

## **Virtaussytometrisesti lajitellun sonnin sperman laatu alkioituotannossa**

Jaana Peippo<sup>1</sup>, Mervi Rätty<sup>1</sup>, Kati Korhonen<sup>1</sup>, Kirsi Kananen-Anttila<sup>2</sup>, Minna Eronen<sup>2</sup>, Kirsi Vartia<sup>3</sup>, Timo Hurme<sup>1</sup>, Auvo Sairanen<sup>1</sup>, Maria Halmekytö<sup>2</sup> & Asko Mäki-Tanila<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MTT Maa- ja elintarviketaloudentutkimuskeskus, 31600 Jokioinen, <sup>2</sup>Kuopion yliopisto, Soveltavan biotekniikan instituutti, 70210 Kuopio, <sup>3</sup>Jalostuspalvelu Itäinen, 76101 Pieksämäki

Lypsykarjalla sperman sukupuolilajittelulla on monta etua: nuorten sonnien testityttärien tuottaminen pienemmällä siemennysmäärillä, huippusonnien X-sperman käyttö parhaille lehmille ja lihasonnien Y-sperma keskitason lehmille. Tehokkain tapa varmistaa naudan alkioiden ja niistä syntyvien vasikoiden sukupuoli on käyttää X- ja Y-fraktioihin lajiteltua spermaa hedelmöityksessä, jolloin lähes kaikki tuotetut alkioet ovat haluttua sukupuolta. Lajittelemattomalla spermalla tuotetuista alkiosta haluttua sukupuolta on teoriassa noin puolet. Yhdysvaltalaisen XY Inc.:n kehittämä ja patentoima virtaussytometriin perustuva siittiöiden lajittelumenetelmä on tällä hetkellä maailmalla tutkituista menetelmistä ainoa, joka on kaupallistettu. Lajiteltua spermaa voidaan myös pakastaa, mikä on suuri etu sperman logistiikan kannalta.

Maa- ja metsätalousministeriön ja jalostus- ja elintarviketeollisuuden rahoittamassa tutkimushankkeessa selvitettiin XY Inc.:n patentoimalla menetelmällä lajitellun sperman laatua ja lajitteluun käytettyjen sonnien välisiä eroja alkioiden laboratoriotuotannossa ja alkiohuuhtelusiemennyksissä. Kokeissa käytetty holstein-friisiläissonnien sperma ostettiin Cogent Ltd:lta Englannista.

Laboratoriossa lajitellun sperman sulatuksen jälkeinen elävyys oli silmämääräisessä tarkastelussa lajittelematonta spermaa heikompi. X-sperma penetroi munasoluja heikommin ja X-spermalla hedelmöitettyt munasolut jakautuivat lajittelemalla ja Y-spermalla hedelmöitettyjä munasoluja heikommin. Y-sperma tuotti eniten ja laadullisesti parhaita siirtokelpoisia alkioita. X- ja Y-spermalla tuotetuista siirtokelpoisista alkiosta keskimäärin 10% oli väärää sukupuolta.

Hiehoilla ja lehmillä tehdyissä alkionhuuhteluissa verrattiin lajittelematonta ja X-spermaa. Vain X-spermalla siemennetyistä luovuttajista löydettiin hedelmöitymättömiä munasoluja. Siirtokelpoisten tai kehityksessä pysähtyneiden alkioiden osuuksissa ei lajittelemattoman ja X-sperman välillä ollut vastaavaa eroa.

Vastaavana ajanjaksona tilatasolla yhteensä 30 karjanomistajaa käytti kolmen Englannista tuodun sonnien lajiteltua X-spermaa hiehojen ja lehmien alkionhuuhtelusiemennyksissä. Myös tässä aineistossa X-spermalla saatiin lehmillä vähemmän siirtokelpoisia alkioita ja enemmän hedelmöitymättömiä munasoluja kuin vastaavana ajanjaksona suomalaisilla holstein-friisiläissonneilla tehdyissä huuhteluissa. Alkiontuotantotuloksissa oli myös sonnien välisiä eroja.

Tulokset osoittavat, että XY Inc.:n kehittämä lajittelumenetelmä on erittäin luotettava. Lehmille tarvittanee useampia siemennyksiä ja/tai isompia siemennysannoksia kuin hiehoilla. Keinosiemennyssonnien soveltuvuus lajitteluun on arvioitava yksilökohtaisesti.

*Avainsanat:* lehmä, alkio, sukupuolilajittelu, X-sperma, Y-sperma

## Johdanto

Maa- ja metsätalousministeriön ja jalostus- ja elintarviketeollisuuden rahoittaman tutkimushankkeen yhtenä tavoitteena oli arvioida tällä hetkellä ainoalla kaupallistetulla, yhdysvaltalaisen XY Inc.:n patentoimalla menetelmällä lajitellun (Johnson 2000) sonnin sperman käyttökelpoisuutta koeputkialkiotuotannossa laboratoriossa (*in vitro*) ja alkionhuuhtelusiemennyksissä (*in vivo*) sekä lajitteluun käytettyjen sonnien välisiä eroja alkiontuotannossa. Lajitteluun käytettyjen sonnien hedelmöityskyvyssä *in vitro* on havaittu eroja (Lu & Seidel Jr. 2004) ja lajitellulla spermalla tuotettujen koeputkialkioiden on raportoitu kehittyvän lajittelemattomalla spermalla tuotettuja verrokkialkioita hitaammin (Lu ym. 1999). Myös alkionhuuhteluissa lajiteltu sperma on hedelmöittänyt munasoluja lajittelematonta spermata heikommin (Schenk ym. 2005).

Munasolujen hedelmöitys X- ja Y-fraktioihin lajitellulla spermalla on tehokkain tapa varmistaa naudan alkioiden ja niistä syntyvien vasikoiden sukupuoli, sillä tällöin lähes kaikki tuotetut alkioet ovat haluttua sukupuolta. Vaikka alkion sukupuoli voidaan määrittää myös ennen siirtoa alkioista otetusta näytepalasta (Peura ym. 1991), on lajittelemattomalla spermalla tuotetuista alkiosta haluttua sukupuolta teoriassa vain noin puolet. Lisäksi, näytepalanotto ja sen jälkeinen pakastus alentaa alkion elinkykyä kokonaisuudessaan verrattuna, mikä on havaittavissa alkioiden tiheydyttävyyden laskuna (Gustafsson ym. 1994, Shea 1999, Hasler ym. 2002). Sonnin sperman sukupuolilajittelulla on monta etua maitotiloilla. Tarvittava määrä nuorten sonnien testityttäriä saadaan pienemmällä siemennysmäärällä. Toisaalta huippusonnien X-spermalla voidaan siementää karjan parhaat lehmät karjan keskimääräisen jalostusarvon parantamiseksi. Lihasonnien Y-spermata voidaan puolestaan käyttää karjan keskitason lehmille lihantuotannon tehostamiseksi.

## Aineisto ja menetelmät

### *Alkioiden laboriotuotanto*

Laborioriotutkimuksissa selvitettiin lajitellun holstein-friisiläissonnin, Picston Shaker FFF93568B, X- ja Y-sperman elävyyttä, hedelmöityskykyä sekä tuotettujen alkioiden lukumäärää, kehitysaikataulua ja laatua P. Shakerin lajittelemattomaan spermaan ja kontrollisonniin verrattuna. Kokeessa käytetty pakastettu sperma ostettiin Englannista (Cogent Ltd). Alkioiden laboriotuotannossa munasolut kerättiin teurastamonurjoista. Kunkin teurastamoerän munasolut jaettiin satunnaisesti kolmeen koeryhmään, joissa ne hedelmöitettiin erilaisella spermalla (X-, Y- ja lajittelematon sperma). Hedelmöityksen jälkeen muodostettiin neljäs koeryhmä (X+Y), jossa samaan viljelyryhmään laitettiin yhtä monta X- ja Y-spermalla hedelmöitettyä munasolua. Viljelyn lopuksi, kaikkien tuotettujen alkioiden sukupuoli tarkistettiin (Bredbacka & Peippo 1992) lajitellun sperman puhtausasteen määrittelemiseksi.

Aineisto analysoitiin satunnaistettujen täydellisten lohkojen koeasetelman mukaisesti, jossa teurastamoerä oli lohkokotijänä ja X, Y, X+Y ja lajittelematon verrokki muodostivat neljä käsittelyryhmää. Analysoidut muuttujat (Taulukko 1) noudattivat binomijakaumaa, mistä johtuen ne analysoitiin käyttäen ehdollista logistista regressiota (Collett 2003; CYTEL Software Corporation 2002). Tilastolliset mallit sovitettiin LogXact 5:llä (CYTEL Software Corporation, Cambridge, MA, USA).

### *Alkionhuuhtelut*

MTT:n Pohjois-Savon tutkimusasemalla Maaningalla holstein-friisiläis-hiehoilla ja -lehmillä tehdyissä alkionhuuhteluissa verrattiin löydettyjen alkioiden lukumäärää ja laatua P. Shakerin, lajittelemattomalla ja X-spermalla spermalla tehtyjen huuhtelusiemennysten välillä.

Lisäksi, yhteensä 30 karjanomistajaa siemensi hiehoja ja lehmiä kolmen Englannista tuodun sonnin (Picston Shaker FFF93568B, Cogent Courier FFF93588C, Overside Dreamer FFF93796B) X-spermalla alkionhuuhteluissaan. Tämän osatutkimuksen vertailuaineisto koostui vastaavana aikana 35 suomalaisella holstein-friisiläissonnilla tehdyistä alkionhuuhteluista.

Lajiteltu X-sperma-annos sisälsi 2 miljoonaa siittiötä ja kukin alkionluovuttaja siemennettiin kohdunsarveen 2-3 kertaa käyttäen yhteensä 2-4 lajiteltua sperma-annosta. Lajittelemattomat sperma-annokset sisälsivät 10-15 miljoonaa siittiötä ja kukin alkionluovuttaja siemennettiin kohdun runkosaan 2-3 kertaa käyttäen yhteensä 2-3 sperma-annosta.

## Tulokset ja tulosten tarkastelu

### *Alkioiden laboratoriotuotanto (Taulukot 1 ja 2)*

Silmämääräisessä mikroskoopilla tehdyssä tarkastelussa lajitellun sperman X- ja Y-fraktioiden sulatuksen jälkeinen elävyys (30%) oli lajittelematonta spermaa (50%) heikompi.

*In vitro* -aineisto koostui 9 teurastamoerästä ja yhteensä 4569 hedelmöitetystä munasolusta. Hedelmöityksessä X-sperma penetroi munasoluja muita ryhmiä huonommin ja X-spermalla hedelmöitetty munasolut jakautuivat muita ryhmiä heikommin. Tutkituista ryhmistä Y-sperma tuotti eniten siirtokelpoisia alkioita. Myös alkioiden laatu oli paras Y-spermalla tuotetussa ryhmässä. X- ja Y-spermalla tuotetuista siirtokelpoisista alkiosta keskimäärin noin 10% oli väärää sukupuolta.

Vastaavanlaisella koeasetelmalla, mutta tuorespermaa käyttäen Beyhan ym. (1999) havaitsivat, että sperman penetraatiofrekvenssi poikkesi merkittävästi vain lajittelemattoman ja X-sperman välillä eikä eroa havaittu X- ja Y-spermojen välillä. Myös tässä tutkimuksessa sekä lajittelemattomalla että Y-spermalla hedelmöitetty munasolut jakautuivat kuitenkin X-spermalla hedelmöitettyjä paremmin. Lisäksi, siirtokelpoisten alkioiden osuus hedelmöitetystä munasoluista oli sekä X- että Y-spermalla lajittelematonta spermaa pienempi.

**Taulukko 1.** Alkioiden laboratoriotuotanto virtausytometrisesesti lajitellulla Picston Shaker FFF93568B sonnin spermalla.

Sperma	Penetraatio (%)	Normaaleja hedelmöityksiä (%)	Jako-%	Siirtokelpoisia alkioita munasoluista (%)	I laatuluokkaa siirtokelpoisista alkiosta (%)	Uroksia siirtokelpoisista alkiosta (%) <sup>1)</sup>
X	58,0	73,3	65,5	27,3	31,0	12,6
Y	89,8	59,7	81,4	32,8	40,0	89,0
Lajittelematon verrokki	90,0	61,5	74,8	28,9	19,4	46,2
Verrokki sonni <sup>1)</sup>	83,3	67,6	84,6	34,0	6,2	-

1) Ei mukana tilastollisissa analyyseissä

**Taulukko 2.** Tilastolliset merkitsevyydet alkioiden laboratoriotuotannossa virtausytometrisesesti lajitellulla Picston Shaker FFF93568B sonnin spermalla.

Vertailu	Penetraatio (%)	Normaaleja hedelmöityksiä (%)	Jako-%	Siirtokelpoisia alkioita munasoluista (%)	I laatuluokkaa siirtokelpoisista alkiosta (%)
X – Y	***	*	***	**	*
X – lajittelematon verrokki	***	o	***		**
Y – lajittelematon verrokki			**	o	***

### *Alkionhuuhtelut (Taulukot 3 ja 4)*

MTT:n Pohjois-Savon tutkimusaseman aineistossa vain X-spermalla siemennetyistä huuhteluista löydettiin hedelmöitymättömiä munasoluja. Siirtokelpoisten tai kehityksessä pysähtyneiden alkioiden osuuksissa ei tutkittujen ryhmien välillä ollut vastaavaa eroa.

Myös koko Suomen aineisto (sisältäen MTT:n huuhtelut) osoitti, että X-spermalla saadaan etenkin lehmillä vähemmän siirtokelpoisia alkioita ja enemmän hedelmöitymättömiä munasoluja kuin vastaavana aikana suomalaisilla holstein-friisiläislonneilla tehdyissä huuhteluissa (Taulukko 3). Lisäksi sonnien välillä on eroja alkio tuotantotuloksissa (Taulukko 4).

**Taulukko 3.** Valtakunnalliset alkionhuuhtelutulokset virtausytometrisesti lajitellulla X-spermalla.

Siemennys	Huuhtelut kpl (0-huuhtelut <sup>1</sup> %)	Alkioita / huuhtelu ka	Siirtokelpoiset alkiot %	UFO:t <sup>2</sup> %	Degeneroituneet alkiot <sup>3</sup> %
Hiehot:					
X-sperma <sup>4</sup>	51 (25.5)	6.1	54.1	27.9	18.0
Lajittelematon sperma <sup>5</sup>	129 (24.0)	7.4	66.2	16.2	17.6
Lehmät:					
X-sperma <sup>4</sup>	21 (42.9)	10.3	27.2	52.4	20.4
Lajittelematon sperma <sup>5</sup>	81 (19.8)	8.4	67.9	16.7	15.5
Yhteensä:					
X-sperma <sup>4</sup>	72 (30.6)	7.3	42.5	38.4	19.2
Lajittelematon sperma <sup>5</sup>	210 (22.4)	7.8	66.7	16.7	16.7

<sup>1</sup> huuhtelut, joista ei saatu yhtään siirtokelpoista alkioita<sup>2</sup> hedelmöitymättömät munasolut (**Un**Fertilised **O**ocytes)<sup>3</sup> hedelmöittyneet munasolut, joiden kehitys pysähtynyt jo alkuvaiheessa<sup>4</sup> Picston Shaker FFF93568B, Cogent Courier ET FFF93588C, Oversight Dreamer ET FFF93796 B<sup>5</sup> käytetty 35 suomalaisen holstein-früsiläisssonin spermaa**Taulukko 4.** Sonnikohtaiset valtakunnalliset alkionhuuhtelutulokset virtausytometrisesti lajitellulla X-spermalla.

Sonnit	Huuhtelut kpl (0-huuhtelut <sup>1</sup> %)	Alkioita / huuhtelu ka	Siirtokelpoiset alkiot %	UFO:t <sup>2</sup> %	Degeneroituneet alkiot <sup>3</sup> %
Picston Shaker FFF 93568 B	33 (30.3)	9.6	42.7	41.7	15.6
Cogent Courier ET FFF 93588 C	31 (35.5)	5.8	43.1	34.5	22.4
Oversight Dreamer ET FFF 93796 B	8 (12.5)	3.7	48.6	24.3	27.0

<sup>1</sup> huuhtelut, joista ei saatu yhtään siirtokelpoista alkioita<sup>2</sup> hedelmöitymättömät munasolut (**Un**Fertilised **O**ocytes)<sup>3</sup> hedelmöittyneet munasolut, joiden kehitys pysähtynyt jo alkuvaiheessa

Myös Schenk ym. (2005) raportoivat lajitellun sperman käytön alentavan alkiosaaaliita huuhteluissa, jos käytetty sperma-annos sisälsi vähemmän kuin 20 miljoonaa siittiötä.

### Johtopäätökset

Tulokset osoittavat, että XY Inc.:n kehittämä lajittelumenetelmä on erittäin luotettava. X-spermalla lehmille tarvitaan kuitenkin useampia siemennyksiä ja/tai isompia siemennysannoksia kuin hiehoilla. Lisäksi suomalaisten keinosiemennyssonien soveltuvuus lajitteluun on arvioitava sonnikohtaisesti eläinten välillä mahdollisesti olevien erojen vuoksi.

## **Kirjallisuus**

**Beyhan, Z., Johnson, L.A. & First, N.L.** 1999. Sexual dimorphism in IVM-IVF bovine embryos produced from X and Y chromosome-bearing spermatozoasorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology* 52: 35-48.

**Bredbacka, P. & Peippo, J.** 1992. Sex diagnosis of ovine and bovine embryos by enzymatic amplification and digestion of DNA from ZFY/ZFX locus. *Agric. Sci. Finl.* 1: 233-238.

**Collett, D.** 2003. *Modelling binary data*, 2<sup>nd</sup> ed., Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Florida.

**CYTEL Software Corporation**, 2002. *LogXact® 5 – User Manual*, CYTEL Software Corporation, Cambridge, MA.

**Gustafsson, H., Jaakma, U. & Shamsuddin, M.** 1994. Viability of fresh and frozen-thawed biopsied bovine embryos. *Acta Vet. Scand.* 35: 217-222.

**Hasler, J.F., Cardey, E., Stokes, J.E. & Bredbacka, P.** 2002. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology* 58: 1457-1469.

**Johnson, L.A.** 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: state-of-the-art. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 93-107.

**Lu, K.H., Cran, D.G. & Seidel Jr., G.E.** 1999. In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 52: 1393-1405.

**Lu, K.H. & Seidel Jr., G.E.** 2004. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology* 62: 819-830.

**Peura, T., Hyttinen, J.-M., Turunen, M. & Jänne J.** 1991 A reliable sex determination assay for bovine pre-implantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 35:547-555.

**Schenk, J.L., Suh, T.K. & Seidel Jr., G.E.** 2005. Embryos production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology* (in press).

**Shea, B.F.** 1999. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. *Theriogenology* 51: 841-854.