

Alternativ till kirurgisk kastrering av gris

Sammanfattning av slutrapport

Jane Morrel, Inst. för kliniska vetenskaper, Sveriges lantbruksuniversitet.

Inledning

Hos vissa könsmogna hangrisar uppstår en obehaglig galtluk i köttet, därutöver utvecklar den könsmogna galten ett sexuellt och ofta aggressivt beteende. Kirurgisk kastrering sker för att förhindra att detta sker men kirurgisk kastrering ifrågasätts idag ffa av djurskyddsskäl. Inom EU vill man också införa förbud mot kirurgisk kastrering. Till djurskyddsskäl hänförs inte bara smärtan vid kastreringen utan hit hänförs också problemen med det sexuella beteende och den ökade aggressivitet som utvecklas hos okastrerade handjur vid könsmognaden och de problem som uppstår i en grupp djur (slagsmål mellan galtar, skador vid upphopp och eventuella dräktiga hondjur). Användning av könssorterad spermier för artificiell inseminering skulle minska behovet av kastrering då könet på de födda smågrisarna kan förutbestämmas.

Bakgrund

Galtlukten i griskött orsakas framför allt av androstenon och skatol, som ökar kraftigt vid könsmognaden. Koncentrationen av dessa substanser är mycket låg hos kirurgiskt kastrerade hangrisar. Under senare år har kastration utan bedövning av smågrisar fram till sju dagars ålder ifrågasatts av allmänhet och politiker och ett förbud annonseras inom EU. Alternativa till kirurgisk kastration finns, exvis immunologisk kastration via ett vaccin, som innehåller en modifierad form av GnRH. Metoden har testats i Sverige, men ifrågasätts bl a för att den är dyr och komplicerad att tillämpa i produktion. Ett annat alternativ är att anrika andelen X-kromosombärande spermier inom AI, så att de flesta smågrisar som föds blir hongrisar. Projektet fokuserades på metodik för att anrika spermier av en visst kromosomalt kön (X), nämligen (i) kolloid centrifugering av spermier, och (ii) behandling med antikroppar mot proteiner på spermiernas yta. Parallela experimenter behövdes också för att få fram en uppskalade teknologi som gör det möjligt att hantera stora mängder spermier (hela ejakulat) för rutinmässigt kolloid centrifugering.

Metodik och Resultat

1. Könssortering av spermier med kolloid centrifugering

Preliminära experiment visade att man genom att ändra centrifugeringsinställningar (tid och g-kraft) vid Single Layer Centrifugation (SLC) inte kunde påvisa några skillnader från det förväntade 50:50 förhållandet. Genom att förändra innehållet i kolloiden kunde däremot andelen X-bärande spermier ökas med ca 6 %, men samtidigt återfanns totalt färre spermier i pelleten efter centrifugering. Det fastslogs att den ökning av andelen X-bärande spermier som blev erhölls var för liten för att resultera en signifikant skillnad i könsfördelningen i födda kullar men att möjligheten kvarstod att undersöka om man genom fortsatta justeringar i kolloidens sammansättning trots allt kunde öka andelen X-kromosombärande spermier.

2. Uppskalning av kolloid centrifugering, spermiefrysning och spermiefertilitet

I hopp om att kolloidcentrifugeringen skulle möjliggöra separering av X- och Y-kromosombärande spermier satte vi igång parallellt med att utveckla SLC metoden ytterligare

för att hantera större mängde spermier och att utveckla metoder för djupfrysning av selekterade spermier. Båda dessa tekniker skulle behövas om SLC skall kunna användas för spermier från galt. SLC-selektade spermier har preparerats fram i 200 ml provrör (SLC-60) och i 500 ml provrör (SLC-150) och resulterat i likvärdig spermiekvalitet som i fås vid användning av originalmetoden med 15 ml provrör. Anpassning av metoden till att processa 150 ml spädd sperma i ett och samma provrör (500 ml) har gjort det möjligt att processa det voluminösa galtejakulatet i endast ett fåtal provrör. Dessutom har preliminära försök att frysa SLC-selektade galt spermier varit framgångsrika. Fertiliteten hos SLC-selektade galt spermier testades i ett *in vitro* fertilisering system och var normalt.

3. Könsortering av spermier med antikroppar mot proteiner på spermiernas yta

Kontakt etablerades kontakt med Dr Ian Cumming vid Ovasort, ett företag från Wales, Storbritannien, som har lyckats med att identifiera könsspecifika proteiner på spermiernas yta och tagit fram antikroppar för dessa. Vi fick några av dessa antikroppar från företaget för att testa och bestämma om spermier kunde samlas ihop beroende på lämpligt ytprotein och därefter separeras. Trots problem med identifiering av andelen X-kromosombärande spermier genom PCR (polymerase chain reaction), kunde vi till slut göra grov separering av X respektiv Y-kromosombärande spermier, t.ex. en anrikning upp till 75:25 i stället för 50:50.

Avslutningsvis Det lyckades inte att få fram en signifikant förändring från den normala proportionen 50:50 vad gäller X- och Y-kromosombärande spermier med hjälp av enbart kolloidcentrifugering. Dock framkom intressanta resultat vid användning av antikroppar mot spermiers ytproteiner. En kombination av antikroppar, för att agglutinera spermier följt av en kolloidcentrifugering för att separera agglutinerade och icke-agglutinerade spermier kan visa sig vara en användbar metod för könsseparering av galt spermier.

Publikationer från projektet

Morrell JM & Wallgren M. (2011) Colloid centrifugation of boar semen. *Reproduction in Domestic Animals* 46, 18-22.

Morrell JM, van Wienen M, Wallgren M (2011) Single Layer Centrifugation can be scaled-up further to process up to 150 mL semen. *ISRN Veterinary Science* doi: 10.5402/2011/183412.

Martinez-Alborcia MJ, Morrell JM, Parrilla I, Barranco I, Vázquez JM, Martinez EA, Roca J. (2012) Improvement of boar sperm cryosurvival by using single-layer colloid centrifugation prior to freezing. *Theriogenology* 78, 1117-1125.

Morrell JM (2012) "Applications of colloid centrifugation in Assisted Reproduction". Ch. in "Colloids: Classification, Properties and Applications", Nova Publishers.

Morrell JM, *et al* Small changes in the X:Y ratio of boar spermatozoa after colloid centrifugation. In preparation

Poster presentationer från projektet

MVP van Wienen, M Wallgren, JM Parvlevliet, JM Morrell (2011) Boar spermatozoa survive freezing after Single Layer Centrifugation with Androcoll-P. *Reproduction in Domestic Animals* 46, Suppl. 2, Abst. P2.

M Wallgren JM Morrell (2011) Single Layer Centrifugation with Androcoll-P can be scaled-up into 500 mL tubes. *Reproduction in Domestic Animals* 46, Suppl. 2, Abst. P36.

YCB Brandt, JM Morrell, R Gonzalez (2011) Fertility of boar spermatozoa prepared by Single Layer Centrifugation in *in vitro* fertilization (IVF). *Reproduction in Domestic Animals* 46, Suppl. 2, Abst. P37.

JM Morrell, A Lundequist, I Cumming. Potential sexing of spermatozoa using antibodies to sperm surface proteins. Submitted for International Conference on Pig Reproduction (ICPR) 2013

MJ Martinez-Alborcia, MA Gil, JM Morrell*, C Maside, I Parrilla, I Barranco, JM Vazquez, EA Martinez and J Roca. Single Layer centrifugation with Androcoll-P prior to freezing enhances the *in vitro* fertilizing ability of frozen-thawed boar spermatozoa. Submitted for ICPR 2013.