Wykorzystanie nasienia sortowanego u zwierząt gospodarskich – skala, efektywność inseminacji, czynniki ryzyka

BARTŁOMIEJ M. JAŚKOWSKI, MAGDALENA WOŻNA, MAREK GEHRKE

Instytut Weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wołyńska 28, 60-625 Poznań

Otrzymano 12.10.2016

Zaakceptowano 31.01.2017

Jaśkowski B. M., Woźna M., Gehrke M.

Sex-sorted sperm in farm animals: scale of use, the effectiveness of insemination, risk factors

Summary

The aim of the study was to present the scale of use, risk factors and possibilities, which sorter semen gives in biotechnics used in reproduction of cattle. Modern sorters allow for the evaluation of 6 million X and Y spermatozoa per hour. Sex-sorted semen, which is commercially used, contains 2.1×10^6 of spermatozoa. It is used mostly in AI of milk heifers, mainly in large cattle herds. Sorted semen containing Y spermatozoa is sold less often in the world than the one with X spermatozoa. The percentage of the desired sex of the young is higher than 90. The pregnancy rate after application of sorted semen is about 20–25% lower than after insemination of non-sorted semen and depends on a number of factors. The main factors are: breed of female, service number, the herd of origin, the depth of semen deposition, the bull producing semen, ambient temperature and technical parameters during sperm sorting. A number of methods have been developed to improve conception rate, including timed artificial insemination (TAI) and synchronization of heat and ovulation. Results of donor inseminations with the use of sorter semen are presented, with the lower percentage of embryos suitable for the transfer and embryos of the highest quality highlighted. Previous studies do not indicate a reduction of the conception rate after the transfer of embryos obtained in vitro and in vivo after fertilization using sorted semen. It remains difficult to justify a significant increase in the frequency of stillbirths of bulls after using sorted sperm. Similarly, 16% of stillbirths of bulls were observed after embryo transfer, when donors were inseminated with sorter semen. The percentage of stillbirths of bulls after embryo transfer with the use of conventional semen is 9%. The sorted semen is not often used for inseminations in pigs, sheep and goats.

Keywords: sorted semen, cattle, biotechnics of animal reproduction

Technologia sortowania (seksowania) plemników funkcjonuje od ponad kilkadziesiąt lat. Stosowana jest z powodzeniem u zwierząt gospodarskich, laboratoryjnych, w ogrodach zoologicznych oraz u ludzi, zapewniając 90-95% potomstwa o pożądanej płci (33), na skalę komercyjną funkcjonuje jednak wyłącznie u bydła. Wybarwione fluorochromem plemniki są rozdzielane na gamety „Y” i gamety „X” przez tzw. sortery (metoda cytometrii przepływowej). Sortery stosowane na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych ub. wieku umożliwiały ocenę 350-600 tys. plemników X i Y na godzinę. Ich współczesne wersje (sortery wysokiej prędkości – HiSON) pozwalają na selekcję 6 mln plemników na godzinę. Możliwa jest także ocena 18 mln plemników na godzinę, jednak czystość uzyskiwanych frakcji jest niższa (34, 54, 62, 63, 70).

W niniejszym opracowaniu przedstawiono niektóre dane dotyczące skali wykorzystania, czynników ryzyka oraz stosowania tej technologii we wspomagany rozrodzie.

Bydło

Inseminacja. Liderem światowym w produkcji nasienia sortowanego są Stany Zjednoczone (23). Bezwzględna większość nasienia eksportowana jest za granicę, przeważnie do krajów Ameryki Południowej i Europy. W Polsce przyjął się zapożyczony z rozwiniętych krajów Europy Zachodniej i USA model wykorzystywania nasienia sortowanego w pierwszej, ewentualnie drugiej inseminacji u jałówek, względnie pierwiastek po 60. dniu po wycieleniu (2, 36). Wykorzystanie nasienia sortowanego do pierwszej inseminacji istotnie obniża koszt

produkcji cieliczek oraz zwrot nakładów w pierwszej laktacji (14).

Odsetek unasiennianych nasieniem sortowanym samic zwiększa się sukcesywnie. W USA w latach 2006-2008 unasienniano, odpowiednio, 1,4%, 9,5% i 17,8% jałówek oraz zaledwie 0,1%, 0,2% i 0,4% krów (49). Częściej seksowanego nasienia używano u jałówek i krów w dużych stadach krów mlecznych (> 1001 zwierząt) – odpowiednio: 72,4% i 18% niż małych (< 50 zwierząt) – odpowiednio: 17,2% i 4,5% (44). Podobnie częściej korzystano z niego w stadach o dużych wydajnościach (< 12,5 tys. l/rok) niż małych (< 8 tys. l/rok). Biorąc pod uwagę różne rejony USA w 2008 r. seksowanego nasienia używano w 34,6% i 10,4% stad odpowiednio u jałówek i krów (44). Średni odsetek jałówek unasiennianych nasieniem seksowanym wynosił w południowo-zachodniej części USA 36,2%, natomiast u krów na Środkowym Wschodzie najmniej, bo 1,3% (49). Skala sprzedaży nasienia seksowanego zawierającego plemniki Y jest na świecie niższa niż żeńskiego (16). Także dane na temat jego wykorzystania u krów ras mięsnych są nieliczne (22, 52).

Kategoria samic, liczba plemników w dawce, rasa. Wskaźnik zacielen jałówek i krów inseminowanych nasieniem sortowanym jest niższy niż u samic unasiennianych nasieniem konwencjonalnym. Z pierwszych szerokich badań terenowych wynika, że osiągnięte rezultaty stanowią około 75-80% skuteczności uzyskiwanej po inseminacji nasieniem konwencjonalnym (11). Podobne dane podają inni autorzy (21, 47).

Do podstawowych powodów obniżonego wskaźnika zacielen zalicza się m.in. małą dawkę plemników, krótszy okres życia plemników sortowanych w drogach rodnych samicy, powstające podczas procesów technologicznych modyfikacje w błonach mitochondriów i defragmentację DNA (54, 59, 62). Odsetek plemników ruchliwych po rozmrożeniu nie powinien być niższy od 35% (15). Tabela 1 przedstawia wpływ rasy bydła, wielkości dawki oraz kategorii samic na wskaźnik zacielen i odsetek cieląt o pożądanej płci. W niemieckich badaniach populacyjnych, w których porównywano wyniki 11 tys. inseminacji nasieniem sortowanym z ponad 100 tys. inseminacji nasieniem konwencjonalnym, ustalono, że wskaźnik niepłodności oraz wskaźnik zacielen były, odpowiednio, o 10,1% i 9,3% niższe po inseminacji nasieniem seksowanym (20). W północnych Włoszech, w których obserwacjami objęto 61 stad, średni odsetek zacielenych jałówek wyniósł 51% (13). W 2006 r., a następnie 2010 r. opublikowano dane dotyczące 755 oraz blisko 4500 inseminacji nasieniem sortowanym w jednym ze stad na południu Polski. Wskaźnik zapłodnialności był wysoki i porównywalny do uzyskiwanego po zastosowaniu konwencjonalnego nasienia mrożonego. Wynosił on, odpowiednio, 64,5% oraz 67% i 53% oraz 59% (47). W badaniach modelowych oceniano opłacalność stosowania nasienia sortowanego na poziomie wskaźnika zacielen rzędu 53%, 75% i 90% rezultatów uzyskiwanych po inseminacji nasieniem konwencjonalnym. Ustalono, że stosowanie nasienia seksowanego jest ekonomiczne dopiero w przypadku

Tab. 1. Wpływ rasy, kategorii samicy, wielkości dawki nasienia na wskaźnik zacielen oraz proporcję płci z uwzględnieniem nasienia sortowanego

Rasa	Kategoria	Liczba zwierząt (n)	Liczba serwisów	Rodzaj nasienia S (seksowane), NS (nieseksowane)	Liczba plemników	Zapłodnialność (%)	Odsetek pożądanej płci (%)	Autor
HF	Jałówki	343 1028		NS S	15,0 × 10 ⁶ 2,0 × 10 ⁶	51,8 40,2	47,7 85,2	Chebel i wsp. 2010
HF	Krowy	149 157		NS S	15,0 × 10 ⁶ 2,0 × 10 ⁶	45-46 20-21	49 82	Andersson i wsp. 2006
HF	Jałówki Krowy			S S NS S	1,5 × 10 ⁶ 1,5 × 10 ⁶ 15,0 × 10 ⁶ 1,5 × 10 ⁶	56 39 30 25		Norman i wsp. 2010
HF	Jałówki Krowy		6268 5466	NS S S NS S S	15,0 × 10 ⁶ 2,1 × 10 ⁶ 3,5 × 10 ⁶ 15,0 × 10 ⁶ 2,1 × 10 ⁶ 3,5 × 10 ⁶	61 44 46 32 23 25		De Jarnette i wsp. 2010
HF	Jałówki Krowy	22 313 42 353				41,6 17,3	91	Mellado i wsp. 2010
Nizinna czarno-biała	Jałówki	1205 2115		S NS		44 55	85,1 52,7	Djedovoc i wsp. 2016
Nelore	Krowy Jałowice Krowy/Jałowice	443 230 325		S S NS		43,3 36,4 57,9	87,6	Dominiquez i wsp. 2011
Jersey	Jałówki Krowy	191 181		S S	2,1 × 10 ⁶ 2,1 × 10 ⁶	37,6 43,1		Lucena i wsp., 2014

osiągania wartości wskaźnika zacielen powyżej 90% tych, które były rezultatem inseminacji nasieniem konwencjonalnym (50).

Wskaźnik zacielen u jałowic i krów holsztyńsko-fryzyjskich inseminowanych nasieniem sortowanym był niższy niż po inseminacji nasieniem konwencjonalnym (2, 14, 17), różnice te jednak nie były znaczące. Zastosowanie nasienia seksowanego u jałowic pozwalało na uzyskiwanie wyższego odsetka ciąży niż u krów, niezależnie od rasy samic (17, 22, 49). U krów wskaźnik zacielen po zastosowaniu nasienia sortowanego (dawka nasienia – 2 mln plemników) wynosił 20% i był o połowę niższy niż po inseminacji nasieniem konwencjonalnym (dawka inseminacyjna – 15 mln plemników) (2). Na marginesie warto podkreślić niewielkie różnice we wskaźniku zacielen po inseminacji krów i jałowic ras mięsnych nasieniem seksowanym zawierającym gamety „Y”. Inseminacja krów i jałowic rasy nolore nasieniem tego samego buhaja pozwalała na uzyskanie ciąży u, odpowiednio, 43,3% i 36,4% samic (22). Lepsze rezultaty notowano, wykorzystując nasienie sortowane zawierające więcej ($3,5 \times 10^6$) niż mniej ($0,5\text{--}2,1 \times 10^6$) plemników (17). U bydła mlecznego komercyjnie stosowana dawka zawiera $2,1 \times 10^6$ plemników (2). Minimalna dawka nasienia sortowanego dla śródziemnomorskiego bawoła włoskiego (*Bubalus bubalis*) ustalona została na 4×10^6 plemników (25). Warto dodać, że wskaźnik zacielen po inseminacji nasieniem sortowanym i konwencjonalnym był wyższy u krów pierwiastek będących więcej niż 85 dni po porodzie (61). Wskaźnik zacielen u krów po zastosowaniu dawki $2,1 \times 10^6$ wyniósł 25,7%, natomiast po inseminacji nasieniem zawierającym $3,5$ lub 5×10^6 plemników uzyskiwano zapłodnialność rzędu 25,4% i 30,1%. Unasiennianie jałowic analogicznymi dawkami inseminacyjnymi pozwoliło zacielić, odpowiednio, 46,7%, 51,2% oraz 52,5% (19). O niewielkim wpływie wielkości dawki nasienia seksowanego (1 do $1,5 \times 10^6$ oraz 3×10^6) donosili Seidel i wsp. (64). W takich przypadkach elementem decydującym jest głębokość wprowadzenia pistoletu do macicy, w okolicę cieśni maciczno-jajowodowej (37, 53). Uzasadniona wydaje się głęboka depozycja nasienia sortowanego do ipsilateralnego rogu (63). Unasienniając jałowice starsze niż 10 miesięcy i krowy jersey (> 50 dni po porodzie) dawką nasienia sortowanego zawierającą $2,1 \times 10^6$ plemników o wysokim stopniu czystości (90%), względnie dawką zawierającą 10×10^6 plemników o niższej czystości (75%) nie stwierdzono istotnych różnic we wskaźniku zacielen (41). Jak wynika z danych tabeli, pewien wpływ na wyniki zacielen po inseminacji nasieniem sortowanym wywiera rasa krów (14, 22, 44). Odsetek zacielen po pierwszej inseminacji jałowic i krów rasy jersey wynosił 41,6% i 17,3% (44). Był on przy tym stosunkowo wysoki mimo stosowania niskich dawek nasienia ($0,5 \times 10^6$) u mieszańców krów jersey i buhajów z rodzaju *Bos indicus*. Natomiast w porównaniu do krów

ras holsztyńsko-fryzyjskiej wskaźnik zacielen u bydła jersey był wyższy (53 wobec 47%) (18). Z badań duńskich wynika, że inseminacja nasieniem seksowanym powoduje obniżenie wskaźnika zacielen o 5%, 7% i 12%, u krów bydła duńskiego czerwonego, jersey oraz holsztyńsko-fryzyjskiego (10). W Szwajcarii dla bydła rasy brązowej szwajcarskiej i czerwonej fryzyjskiej wskaźnik zacielen 30 do 40 dni po inseminacji nasieniem seksowanym wyniósł 33% dla jałowic i 28% dla krów (8). W Serbii u jałowic rasy nizinnej czarno-białej wskaźnik zacielen po unasiennianiu nasieniem seksowanym i konwencjonalnym wynosił 44% i 55% (21). Mieszańce bydła holsztyńsko-fryzyjskiego i buhajów rasy gyr (mlecznej), powszechnej w Indiach i Ameryce Środkowej (rodzaj *Bos indicus*) miały obniżony wskaźnik zacielen o 10-15% (44). Wskaźnik ciąży po inseminacji nasieniem seksowanym buhajów rasy murreh był wyższy niż w przypadku buhajów nili-ravi, 52,5% w porównaniu do 46,1% (40). Istotne różnice notowano w odsetku ciąż po inseminacjach wykonywanych w różnych porach roku oraz przez różnych inseminatorów, natomiast w przeciwieństwie do krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej u mieszańców wskaźnik zacielen u krów i jałowic był podobny (41).

Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 1, odsetek potomstwa pożądanej płci wynosił od 82% do 91% (2, 14, 22, 44). W nowszych badaniach odsetek ten osiągał 96,5%, przy czym aż 99,6% cieląt nie wykazywało wad rozwojowych (69).

W nielicznych badaniach oceniano wpływ inseminacji w kolejnych rujach na wyniki zacielen po inseminacji nasieniem sortowanym (18, 36). Ustalono, że wskaźnik zacielen był różny po kolejnych rujach. Po inseminacji w pierwszej, drugiej oraz trzeciej i dalszych rujach wynosił u jałowic 47%, 39% i 32%, podczas gdy u krów 26%, 30% i 27% (18).

Inne czynniki ryzyka. Nieliczni autorzy oceniali wpływ stada na wyniki zacielen nasieniem seksowanym (18). Uwzględniając wyłącznie stada, w których dokonano powyżej 50 inseminacji, stwierdzano znaczące różnice. Wartości minimalne odsetka zacielenych krów wynosiły dla nasienia seksowanego 15-41%. Tymczasem po zastosowaniu nasienia konwencjonalnego uzyskiwano 21-39% zacielen. U jałówek wartości minimalne dla nasienia seksowanego wynosiły w różnych stadach 33-68%. Natomiast stosując nasienie konwencjonalne, po wykonanych nim inseminacjach zacieleno w różnych stadach 29-61% samic. Stosunkowo duże różnice notowano także w małych, liczących kilka do kilkunastu krów stadach na terenie niektórych państw europejskich (10, 13, 21).

Wpływ buhaja – dawcy nasienia – na wyniki zacielen okazał się stosunkowo niewielki (13, 19, 24, 64). Różnice dotyczące wskaźnika zacielen po zastosowaniu nasienia seksowanego różnych buhajów mogą w skrajnych przypadkach wynosić od 10% do 20% (10). Spośród ocenianych buhajów u 2/3 notowano obniżenie wskaźnika niepowtarzalności (NNR – non

return rate) o 8%, co przypisywano przede wszystkim zmniejszeniu dawki nasienia. U jednej trzeciej natomiast 5% spadek NNR był spowodowany procesem sortowania nasienia (24). Fakt ten podkreśla znaczenie starannego doboru buhajów do produkcji nasienia (13, 17).

Interesujący jest wpływ wysokiej temperatury otoczenia na rezultaty unasienniania nasieniem sortowanym (36, 44, 46). Wskaźnik zacielen był generalnie niższy niż po inseminacji nasieniem konwencjonalnym, jednak zaznacza się istotnie dopiero w warunkach klimatu tropikalnego. Przykładowo w Meksyku, w styczniu i grudniu wskaźnik zacielen był o 10% wyższy w przypadku inseminacji nasieniem konwencjonalnym niż seksowanym i wynosił 31% wobec 21%. W lipcu wartości te były porównywalne (44). Wydaje się, że w przypadku nasienia sortowanego promowane są embrionalne mechanizmy termoprotekcyjne, co łagodzi supresję płodności w warunkach klimatu gorącego (45).

Parametry techniczne stosowane podczas sortowania plemników są jednym z powodów niższej zapładniałości u krów, zwłaszcza przy zmniejszonej dawce plemników. Nowsze dane wydają się wskazywać, że wielkość ciśnienia stosowanego podczas sortowania plemników nie miała istotnego wpływu na wskaźnik ciąży (61). Podobnie, nowy pulsacyjny laser wykorzystywany we współczesnych sorterach nie powodował większych uszkodzeń plemników od lasera używanego w starszych modelach sorterów (wskaźnik zacielen 42,3% wobec 34,1%) (29). Wzrastające ciśnienie podczas sortowania plemników (275,8 do 344,75 kPa) nie miało istotnego wpływu na zdolność zapładniającą plemników mimo znacznego upływu (9-14 godzin) czasu od pobrania ejakulatu (29, 32).

Próby poprawy wyników zacielen. Niedostateczna obserwacja rui może być jednym z czynników limitujących uzyskiwanie satysfakcjonującego wskaźnika zacielen po inseminacji nasieniem sortowanym. System monitoringu przeżuwania i rui u krów (SCR Heatime HR) umożliwiał precyzyjne ustalenie optymalnego terminu inseminacji. Przypadał on na 23-41 godzin po pojawieniu się wzmóżonej aktywności ruchowej (9). Im bliżej terminu owulacji wykonywano inseminację, tym lepsze były wyniki uzyskiwanych zacielen. Podając GnRH podczas rui ustalono, że wyższy wskaźnik zacielen uzyskuje się, unasienniając jałowice w terminie 20-24 niż 12-16 h po rozpoczęciu rui (57). W nielicznych badaniach oceniano wpływ ustalonej w czasie inseminacji na wyniki zacielen seksowanym nasieniem (11, 60).

Znaczenie intensywności objawów rui dla uzyskiwania wyższego wskaźnika zacielen podkreślano także w innych badaniach (1). W przypadku wyraźnej ekspresji objawów rui wskaźnik zacielen po zastosowaniu nasienia konwencjonalnego wynosił 77%, podczas gdy po inseminacji nasieniem seksowanym 42-51%. Jednocześnie, w przypadku słabo widocz-

nych objawów rui, dla uzyskania lepszych rezultatów zacielen zalecano późniejszy termin inseminacji od ogólnie przyjętego (66). Inseminacja w rujach synchronizowanych zapewniała niższy wskaźnik zacielen niż po naturalnych (1). Unasiennianie samic później niż 50 h po usunięciu wkładki CIDR miało – w odniesieniu do wskaźnika zacielen – przewagę nad wcześniejszą inseminacją (48). Potwierdzają to inne badania, w których jałowki inseminowano 60 h i 54 h po usunięciu wkładki CIDR. Wskaźnik zacielen (TAI – Timed Artificial Insemination – inseminacja w ustalonym czasie) wynosił, odpowiednio, 31,4% i 16,2%. W innych badaniach jałowice unasienniano 66 h po usunięciu wkładki progesteronowej CIDR i aplikacji 100 µg GnRH (11, 42). U jałowic inseminowanych 66 h (FTAI – Fixed Time Artificial Insemination) po usunięciu wkładki progesteronowej CIDR i iniekcji 100 µg busereliny, wykazujących pełnoobjawową ruję, uzyskiwano 46% wskaźnik zacielen, natomiast gdy rują była słabo wyrażona – 26%. Podobnego efektu nie notowano w przypadku używania mrożonego nasienia w konwencjonalnych dawkach (70% wobec 67%) (11).

Nowsze badania dostarczają cennych danych odnośnie do poprawy wyników inseminacji po zastosowaniu nasienia seksowanego. Jeśli w programach inseminacji w ustalonym czasie (TAI) pęcherzyk dominujący (PD) był mniejszy od 9 mm, to wskaźnik zacielen wynosił 31,2%, jeśli był większy od 9 mm – 56,8%. Różnice te w odniesieniu do nasienia konwencjonalnego, niezależnie od rozmiarów PD były porównywalne (58). Nie zmienia to faktu, że mimo wykorzystania tych samych kryteriów wyboru krów do inseminacji (pęcherzyk dominujący 12-18 mm, wpływ klarownego śluzu) wyniki zacielen po inseminacji nasieniem sortowanym były istotnie niższe niż w przypadku użycia nasienia konwencjonalnego (25,7% wobec 39%) (36).

Transfer zarodków. Szerszy przegląd piśmiennictwa odnośnie do wykorzystania nasienia seksowanego do unasienniania dawczyń zarodków na świecie i w kraju przedstawiano wcześniej (32, 59). Najczęściej podkreśla się możliwość znacznego przyspieszenia postępu genetycznego, wynikającego z uzyskiwania potomstwa pożądanej płci. W Europie nasieniem seksowanym unasiennianych jest kilka procent dawczyń. Biorąc pod uwagę generalnie niską liczbę wyplukiwanych dawczyń, jest to wartość marginalna (31).

Pozyskiwanie zarodków *in vivo* oraz produkcja zarodków *in vitro* (IVP). Liczba i jakość pozyskiwanych zarodków nie różnią się istotnie w przypadkach, w których do inseminacji dawczyń używano nasienia sortowanego lub niesortowanego (51). Przyjmuje się, że protokół inseminacji stosowany u krów jest wystarczający do uzyskiwania satysfakcjonujących rezultatów pozyskiwania zarodków od jałowic (35). Niektórzy autorzy zwracają uwagę na znacząco niższy w porównaniu do nasienia niesortowanego odsetek zarodków przydatnych do transferu, głównie najwyższej klasy oraz wysoki odsetek niezapłodnionych oocytów

(3, 38, 65). Jest on szczególnie wyraźny u krów, natomiast u jałowic liczba zarodków przydatnych do transferu jest po inseminacji nasieniem sortowanym i niesortowanym podobna (35). Fenomen ten przypisywany jest przede wszystkim niskiej liczbie plemników w łącznej dawce nasienia. Nie przekraczała ona 8×10^6 plemników, nawet jeśli samice unasienniane były czterokrotnie w odstępach 9-15 h. Więcej informacji na ten temat przedstawiono w opracowaniach przeglądowych (31, 32, 59).

Dane liczbowe odnośnie do produkcji zarodków *in vitro* przedstawiają nieliczne publikacje (61, 68, 69). W nowszych badaniach podaje się, że sortowanie wpływa na plemniki X i na rozwój blastocyst produkowanych *in vitro* prawdopodobnie poprzez obniżenie kompetencji rozwojowej wczesnych form rozwojowych zarodków, nie zaś osłabienie zdolności do zapłodnienia (30). Wskaźnik zacieleń nie różnił się w przypadku transferu zarodków uzyskanych z użyciem nasienia sortowanego i konwencjonalnego zarówno w technologii *in vitro*, jak i *in vivo* (43, 51, 67). Wskaźnik ciąży po przeniesieniu zarodków po inseminacji nasieniem sortowanym i niesortowanym w 30. dniu po rui nie różnił się i wynosił, odpowiednio, 57,1% i 57,3%. W 60. dniu po inseminacji natomiast wynosił 47,6% i 52,9% (3). Większe różnice notowali Finowie (38,1% wobec 44,1%) (46). Z kolei odsetek ciąż uzyskiwany po transferze zarodków produkowanych *in vitro* po inseminacji nasieniem seksowanym, konwencjonalnym lub produkowanych *in vivo* wynosił, odpowiednio, 40,9%, 41,9% i 53,1% (69). Odsetek ciąż wynosił 46,1% i 32,5%, jeśli przenoszono zarodki wyprodukowane w warunkach laboratoryjnych, posiadające obustronne pochodzenie po bydle gyr lub rasy holsztyńsko-fryzyskiej (45). Zarodki o mieszanym pochodzeniu zapewniały wskaźnik zacieleń na poziomie 38,9-40,3%.

Zjawiska niepożądane – straty ciąży i komplikacje porodowe. W niektórych badaniach zwracano uwagę na związek pomiędzy unasiennianiem dawczyń nasieniem sortowanym a zwiększeniem częstości strat ciąży oraz komplikacji porodowych. Poglądy na ten temat nie dają podstaw do jednoznacznych wniosków. Niektórzy autorzy (36) podają, że częstość strat ciąży jest czterokrotnie wyższa po inseminacji nasieniem sortowanym niż nasieniem konwencjonalnym. Inni (64) różnic takich nie notowali zarówno w pierwszym i drugim miesiącu ciąży, jak również w późniejszych jej okresach. O ile po inseminacji nasieniem sortowanym długość ciąży, masa urodzeniowa cieląt, odsetek porodów bliźniaczych oraz odsetek zaburzeń poporodowych były porównywalne do uzyskiwanych po inseminacji nasieniem konwencjonalnym, o tyle istotnie niższa była częstość ciężkich porodów (21, 27, 49). Zmniejszyła się ona zarówno u krów pierwszotek, jak i wieloródek. Fakt ten tłumaczony jest na ogół mniejszymi rozmiarami potomstwa żeńskiego. Trudny do wytłumaczenia pozostaje istotny wzrost

częstości narodzin martwych buhajków, uzyskiwanych w wyniku zastosowania nasienia sortowanego (2). Podobnie 16% częstość rodzenia martwych cieląt męskich notowano po transferze zarodków uzyskiwanych w wyniku inseminacji nasieniem sortowanym dawczyń zarodków. Częstość martwych urodzeń po transferze zarodków uzyskiwanych po inseminacji nasieniem konwencjonalnym wynosiła 9% (46). Z nowszych danych wynika, że cielęta płci męskiej cechowała istotnie niższa żywotność (21). Wnioski te zdaniem niektórych wymagają głębszej analizy (19). Nie zmienia to faktu, że rodzenie się martwych cieląt uzyskiwanych w wyniku inseminacji nasieniem seksowanym nie dotyczy krów (2).

Świnie

Nasienie płynne knurów stosowane jest w hodowli świń na całym świecie. Uzyskiwane wskaźniki płodności są podobne do skuteczności krycia. Metoda ta nie jest w pełni efektywna, ponieważ przechowywanym nasieniem płynnym pochodzącym od jednego knura można unasiennić 2000 macior/loch rocznie (56). Korzystanie z nasienia płynnego ogranicza handel międzynarodowy i spowalnia postęp genetyczny. Obecne badania próbują ten scenariusz zmienić. Szczególną uwagę przywiązuje się do badań mających na celu zmniejszenie liczby plemników w dawce inseminacyjnej, ułatwiając praktyczne wykorzystanie seksowanego nasienia mrożonego u świń w warunkach komercyjnych (54-56).

Mimo że uzyskano potomstwo po inseminacji nasieniem sortowanym knura, opanowano programy mrożenia i obróbki nasienia sortowanego, to nie jest ono wykorzystywane rutynowo (33). Dokonał się tylko niewielki postęp w zakresie inseminacji tego rodzaju nasieniem. Po niechirurgicznej inseminacji nasieniem zawierającym 50×10^6 plemników uzyskiwano 33,3% ciąż, podczas gdy nieseksowanym 54,5%. Wszystkie urodzone prosięta były pożądanej płci, natomiast po inseminacji nasieniem konwencjonalnym urodziło się, odpowiednio, 61,1% i 38,9% osobników męskich i żeńskich (26). W innych badaniach próbowano uzyskać mioty określonej płci po podwójnej inseminacji loch nasieniem mrożonym zawierającym 160×10^6 plemników sortowanych. Lochy zostały zsynchronizowane i poddane niechirurgicznej inseminacji do bliższej szyćce 1/3 rogu macicy 36 i 42 h po podaniu ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG). Maciory unasienniane spermatą mrożoną zawierającą sortowane plemniki miały podobny wskaźnik ciąż w porównaniu z samicami unasiennianymi taką samą dawką spermy nieposortowanej. Odsetek utraconych ciąż w pierwszym jej trymestrze wyniósł po zastosowaniu nasienia sortowanego 37,5% i był istotnie wyższy od notowanego po zastosowaniu nasienia konwencjonalnego (brak utraty ciąż) (4). Obecnie nasienie sortowane może być produkowane rutynowo w tempie 15 milionów plemników na godzinę. Do głębokiego deponowania

nasienia używa się specjalnych instrumentów i dawki zawierającej 50-100 milionów plemników (33). Żywe prosięta pożądanej płci uzyskiwano także, wykorzystując nasienie sortowane w programie produkcji zarodków *in vitro*. Odsetek dzielących się blastomerów był podobny po zastosowaniu nasienia seksowanego i konwencjonalnego, wynosząc, odpowiednio, 30,5% oraz 28,6%. U pięciu spośród siedmiu biorczyń zarodków (zarodki uzyskano po zapłodnieniu nasieniem sortowanym) doszło do sugerującego ciążę przedłużenia cyklu rujowego. Potwierdzono ją ultrasonograficznie w okresie późniejszym (6).

Kozy

Pierwsze informacje na temat zakończonego sukcesem sortowania nasienia kozła oraz narodzin potomstwa pożądanej płci podano w 2013 r. (5). Opracowano także protokoły sortowania nasienia. Plemniki umieszczano, po procesie sortowania, w trzech różnych mediach i zamrażano w rozrzedzalniku Tris-cytrynianowo-glukozowym z dodatkiem 5%, 10% lub 20% żółtka jaja kurzego, umieszczając w 0,25 ml kulkach na suchym lodzie lub mrożono w słomkach we „frezerze” z kontrolowanym spadkiem temperatury. Oceniano parametry nasienia po sortowaniu oraz po rozmrożeniu z wykorzystaniem urządzenia CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) oraz żywotność plemników i integralność akrosomu. Plemniki sortowane mrożone w kulkach miały istotnie wyższą ruchliwość i żywotność po rozmrożeniu niż umieszczane w analogicznej wielkości słomkach. Po inseminacji domacicznej 38% samic zaszło w ciążę, rodząc 83% kozłat pożądanej płci (5).

Owce

Informacje o narodzinach jagniąt po inseminacji świeżym nasieniem sortowanym pojawiły się przed blisko piętnastu laty (28). Ciążę i potomstwo po zastosowaniu nasienia mrożonego opisywano pod koniec pierwszej dekady obecnego stulecia (7, 39). Stosując dwukrotną laparoskopową inseminację z wykorzystaniem nasienia sortowanego i niesortowanego, zawierającego $4-5 \times 10^6$ plemników uzyskiwano 38% i 60% odsetek ciężarnych zwierząt (12). W przypadku jednego z tryków uzyskane rezultaty nie różniły się istotnie. W nowszych badaniach oceniano wpływ miejsca depozycji nasienia sortowanego na wskaźnik ciąży u owiec. Inseminacji dokonywano niską dawką sortowanych plemników, które wprowadzano domacicznie lub w okolice cieśni maciczo-jajowodowej, 54 do 57 godzin po usunięciu wkładek progesteronowych i iniekcji 400 IU PMSG (Folligon). Całkowita dawka niesortowanego nasienia wynosiła 140×10^6 , natomiast sortowanego $2-4 \times 10^6$, zarówno dla dawek zawierających wyłącznie plemniki X, jak i Y. Odsetek ciężarnych owiec po inseminacji nasieniem konwencjonalnym wyniósł 54,3% i był wyższy o 25% i 14,6% od odsetka ciąż uzyskanych po inseminacji nasieniem sortowanym

zawierającym odpowiednio plemniki X i Y. Odsetek jagniąt płci żeńskiej wyniósł 94,4%, męskich natomiast 100% (28). Nieliczne badania przeprowadzono w celu ustalenia optymalnego terminu inseminacji oraz dawki plemników. Sortowane (S) i niesortowane (NS) dawki nasienia zawierały, odpowiednio, 1 lub 15×10^6 plemników po rozmrożeniu. Inseminację przeprowadzono laparoskopowo 50, 54, 58, 62 i 66 godz. po usunięciu źródła egzogennej progesteronu. Dodatkowe grupy stanowiły samice inseminowane dawką zawierającą $0,5 \times 10^6$ S lub NS plemników, które inseminowano 58 godz. po usunięciu wkładki progesteronowej ($n = 60$). W przypadku obu dawek nasienia zawierającego 1×10^6 lub 15×10^6 plemników osiągnęto podobne wskaźniki ciąż, niezależnie od rodzaju plemników inseminując maciorki w 58. godz. (S1 – 46%, S15 – 43%, NS1 – 41%, NS15 – 49%). Ciąż było jednak istotnie mniej w przypadku zastosowania dawki zawierającej $1 - 10^6$ w porównaniu do $15 - 10^6$ plemników u samic inseminowanych 50 godz. po usunięciu gestagenu (15 vs. 36%), 54 godz. (14 vs. 55%), 62 godz. (33 w porównaniu z 7,3%) i 66 godz. (29-56% vs. 9,5%). Nie było także różnicy między wskaźnikami ciąż uzyskanych z wykorzystaniem dawki plemników S i NS zawierającej $0,5 \times 10^6$ ruchliwych plemników w przypadku owiec inseminowanych w 58 godzin po usunięciu progesteronu (15 vs. 14%), jak i dawki 15×10^6 (49 vs. 49%). Więcej niż 90% z jagniąt urodzonych miało przewidywaną płć.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wysnuć hipotezę, że sortowanie nasienia tryków prowadzi do selekcji jednorodnej subpopulacji plemników o wysokiej zdolności do zapłodnienia, skutecznie eliminując z tego procesu plemniki martwe, uszkodzone i nieprawidłowe morfologicznie (7).

Podsumowanie

Wykorzystanie nasienia sortowanego u bydła mlecznego na świecie systematycznie rośnie. Decydujące znaczenie dla dynamiki tego wzrostu ma aktualna cena mleka i wielkość zapotrzebowania na jałowice. W Polsce nasienie takie stosowane jest jeszcze na stosunkowo niewielką skalę. Niewielkie jest także zainteresowanie tym nasieniem u innych zwierząt gospodarskich oraz u bydła mięsnego. Dalsze obniżanie ceny takiego nasienia przy równoczesnym wzroście wiedzy będzie skutkowało rozszerzaniem możliwości jego zastosowania nie tylko w inseminacji, ale i technikach towarzyszących rozrodowi.

Piśmiennictwo

1. An L., Wu Z. H., Wu Y. F., Zhang X. L., Liu X., Zhu Y. B., Cheng W. M., Gao H. M., Guo M., Tian J. H.: Fertility in single-ovulating and superovulated dairy heifers after insemination with low dose sex-sorted sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 2010, 45, 344-350.
2. Andersson M., Taponen J., Kommeri M., Dahlbom M.: Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 2006, 41, 95-97.
3. Baruselli P. S., Souza A. H., Martins C. M., Gimenes L. U., Sales J. N. S., Ayres H., Andrade A. F. C., Raphael C. F., Arruda R. P.: Sêmensexado:

- inseminação artificial e transferência de embriões. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2007, 31, 374-381.
4. Bathgate R., Grossfeld R., Susetio D., Ruckholdt M., Heasman K., Rath D., Evans G., Maxwell W. M.: Early pregnancy loss in sows after low dose, deep uterine artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 2008, 104, 440-444.
 5. Bathgate R., Mace N., Heasman K., Evans G., Maxwell W. M., de Graaf S. P.: Birth of kids after artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed goat spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 2013, 48, 893-898.
 6. Bathgate R., Morton K. M., Eriksson B. M., Rath D., Seig B., Maxwell W. M., Evans G.: Non-surgical deep intra-uterine transfer of in vitro produced porcine embryos derived from sex-sorted frozen-thawed boar sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 99, 82-92.
 7. Beilby K. H., Grupen C. G., Thomson P. C., Maxwell W. M., Evans G.: The effect of insemination time and sperm dose on pregnancy rate using sex-sorted ram sperm. *Theriogenology* 2009, 71, 829-835.
 8. Bodmer M., Janett F., Hässig M., den Daas N., Reichert P., Thun R.: Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology* 2005, 64, 1647-1655.
 9. Bombardelli G. D., Soares H. F., Chebel R. C.: Time of insemination relative to reaching activity threshold is associated with pregnancy risk when using sex-sorted semen for lactating Jersey cows. *Theriogenology* 2016, 85, 533-539.
 10. Borchersen S., Peacock M.: Danish A. I. field data with sexed semen. *Theriogenology* 2009, 71, 59-63.
 11. Butler S. T., Hutchinson I. A., Cromie A. R., Shalloo L.: Applications and cost benefits of sexed semen in pasture-based dairy production systems. *Animal* 2014, 8, 165-172.
 12. Cattaneo L., Martin P., Caballero J. O., Calvi M., Vietri B., Puyo E., Medina M.: Pregnancy rate in ewes inseminated with sexed semen in Argentina. *Rep. Fert. Dev.* 2004, 16, 284-284.
 13. Cerchiaro L., Cassandro M., Dal Zotto R., Carnier P., Gallo L.: A field study on fertility and purity of sex-sorted cattle sperm. *J. Dairy Sci.* 2007, 90, 2538-2542.
 14. Chebel R. C., Guagnini F. S., Santos J. E., Fetrow J. P., Lima J. R.: Sex-sorted semen for dairy heifers: effects on reproductive and lactational performances. *J. Dairy Sci.* 2010, 93, 2496-2507.
 15. Cran D. G.: XY sperm separation and use in artificial insemination and other ARTs. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007, 65, 475-491.
 16. Dahlen C., Larson J., Lamb G. C.: Impacts of reproductive technologies on beef production in the United States. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014, 752, 97-114.
 17. DeJarnette J. M., McCleary C. R., Leach M. A., Moreno J. F., Nebel R. L., Marshall C. E.: Effects of 2.1 and 3.5 × 10 (6) sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *J. Dairy Sci.* 2010, 93, 4079-4085.
 18. DeJarnette J. M., Nebel R. L., Marshall C. E.: Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* 2009, 71, 49-58.
 19. DeJarnette J. M., Nebel R. L., Marshall C. E., Moreno J. F., McCleary C. R., Lenz R. W.: Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in holstein heifers and Lactating Cows. *J. Dairy Sci.* 2008, 91, 1778-1785.
 20. Detterer J., Meinecke-Tillmann S.: Four years practical experience with sexed bull semen in North-West Germany. 27th Annual Meeting A.E.T.E. – Chester, England, 9th-10th September 2011, p. 136.
 21. Djedović R., Bogdanović V., Stanojević D., Nemes Z., Gáspárdy A., Cseh S.: Involuntary reduction in vigour of calves born from sexed semen. *Acta Vet. Hung.* 2016, 64, 229-238.
 22. Domínguez J. H., Costa D. S., Centurion V. J., Faria F. J.: Pregnancy rate of Nelore females inseminated with male-sexed semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2011, 129, 127-131.
 23. Espinosa-Cervantes R., Córdova-Izquierdo A.: Sexing sperm of domestic animals. *Trop. Anim. Health Prod.* 2013, 45, 1-8.
 24. Frijters A. C., Mullaart E., Roelofs R. M., van Hoorne R. P., Moreno J. F., Moreno O., Merton J. S.: What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology* 2009, 71, 64-67.
 25. Gaviraghi A., Puglisi R., Balduzzi D., Severgnini A., Bornaghi V., Bongioni G., Frana A., Gandini L. M., Lukaj A., Bonacina C., Galli A.: Minimum number of spermatozoa per dose in Mediterranean Italian buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed frozen semen and conventional artificial insemination. *Theriogenology* 2013, 79, 1171-1176.
 26. Grossfeld R., Kline P., Sieg B., Rath D.: Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. *Theriogenology* 2005, 63, 2269-2277.
 27. Healy A. A., House J. K., Thomson P. C.: Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 2013, 96, 1905-1914.
 28. Hollinshead F. K., O'Brien J. K., Maxwell W. M., Evans G.: Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y-chromosome-bearing spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 2002, 14, 503-508.
 29. Hutchinson I. A., Shalloo L., Butler S. T.: Expanding the dairy herd in pasture-based systems: the role of sexed semen use in virgin heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.* 2013, 96, 6742-6752.
 30. Inaba Y., Abe R., Geshi M., Matoba S., Nagai T., Somfai T.: Sex-sorting of spermatozoa affects developmental competence of in vitro fertilized oocytes in a bull-dependent manner. *J. Reprod. Dev.* 2016, (in press).
 31. Jaśkowski J. M., Gehrke M., Żychlińska-Buczek J., Jankowiak T., Gołyś S., Grzelak W., Czeladko J., Ruszkowski J.: Nasienie sortowane – inseminacja krów dawczyń i wyniki pozyskiwania i przenoszenia zarodków. Monografia 2016 (w druku).
 32. Jaśkowski J. M., Herudzińska M., Kierbić A., Nowak T.: Nasienie seksowane – nowsze dane populacyjne z uwzględnieniem doświadczeń krajowych. Monografia 2016 (w druku).
 33. Johnson L. A., Rath D., Vazquez J. M., Maxwell W. M., Dobrinsky J. R.: Preselection of sex of offspring in swine for production: current status of the process and its application. *Theriogenology* 2005, 63, 615-624.
 34. Johnson L. A., Welch.: Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 1999, 52, 1323-1341.
 35. Kaimio I., Mikkola M., Lindeberg H., Heikkinen J., Hasler J. F., Taponen J.: Embryo production with sex-sorted semen in superovulated dairy heifers and cows. *Theriogenology* 2013, 80, 950-954.
 36. Karakaya E., Yilmazbas-Mecitoglu G., Keskin A., Alkan A., Tasdemir U., Santos J. E., Guven A.: Fertility in dairy cows after artificial insemination using sex-sorted sperm or conventional semen. *Reprod. Domest. Anim.* 2014, 49, 333-337.
 37. Kurykin J., Jaakma U., Jalakas M., Aidnik M., Waldmann A., Majas L.: Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. *Theriogenology* 2007, 67, 754-759.
 38. Larson J. E., Lamb G. C., Funnell B. J., Bird S., Martins A., Rodgers J. C.: Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology* 2010, 73, 698-703.
 39. Leahy T., Evans G., Maxwell W. M., Marti J. I.: Seminal plasma proteins do not consistently improve fertility after cervical insemination of ewes with non-sorted or sex-sorted frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 2010, 22, 606-612.
 40. Lu Y., Liao Y., Zhang M., Yang B., Liang X., Yang X., Lu S., Wu Z., Xu H., Liang Y., Lu K.: A field study on artificial insemination of swamp and crossbred buffaloes with sexed semen from river buffaloes. *Theriogenology* 2015, 84, 862-867.
 41. Lucena J. A., Kenyon A. G., Reynolds J. P., Moreno J. F., Lenz R. W., Carroll D., Lehenbauer T. W., Champagne J. D., Aly S. S.: Comparison between low-dose, high-sort and high-dose, low-sort semen on conception and calf sex ratio in Jersey heifers and cows. *J. Dairy Sci.* 2014, 1782-1789.
 42. Mallory D. A., Lock S. L., Woods D. C., Poock S. E., Patterson D. J.: Hot topic: Comparison of sex-sorted and conventional semen within a fixed-time artificial insemination protocol designed for dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 2013, 96, 854-856.
 43. Marinho L. S., Sanches B. V., Rosa C. O., Tannura J. H., Rigo A. G., Basso A. C., Pontes J. H., Seneda M. M.: Pregnancy Rates to Fixed Embryo Transfer of Vitrified IVP Bosindicus, Bostaurus or Bosindicus × Bostaurus Embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 2015, 50, 807-811.
 44. Mellado M., Coronel F., Estrada A., Rios F. G.: Fertility in Holstein × Gyr cows in a subtropical environment after insemination with Gyr sex-sorted semen. *Trop. Anim. Health Prod.* 2010, 42, 1493-1496.
 45. Mellado M., Sepulveda E., Macias-Cruz U., Avendaño L., Garcia J. E., Veliz F. G., Rodríguez A.: Effects of month of breeding on reproductive efficiency of Holstein cows and heifers inseminated with sex-sorted or conventional semen in a hot environment. *Trop. Anim. Health Prod.* 2014, 46, 265-269.
 46. Mikkola M., Andersson M., Taponen J.: Transfer of cattle embryos produced with sex-sorted semen results in impaired pregnancy rate and increased male calf mortality. *Theriogenology* 2015, 84, 1118-1122.
 47. Mikulska-Pospiszal A., Tischner M.: Regulacja płci u bydła. Ośmioletnie wyniki inseminacji nasieniem sortowanym (seksowanym) w fermie krów mlecznych. *Życie Wet.* 2010, 85, 769-771.
 48. Noonan E. J., Kelly J. C., Beggs D. S.: Factors associated with fertility of nulliparous dairy heifers following a 10-day fixed-time artificial insemination program with sex-sorted and conventional semen. *Aust. Vet. J.* 2016, 94, 145-148.
 49. Norman H. D., Miller R. H.: Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *J. Dairy Sci.* 2010, 93, 3880-3890.

50. Olynk N. J., Wolf C. A.: Expected net present value of pure and mixed sexed semen artificial insemination strategies in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 2007, 90, 2569-2576.
51. Peippo J., Vartia K., Kananen-Anttila K., Rätty M., Korhonen K., Hurme T., Myllymäki H., Sairanen A., Mäki-Tanila A.: Embryo production from super-ovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2009, 111, 80-92.
52. Pellegrino C. A., Morotti F., Untura R. M., Pontes J. H., Pellegrino M. F., Campolina J. P., Seneda M. M., Barbosa F. A., Henry M.: Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro-produced embryos in cattle. *Theriogenology* 2016, 86, 888-893.
53. Presicce G. A., Verberckmoes S., Senatore E. M., Klinc P., Rath D.: First established pregnancies in Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following deposition of sexed spermatozoa near the utero tubal junction. *Reprod. Domest. Anim.* 2006, 41, 95-97.
54. Rath D., Barcikowski S., De Graaf S., Garrels W., Grossfeld R., Klein S., Knabe W., Knor C., Kuels W., Meyer H., Michal J., Noench-Tegeder G., Rehbock C., Taylor U., Washausen S.: Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects. *Reproduction* 2013, 145, 15-30.
55. Rath D., Johnson L. A., Dobrinsky J. R., Welch G. R., Niemann H.: Production of piglets preselected for sex following in vitro fertilization with X and Y chromosome-bearing spermatozoas sorted by flow cytometry. *Theriogenology* 1997, 47, 795-800.
56. Roca J., Parrilla I., Bolarin A., Martinez E. A., Rodriguez-Martinez H.: Will AI in pigs become more efficient? *Theriogenology* 2016, 86, 187-193.
57. SáFilho M. F., Ayres H., Ferreira R. M., Nichi M., Fosado M., Campos Filho E. P., Baruselli P. S.: Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. *Theriogenology* 2010, 74, 1636-1642.
58. SáFilho M. F., Griotto R., Abe E. K., Penteado L., Compos Filho E. P., Moreno J. F., Sala R. V., Nichi M., Baruselli P. S.: Optimizing the use of sex sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 2012, 90, 1816-1823.
59. SáFilho M. F., Nichi M., Soares J. G., Vieira L. M., Melo L. F., Ojeda A., Campos Filho E. P., Gameiro A. H., Sartori R., Baruselli P. S.: Sex-sorted sperm for artificial insemination and embryo transfer programs in cattle. *Anim. Reprod.* 2014, 11, 217-224.
60. Sales J. N., Neves K. A., Souza A. H., Crepaldi G. A., Sala R. V., Fosado M., Campos Filho E. P., de Faria M., SáFilho M. F., Baruselli P. S.: Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. *Theriogenology* 2011, 76, 427-435.
61. Schenk J. L., Cran D. G., Everett R. W., Seidel G. E. Jr.: Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology* 2009, 71, 717-728.
62. Seidel G. E. Jr.: Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* 2014, 8, 160-164.
63. Seidel G. E. Jr., Allen C. H., Johnson L. A., Holland M. D., Brink Z., Welch G. R., Graham J. E., Cattell M. B.: Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed. *Theriogenology* 1997, 48, 1255-1265.
64. Seidel G. E. Jr., Schenk J. L., Herickhoff L. A., Doyle S. P., Brink Z., Green R. D., Cran D. G.: Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 1999, 52, 1407-1420.
65. Soares J. G., Martins C. M., Carvalho N. T., Nicacio A. C., Abreu-Silva A. L., Campos Filho E. P., Torres Jr J. R., SáFilho M. F., Baruselli P. S.: Timing of insemination using sex sorted sperm in embryo production with Bosindicus and Bostaurussuperovulated donors. *Anim. Reprod. Sci.* 2011, 127, 148-153.
66. Thomas J. M., Lock S. L., Pooch S. E., Eilersieck M. R., Smith M. F., Patterson D. J.: Delayed insemination of nonestrous cows improves pregnancy rates when using sex-sorted semen in timed artificial insemination of suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 2014, 92, 1747-1752.
67. Trigal B., Gómez E., Caamaño J. N., Muñoz M., Moreno J., Carrocera S., Martín D., Díez C.: In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology* 2012, 78, 1465-1475.
68. Wheeler M. B., Rutledge J. J., Fischer-Brown A., VanEtten T., Malusky S., Beebe D. J.: Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology* 2006, 65, 219-227.
69. Xu J., Guo Z., Su L., Nedambale T. L., Zhang J., Schenk J., Moreno J. F., Dinnyés A., Ji W., Tian X. C., Yang X., Du F.: Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. *J. Dairy Sci.* 2006, 89, 2510-2518.
70. Xu Z. Z.: Application of liquid semen technology improves conception rate of sex-sorted semen in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2014, 97, 7298-7304.

Adres autora: lek. wet. Bartłomiej M. Jaśkowski, ul. Azaliowa 23, 62-002 Złotniki; e-mail: bmjaskowski@gmail.com