, 128-132.
- Lindsey, A.C., Schenk, J.L., Graham, J.R., Bruemmer, J.E. & Squires, E.L. 2002b. Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal* 34, 121-127.
- Lu, K.H., Cran, D.G. & Seidel, G.E. 1999. In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 52, 1393-1405.
- Mari, G., Rizzato, G., Merlo, B., Iacono, E., Bucci, D., Seren, E., Tamanini, C., Galeati, G. & Spinaci, M. 2010. Quality and Fertilizing Ability In Vivo of Sex-Sorted Stallion Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 45, 331-335.
- Martinez, E.A., Vazquez, J.M., Roca, J., Lucas, X., Gil, M.A., Parrilla, I., Vazquez, J.L. & Day, B.N. 2002. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction* 123, 163-170.
- Maxwell, W.M.C., Evans, G., Hollinshead, F.K., Bathgate, R., de Graaf, S.P., Eriksson, B.M., Gillan, L., Morton, K.M. & O'Brien, J.K. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Animal Reproduction Science* 82-3, 79-95.
- Maxwell, W.M.C., Welch, G.R. & Johnson, L.A. 1996. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction Fertility and Development* 8, 1165-1178.

- Morris, L.H.A., Hunter, R.H.F. & Allen, W.R. 2000. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *Journal of Reproduction and Fertility* 118, 95-100.
- Morton, K.M., Herrmann, D., Sieg, B., Struckmann, C., Maxwell, W.M.C., Rath, D., Evans, G., Lucas-Hahn, A., Niemann, H. & Wrenzycki, C. 2007. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilisation in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. *Molecular Reproduction and Development* 74, 931-940.
- Norman, H.D., Hutchison, J.L. & Miller, R.H. 2010. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *Journal of Dairy Science* 93, 3880-3890.
- Palma, G.A., Olivier, N.S., Neumuller, C. & Sinowatz, F. 2008. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts. *Anatomia Histologia Embryologia* 37, 67-73.
- Parrilla, I., Vazquez, J.M., Cuello, C., Gil, M.A., Roca, J., Di Berardino, D. & Martinez, E.A. 2004. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. *Reproduction* 128, 615-621.
- Rath, D. & Johnson, L.A. 2008. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 338-346.
- Rath, D., Long, C.R., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R., Schreier, L.L. & Johnson, L.A. 1999. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: High-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *Journal of Animal Science* 77, 3346-3352.
- Rath, D., Moench-Tegeder, G., Taylor, U. & Johnson, L.A. 2009. Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 71, 22-29.
- Rens, W., Welch, G.R. & Johnson, L.A. 1998. A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X and Y chromosome-bearing sperm. *Cytometry* 33, 476-481.
- Rodriguez-Martinez, H., Courtens, J.L., Kvist, U. & Ploen, L. 1990. Immunocytochemical localization of nuclear protamine in boar spermatozoa during epididymal transit. *Journal of Reproduction and Fertility* 89, 591-595.
- Schenk, J.L., Cran, D.G., Everett, R.W. & Seidel, G.E., Jr. 2009. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology* 71, 717-728.
- Seidel, G.E. 2003a. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* 59, 585-598.
- Seidel, G.E. 2003b. Sexing mammalian sperm--intertwining of commerce, technology, and biology. *Animal reproduction science* 79, 145-156.
- Seidel, G.E. 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology* 68, 443-446.
- Seidel, G.E., Allen, C.H., Johnson, L.A., Holland, M.D., Brink, Z., Welch, G.R., Graham, J.K. & Cattell, M.B. 1997. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology* 48, 1255-1264.
- Seidel, G.E., Cran, D.G., Herickhoff, L.A., Schenk, J.L., Doyle, S.P. & Green, R.D. 1999a. Insemination of heifers with sexed frozen or sexed liquid semen. *Theriogenology* 51, 400-400.
- Seidel, G.E. & Garner, D.L. 2002. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 124, 733-743.
- Seidel, G.E. & Johnson, L.A. 1999. Sexing mammalian sperm - Overview. *Theriogenology* 52, 1267-1272.

- Seidel, G.E., Schenk, J.L., Herickhoff, L.A., Doyle, S.P., Brink, Z., Green, R.D. & Cran, D.G. 1999b. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52, 1407-1420.
- Stålhammar, H. April 2011. Personligt meddelande. Senior Geneticist/ Sire analyst VikingRed, Viking Genetics.
- Suh, T.K., Schenk, J.L. & Seidel, G.E. 2005. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology* 64, 1035-1048.
- Tubman, L.M., Brink, Z., Suh, T.K. & Seidel, G.E. 2004. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *Journal of Animal Science* 82, 1029-1036.
- Vazquez, J.M., Martinez, E.A., Parrilla, I., Gil, M.A., Lucas, X. & Roca, J. 2002. Motility characteristics and fertilizing capacity of boar spermatozoa stained with Hoechst 33342. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 369-374.
- Vazquez, J.M., Parrilla, I., Roca, J., Gil, M.A., Cuello, C., Vazquez, J.L. & Martinez, E.A. 2009. Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology* 71, 80-88.
- Vazquez, J.M., Roca, J., Gil, M.A., Cuello, C., Parrilla, I., Vazquez, J.L. & Martinez, E.A. 2008. New developments in low-dose insemination technology. *Theriogenology* 70, 1216-1224.
- Viking Genetics. April 2011.
<http://www.vikinggenetics.com/sv/produktblad/Produktblad%20X-Vik%20VikingGenetics%20SE%20low.pdf>
- Welch, G.R. & Johnson, L.A. 1999. Sex preselection: Laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology* 52, 1343-1352.
- Welch, G.R., Waldbieser, G.C., Wall, R.J. & Johnson, L.A. 1995. Flow cytometric sperm sorting and PCR to confirm separation of X- and Y-chromosome bearing bovine sperm. *Animal Biotechnology* 6, 131-139.
- Zhang, M., Lu, K.H. & Seidel, G.E. 2003. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology* 60, 1657-1663.
- Åkerstedt, M. April 2011. Personligt meddelande. Postdoktor, HUV, idisslare, näringslära och skötsel, SLU.