

# ПРОГРЕСС В ПРОИЗВОДСТВЕ СЕКСИРОВАННОГО СЕМЕНИ

*Леонардо Ф.С. Брито*  
*Директор подразделения «Сексинг Текнолоджиз Джсенетикс»*  
*по глобальному контролю качества.*

## Введение

К 2050 году ожидается, что численность мирового населения достигнет приблизительно 10 миллиардов. Рост населения в сочетании с трендом урбанизации и повышения доходов на душу населения приведёт к повышению спроса на продукты на 50% от уровня 2012 года. Удовлетворение возросшего спроса на продукты питания при существующих практиках производства приведёт к ещё к более жесткой конкурентной борьбе за пользование природными ресурсами, повышению выброса парниковых газов, вырубке лесов и истощению почвы. Экологически устойчивая практика мирового скотоводства, и даже само ее существование, основано на стратегиях и инициативах обеспечения белком 10 миллиардов человек экономически эффективным способом, безопасным для здоровья человека и окружающей среды.

Эффективность производства (продуктивность на голову животного и земельную единицу) связана с устойчивым и рассчитанным на долгосрочную перспективу природопользованием. Использование искусственного осеменения способствовало созданию крупномасштабных селекционных программ по разведению КРС, что за последние 50 лет привело к росту продуктивности, эффективности, качеству продукции, а также к прогрессу в области экономики и защите окружающей среды. Например, молочная продуктивность в США в 2007 году возросла на 59% при снижении поголовья коров на 64% по сравнению с 1944 годом. Производство объёма молока уровня 1944 года потребовало бы в 2007 году только 21% коров, 23% кормов, 10% земли и 35% водных ресурсов. В результате производство парниковых газов снизилось на 41% (Совет по национальным исследованиям, 2015).

За последнее десятилетие произошла революция в индустрии скотоводства посредством развития и использования новой генетики и технологиям воспроизводства, а именно использование геномной оценки для селекции и коммерческое использование сексированного семени для искусственного осеменения. Геномная селекция сократила интервал между поколениями и ускорила генетический прогресс в молочном скотоводстве, новые программы в мясном животноводстве тоже имеют многообещающие результаты. Хотя, использование сексированной спермы справедливо считается отраслью репродуктивной биотехнологии, можно с уверенностью заявить, что данная технология является областью генетической селекции, так как пол индивидуума считается генетической характеристикой. Большинство генетических характеристик можно управлять посредством селекции. Но до изобретения методики разделения спермы по полу, производителям приходилось принять факт, что вероятность появления особей мужского пола составит 51%. По причине огромного влияния пола теленка на всю систему воспроизводства, пол особи считается наиболее важной генетической характеристикой (Сейдел, 2003). По этой причине сексированное семя продолжит быть одним из главных факторов эффективности животноводства и устойчивости производства.

Производство сексированной спермы значительно улучшилось с момента начала его коммерческого использования, но по-прежнему продолжает эволюционировать быстрыми темпами. Результатом применения новейших технологий стало появление нового продукта под торговой маркой SexedULTRA 4M (ультрасексированная сперма с

концентрацией 4 миллиона сперматозоидов), что позволило производителям поддерживать показатель плодотворных осеменений на уровне использования традиционной спермопродукции.

### **Краткая справка по истории технологии разделения спермы по полу**

Первоначально технология разделения спермы по полу была разработана США в правительственных исследовательских центрах. Исследования начались в Ливерморской Национальной Исследовательской лаборатории имени Э. Лоуренса в 1970-х годах, где ученые изучали эффект воздействия радиации на сперму мышей в качестве модели для выявления повреждений зародышевой линии и с этой целью разработали проточные цитометрические технологии, благодаря которым появилась возможность точного измерения спермы ДНК, что продемонстрировало научный прорыв потенциальных возможностей использования данного метода для выявления Х и Y-сперматозоидов на основе различий содержания ДНК (Гарнер & Зайдель, 2008). Дальнейшее развитие технологии происходило в США в г. Белтсвилл в Сельскохозяйственном исследовательском Центре в 1980-х и 1990-х годах, когда изменения в методах окрашивания сперматозоидов и дальнейшие достижения в области проточной цитометрии стали серьезным прорывом, в результате которого родились живые кролики, полученные методом искусственного осеменения сексированной спермой (Джонсон и соавт., 1989), что продемонстрировало возможность применения технологии в коммерческих целях.

После обнадеживающих результатов использования искусственного осеменения КРС свежей спермой с низкой концентрацией спермиев в середине 1990-х Министерство сельского хозяйства США выдаёт лицензию компании XY. Данная компания получает финансирование от Государственного исследовательского Фонда Университета, (штат Колорадо), а также частных инвесторов для коммерциализации технологии разделения по полу спермы млекопитающих (кроме человека) (Гарнер & Зайдель, 2008). Дальнейшее развитие метода высокоскоротной проточной цитометрии привело к скачку в производстве сексированной спермы от нескольких сотен сперматозоидов в секунду до ~3,000 сперматозоидов в секунду и приблизительной точности 90% (Джонсон & Уэлч, 1999). Разработка методов криоконсервации сексированного семени (Шенк и др. 1999) и демонстрация приемлемого уровня стельности от замороженного сексированного семени (Зейделя этАль., 1999) открыли двери для коммерческого применения технологии.

Коммерческие лицензии были выданы племенным центрам в начале 2000 года, и началось проведение коммерческого тестирования по всему миру. Изменения в развитии технологий произошли, когда компания Sexing Technologies (ST) получила лицензию по разделению спермы по полу в 2004 и начала создавать небольшое количество лабораторий по сортировке спермы по полу. В 2007 компания ST приобрела компанию XY и пересмотрела коммерческий подход с целью предоставления племенным центрам по искусственному осеменению более широкого доступа к сексированной сперме, производство которой постоянно наращивало объёмы при постоянном качестве и приемлемой цене (Гиллиган, 2014). На сегодня все крупнейшие мировые центры по искусственному осеменению используют технологии компании ST для производства разделённой по полу спермы от разнообразных групп топовых быков как важную и неотъемлемую часть их производственного портфолио.

### **Производство сексированной спермы**

Производство сексированной спермы основано на разнице содержания ДНК между мужской и женской хромосомами, в результате они имеют разный размер. В среднем,

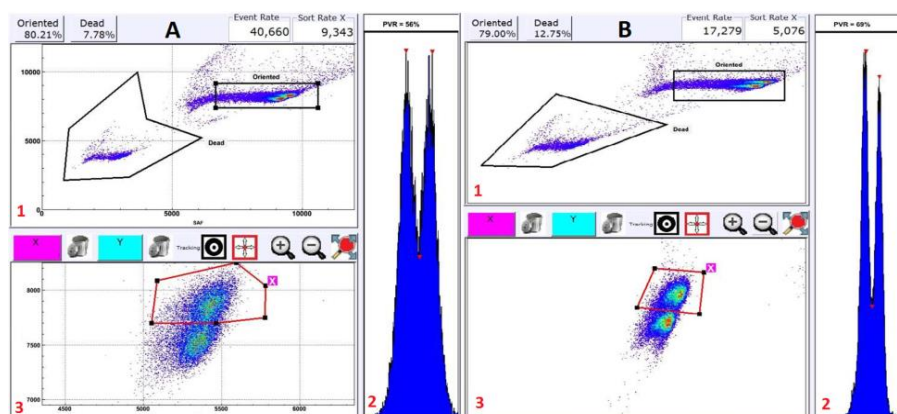
различие между мужской и женской клеткой составляет приблизительно 4%, хотя незначительные различия имеют место по породе (4,22% у Джерсейской, 4,07% у Ангусской, 4,01% в Голштинской и 3,7% в породе Браман, (Гарнер, 2006)). Окрашивание происходит с помощью окрашивающего вещества Hoechst 33342 (H33342), которое проникает в мембрану клетки и связывается избирательно на А/Т базовые пары. Данное окрашивающее вещество демонстрирует относительно высокую точность (возбуждающая/излучающая максимально около 350/460 nm) для определения количества ДНК в живых клетках с помощью метода проточной цитометрии. Для количественного определения содержания ДНК спермы используется проточный цитометр.

Вкратце, молекулы ДНК, связанные с красителями H33342, возбуждаются лазером, пока сперма проходит два флуоресцентных детектора, которые измеряют интенсивность флуоресценции. Сила сигналов флуоресценции зависит от количества флуоресцирующих молекул, связанных с ДНК, что позволяет дифференцировать X- и Y-сперматозоидов.

В гаметах с X хромосомой содержится ДНК на 4% больше, чем в сперматозоидах с Y хромосомой. Производя окрашивание хромосом половых клеток, специалисты установили, что гаметы с X хромосомой поглощают на 4% красителя больше, чем гаметы с Y хромосомой. От количества поглощенного красителя зависит уровень флуоресцентного излучения, которое улавливается компьютером, что позволяет определить X и Y хромосомы.

После сбора и оценки сперму надо подготовить к сортировке. Это включает разбавление соответствующими буферами, удаление семенной плазмы и регулировку концентрации клеток в оптимальном диапазоне. Затем пробу инкубируют при оптимальной концентрации H33342 на заранее определенный период времени. Окрашенная сперма закачивается в поток перед лазерным лучом и сперма излучает очень яркое синее флуоресцентное свечение. Эта флуоресценция измеряется, когда сперматозоиды проходят один за другим через трубу фотоэлектронных умножителей. Специализированное программное обеспечение используется для анализа относительной флуоресценции X и Y-сперматозоидных популяций и происходит выбор, отсортировка спермиев требуемого пола (рис. 1). Кристаллический вибратор разбивает поток жидкости на отдельные капли, содержащие одиночные сперматозоиды. Затем сперматозоиды сортируют, помещая противоположные электрические заряды на капельки, содержащие X-сперматозоиды, и те которые содержат Y-сперматозоиды.

Поток капель проходит через положительно и отрицательно заряженное электрическое поле и направляется в разные стороны для сбора, третий поток незаряженных капель отбрасывается (Джонсон, 2000; Зайдель & Гарнер, 2002) (Рис. 2).



*Рис. 1. Гистограммы проточной цитометрии применяются для анализа относительной флуоресценции популяций X и Y-сперматозоидов и выбора сортируемой популяции.*

В гистограммах (1), мертвые сперматозоиды и сперматозоиды с необходимой ориентацией можно различить и отсортировать. Степень различия (PVR) по интенсивности флуоресценции между X и Y-сперматозоидами может быть визуализирована в гистограммах (2), и популяция спермиев, отобранная для производства отражена в гистограмме (3). Высокая производительность сортировки (A) позволяет производить максимальное количество пайет за единицу времени. Например, >40,000 спермиев в секунду проходят через сортировочное оборудование и >9,300 сперматозоидов в секунду сортируются как пригодные. Высокая эффективность (B) сортировки позволяет произвести из определенного количества эякулята максимальное количество пайет и требует постоянной корректировке частоты событий сортировки для максимизации доли сперматозоидов, отсортированных из общей популяции сперматозоидов; в этом примере после сортировки остаётся 29% спермиев требуемого пола от общего количество (>5,000 сперматозоидов в секунду отсортированные при сортировке 17000 спермиев в секунду). Различные модели сортировки позволяют племенным центрам планировать производство семени в зависимости от возраста быка, наличия семени, и спрос для адекватного удовлетворения потребности клиентов в сексированной сперме. (Гиллиган, 2014).

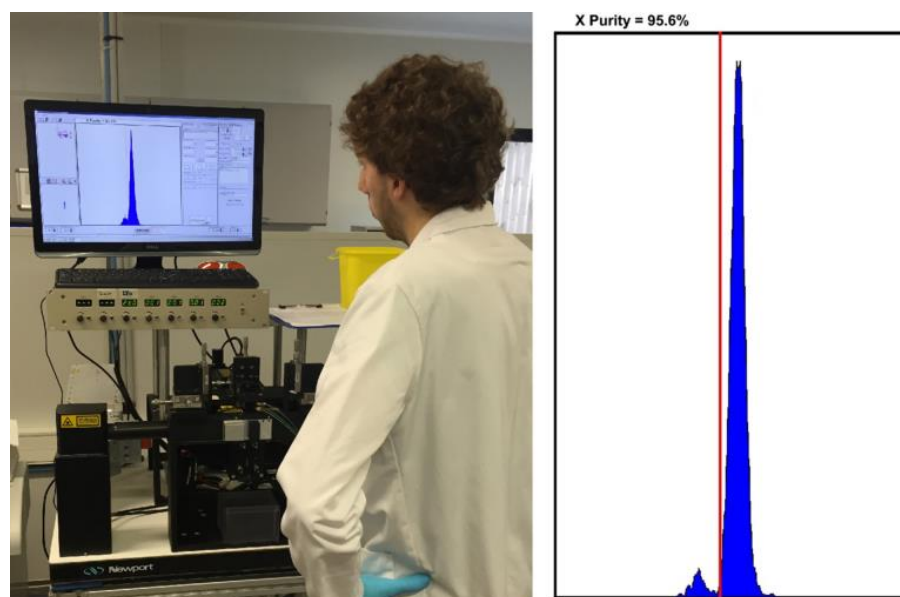


*Рис. 2. Высоковольтные пластины используются для разделения электрически заряженных капель, содержащих желаемого пола сперматозоиды.*

Тонкую струю жидкости можно наблюдать, когда она проходит через пластины и отбрасывается налево в пластиковую пробирку для сбора семени. А капли, содержащие сперматозоиды ненужного пола, мертвые или некачественные сперматозоиды собираются в поток отходов (металлическая трубка в центре). Распространенным заблуждением является то, что X и Y-сперматозоиды всегда сортируют одновременно и отходы спермы после сортировки реализуются как традиционная сперма. На самом деле, подавляющее большинство производства сексированной спермы предполагает выпуск только одного пола спермы и другой пол полностью выбрасывается.

Отсортированную сперму собирают в пробирки, содержащие соответствующие буферы для защиты клеток во время сортировки и процессов охлаждения. После

сортировки, тубы медленно охлаждают до 5°C. Добавляются дополнительные разбавители, содержащие криопротекторы, и пробирки пропускают через центрифугу для получения концентрированных гранул спермы. Далее с помощью разбавителей получают нужную концентрацию. После периода стабилизации сперма фасуется в пайеты и замораживается в программируемом замораживателе, с соблюдением оптимальной кривой замораживания (Джонсон, 2000; Зайдель & Гарнер, 2002). После оттаивания проводится контроль качества, включающий в себя оценку подвижности сперматозоидов и целостность акросомы после 3 часов инкубации при температуре 35°C, анализ чистоты сортировки (рис. 3), концентрации и бактериологии. В целом, производство сексированного семени включает в себя более 20 подпроцессов (этапов).



*Рис. 3 Анализ чистоты сортировки проводится на протяжении всего процесса производства (картинка слева), для того чтобы при необходимости сделать поправки на любом этапе производства.*

Анализ качества и чистоты сортировки проводится после разморозки перед тем, как семя поступит в продажу. Данная гистограмма показывает количество сперматозоидов с хромосомами X и Y. В этом случае X хромосомы составляют 95,6% чистоты сортировки (рисунок справа).

### **Технология производства ультрасексированной спермы SexedULTRA™**

Постоянные инвестиции в исследования и развитие технологии сексирования спермы способствовали значительным улучшениям качества и фертильности настолько, что был создан новый продукт. Хотя официально продукт под брендом «Ультрасексированная сперма» был запущен в 2013 году, важно понять, что данный продукт является кульминационной точкой серии инновационных технологий, сочетание которых позволило создать продукт, значительно отличающийся от технологии производства по лицензии компании XY. Некоторые новшества включают оптимизацию жидкостной среды для проточной цитометрии (защитная жидкость для оболочки сперматозоидов), разбавители, крупномасштабное производство сред и разбавителей для племенных центров по искусственному осеменению по всему миру, оптимизация условий окрашивания и поставка стандартного модернизированного оборудования по всему миру (Рис. 4).







Рис. 5 Genesis™ — новое поколение оборудования для сортировки методом проточной цитометрии компании Cytonome/ST, LLC.

Первичные лабораторные исследования показали, что результаты инвитро тестов на качество семени, включая подвижность спермиев и целостность акросомы, значительно выше при использовании новых технологий SexedULTRA™ по сравнению с традиционной методикой XY для разделения спермы по полу (Рис 6.). Более того, использование ультрасексированного семени для осеменения инвитро способствовало увеличению продуцирования blastocysts и большей пропорции эмбрионов, подходящих для заморозки (Таблица 1, Gonzalez-Marín et al., 2016). На первоначальном этапе исследований в производственных условиях на небольшом количестве осеменений с участием отраслевых партнеров было выявлено, что у телок Голштинской и Джерсейской пород показатель стельности на 7,4% выше при работе с ультрасексированной спермой SexedULTRA™ (таблица 2, Vishwanath, 2014).

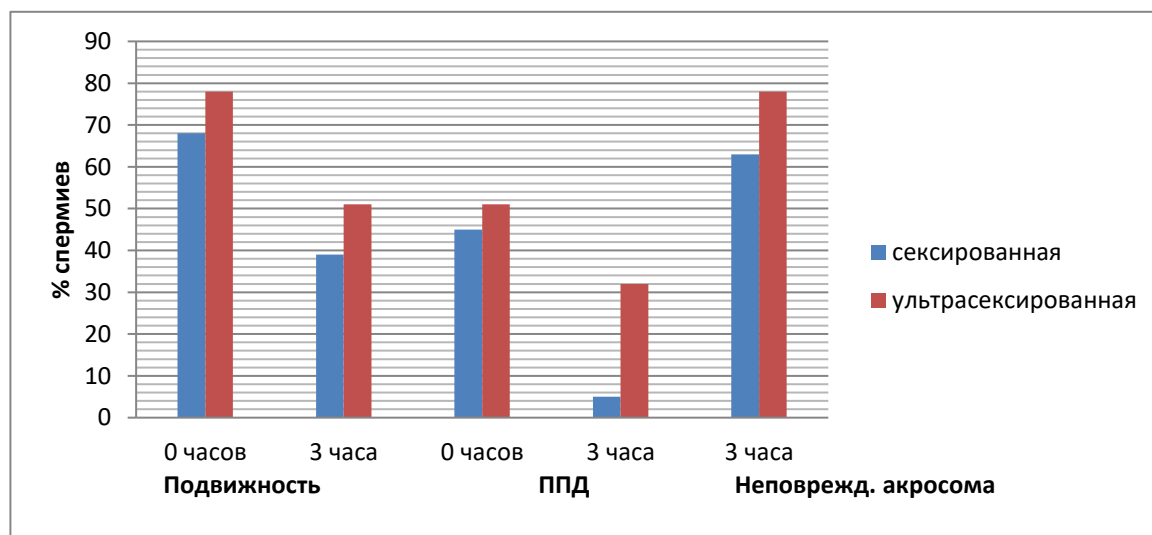


Рис. 6. Влияние технологии SexedULTRA™ на качество спермы методом лабораторных инвитро тестов. Общая подвижность сперматозоидов и процент с прямолинейно-поступательными движениями (ППД) определяли с помощью компьютерного анализа спермы. Процент спермиев с неповрежденной акросомой определялся с использованием DIC микроскопии (количество быков — 12 голов).\*\* Разница ( $p < 0,001$ . (Гонзалес-Марин, 2016).

Таб. 1. Эффективность SexedULTRA™ при производстве эмбрионов invitro (Гонзалес-Марин, 2016).

	Количество яйцеклеток (ооцитов)	Скорость разщепления эмбрионов	% бластоцист	Эмбрионы, пригодные к заморозке
Сексированная XY	5,082	32,7%	18,4%	9,2%
SexedULTRA™	5,081	34,8%	22,3%	13,2%

Погрешность  $P < 0,05$

Таб. 2. Эффективность использования SexedULTRA™ на телках. Показатель оплодотворяемости. Результаты Испытаний Select Sires (SS), 2014.

	Количество осеменений	Показатель оплодотворяемости
<b>Испытания ST</b>		
Сексированная XY	1,166	47,3%
SexedULTRA™	957	54,7%
Повышение оплодотворяемой способности		7,4%
<b>Испытания Select Sires</b>		
Сексированная XY	3,384	41,6%
SexedULTRA™	3,546	46,1%
Повышение оплодотворяемой способности		4,5%

Собранные данные Министерства сельского хозяйства США (USDA) по использованию сексированного семени на телках Голштинской породы на территории США продемонстрировали положительный эффект от использования технологии SexedULTRA™ на показатели стельности. Данные, собранные по осеменениям телок и коров сексированной спермой в период с 2007 по 2015 год наглядно показывают постоянное сокращение разницы в показателе стельности при использовании традиционной и сексированной спермы, что совпало с началом продаж ультрасексированной спермы SexedULTRA™ в 2013 году (Рис. 7. Hutchison & Bickhart, 2016).

Интересно, что число осеменений на телках выросло с 22,5% в 2013-м до 30,7% в 2015-м. Несмотря на то, что использование семени на коровах остаётся низким, этот показатель вырос с 0,5% в 2013-м до 1% в 2015-м. Изменения в использовании сексированной спермы, особенно на коровах, вероятно, связаны с повышением показателя оплодотворяемой способности, который сопоставим с показателем при работе с традиционной спермой.

Данные, полученные компанией ST Genetics по анализу результатов на партнерских стадах Голштинской и Джерсейской породы в период с 2012 по 2016 год, очень близки к данным Министерства сельского хозяйства США. Доля использования сексированной спермы и результаты плодотворных осеменений выросли с 2013 года, с момента введения на рынок SexedULTRA™. Использование сексированной спермы на коровах Голштинской породы первой и второй лактации становится всё более распространённым и практически вытеснило использование традиционного семени на телках и коровах Джерсейской породы. Процент плодотворных осеменений при использовании SexedULTRA™ может равнозначно достигнуть 85-90% от плодотворных осеменений при использовании традиционного семени (Рис. 9).



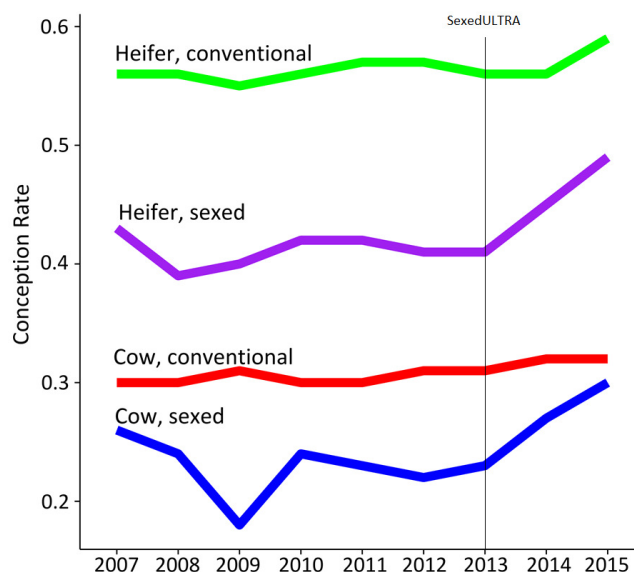


Рис. 7. Показатель плодотворных осеменений на коровах и телках Голштинской породы в США с 2007 по 2015 год только с подтвержденными результатами стельности рассчитан из следующих данных: 5,963,876 осемененных телок (из них 1,323,721 сексированным семенем) и 42,232,502 осемененных коров (253,586 сексированным семенем).

Показатель плодотворных осеменений сексированным семенем на тёлках за последнее время вырос, благодаря усовершенствованию технологии (42% в 2007 году до 49% в 2015 году). Сопоставимые показатели стельности телок традиционным семенем: 56% в 2007 году и 59% 2015 году, соответственно. Показатели плодотворных осеменений сексированным семенем на коровах — 26% в 2007 году и 30% в 2015 году. Для сравнения 30% и 32% — показатели плодотворных осеменений на коровах традиционной спермой в этот же период времени. (Взято из Хатчисон & Bickhart, 2016).



Рис. 8. Использование сексированного семени в партнёрских стадах ST Genetics с 2012 по 2016. Данные по Голштинам основаны на исследованиях 2,596,636 осеменений и по Джерсейской породе 575,018 осеменений. (Heuer, 2017).

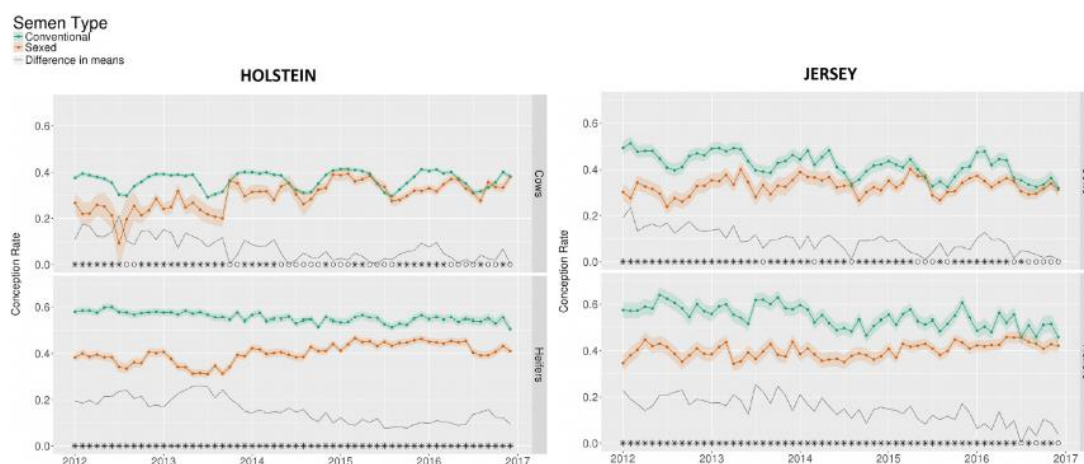


Рис. 9. Процент продуктивных осеменений сексированной и традиционной спермой в партнерских стадах ST Genetics.

В исследования включены подтвержденные результаты с 2012 по 2016 год от лактаций 0-2, количество осеменений от 1-3. Данные по Голштинской породе включают 1,581,291 осеменений от 3,995 быков на 94 стадах. По Джерсейской породе данные основаны на результатах 575,018 осеменений от 97 быков в 49 стадах. Анализ, выполненный с использованием линейной модели с взаимодействием тип-год-месяц, порядковым номером осеменения и возрастной группой быка в качестве фиксированных эффектов. \*Традиционная и сексированная сперма различаются; °Традиционная и сексированная сперма не различаются (Heuer, 2017).

### SexedULTRA 4M™

Успешное производство сексированной спермы должно учитывать устойчивость сперматозоидов к окрашиванию, к воздействию лазера, разбавителю, повышенному давлению и некоторым другим изменениям композиции среды в процессе сексирования. Исторически сложилось так, что усугубляющее действие этих факторов привело к тому, что можно было бы назвать некомпенсируемыми изменениями в сперме.

Однако, увеличение дозы осеменения до 2,1 миллионов спермиев, которые используются как стандарт в индустрии искусственного осеменения, показало незначительные улучшения или отсутствие положительных результатов повышения осеменений. Несмотря на то, что наблюдались некоторые эффекты разных концентраций спермодозы у различных быков (фертильность спермы), изменение концентрации от 2,1, 3,5 или 5 миллионов спермиев в дозе не имело эффекта на стельность ни на телках, ни на коровах (DeJarnette et al., 2008; 2010). В другом исследовании сравнивали сексированную сперму с концентрацией 2,1 миллионов спермиев и 10 миллионов спермиев с традиционной. Сексированная сперма в обоих случаях показала почти идентичное снижение оплодотворяемости при обеих концентрациях в дозе. Хотя концентрация сексированной спермы была повышена до 10 миллионов спермиев в дозе, показатель оплодотворяемости несравним с результатами плодотворных осеменений традиционной спермой с обеими концентрациями. (DeJarnette et al., 2011).

Одно из наиболее интересных наблюдений с момента внедрения технологии SexedULTRA™ является факт, что благодаря новым технологиям не только значительно минимизировано пагубное воздействие обработки на сперматозоиды, но также компенсируются негативные биологические изменения сперматозоидов. В исследованиях,

проводимых совместно с компанией German Genetics International, эякуляты от 5 быков были разделены на четыре и из них получили сексированную сперму с концентрацией 2,1 миллион, используя традиционный метод разделения по полу XY, а также и с концентрацией 2,1 миллион, 3 миллиона и 4 миллиона по технологии SexedULTRA™. Одновременно произвели традиционную сперму с концентрацией 15 миллион в качестве контрольного образца. 7,855 телок, осеменённые сексированным семенем и 626,398 телок, осеменённых традиционным семенем были оценены по показателю 56 дней невозврата в охоту. Как и ожидалось, сексированная сперма 2,1 традиционным методом показала более низкие показатели по плодотворным осеменениям, чем традиционной и SexedULTRA™ разной концентрацией. Хотя SexedULTRA™ 2,1 миллион и 3 миллиона показали результаты более низкие, чем у традиционной спермы, повышение концентрации до 4 миллионов спермиев в дозе позволило добиться результатов, сопоставимых с показателями по традиционной сперме (Рис. 10, 2016). Эти результаты впервые продемонстрировали:

1) непрерывно возрастающие показатели по плодотворным осеменениям на фоне повышения концентрации спермиев в дозе и как результат;

2) оплодотворяющая способность ультрасексированного семени SexedULTRA 4M приближена к показателю осеменений традиционной спермой.

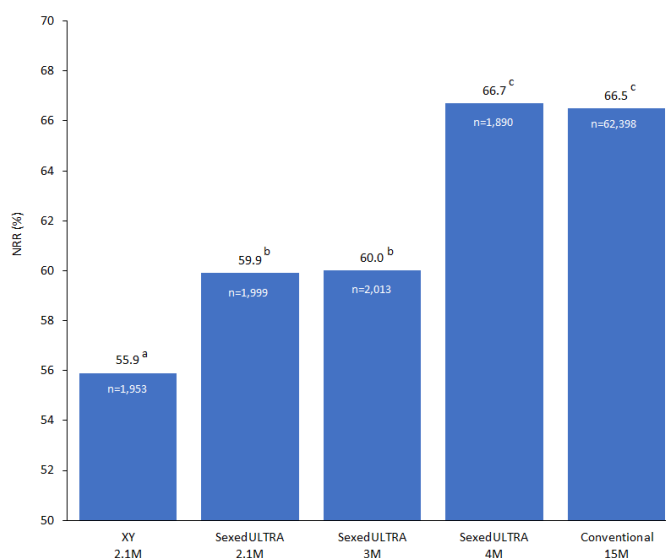


Рис. 10. Процент по показателю 56 дней невозврата в охоту при применении SexedULTRA 4M. Данные получены компанией German Genetics International (анализ данных по 5 быкам). \*Колонки с разными буквами вверх различаются  $P < 0.001$ . (Lenz et al., 2016)

Воодушевленные ранними результатами, полученными в ходе исследований в Германии, ST Genetics принимает SexedULTRA 4M в качестве нового стандарта сексированной спермы в 2015 году. Компания получила и обработала данные от партнёров по Голштинской и Джерсейской породе с 2012 по 2016 годов и установила, что ведение нового продукта SexedULTRA 4M на рынок спермопродукции обеспечило дополнительное увеличение уровня плодотворных осеменений, особенно на тёлках Голштинской породы. При использовании спермы SexedULTRA 4MTM может получить 90-95% от оплодотворяемости традиционной спермы (Рис. 11). Компания ST Genetics официально выпустили SexedULTRA 4MTM в 2017 году. Другие производители

спермопродукции также недавно заявили о выпуске подобных продуктов (см. SELECTed™ SexedULTRA™ 4M от компании Select Sires и GenChoice™ 4M от Genex). Другие центры по искусственному осеменению ведут работу по внедрению ультрасексированной спермы, которая, несомненно, в ближайшем будущем станет новым мировым стандартом сексированной спермы в отрасли.

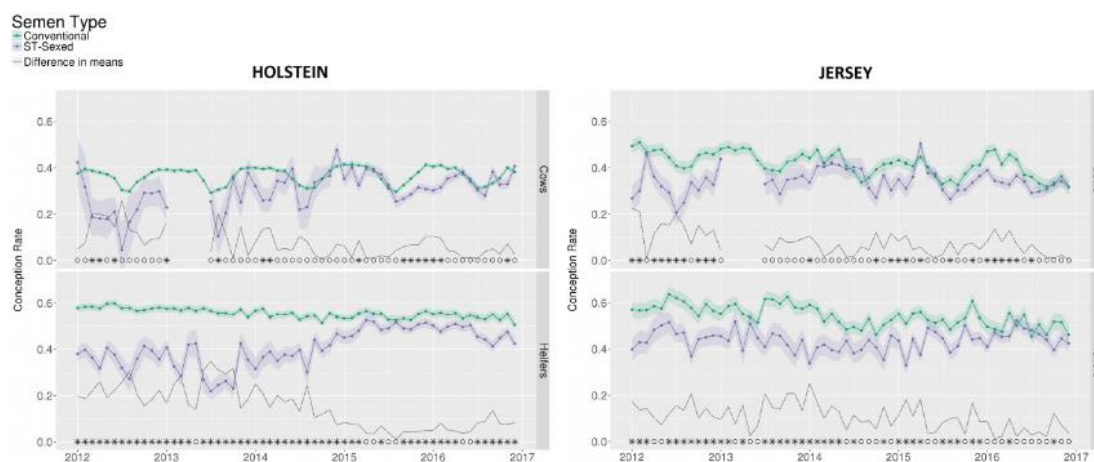


Рис. 11. Процент плодотворных осеменений, полученный при использовании сексированной спермы ST Genetics и традиционной спермы в партнерских стадах.

Только осеменения с 2012 по 2016 год, с подтвержденными результатами стельности на животных от 0 до 2 лактаций при кратности осеменений от 1 до 3. Данные по Голштинской породе включают 122,876 осеменений, по Джерсейской породе — 222,262 осеменения. Анализ, выполненный с использованием линейной модели с взаимодействием тип-год-месяц, порядковым номером осеменения и возрастной группой быка в качестве фиксированных эффектов. \*Традиционная и сексированная сперма различаются; °Традиционная и сексированная сперма не различаются (Heuer, 2017).

## Рекомендации

DeJarnette JM, Leach MA, Nebel RL, Marshall CE, McCleary CR, Moreno JF. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility of sex- sorted and conventional semen plausible? J Dairy Sci 2011;94:3477-83.

DeJarnette JM, McCleary CR, Leach MA, Moreno JF, Nebel RL, Marshall CE. Effects of 2.1 and 3.5x10(6) sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. J Dairy Sci 2010;93:4079-85.

DeJarnette JM, Nebel RL, Marshall CE, Moreno JF, McCleary CR, Lenz RW. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. J Dairy Sci 2008;91:1778-85.

FAO. 2017. The future of food and agriculture – Trends and challenges. Rome.

Garner DL, Seidel Jr GE. History of commercializing sexed semen for cattle. Theriogenology 2008;69:886–95.

Gilligan T. New advances in high-productivity and high-efficiency sperm sorting. In: Proceedings of the 25<sup>th</sup> Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction 2014, pp 57- 61.

Gonzalez-Marin C, Lenz RW, Gilligan TB, Evans KM, Gongora CE, Moreno JF, Vishwanath R. SexedULTRA™, a new method of processing sex sorted bovine sperm improves post-thaw sperm quality and in vitro fertility. Reprod Fertil Dev 2016;29:204.

Heuer C, Kendall D, Sun C, Deeb J, Moreno J, Vishwanath R. Evaluation of conception rates of sex-sorted semen in commercial dairy farms over the last five years. J Dairy Sci 2017; 100(Suppl. 2):198.

Hutchison JL, Bickhart DM. Sexed-semen usage for Holstein AI in the United States. J Dairy Sci 2016;99(Suppl. 1):176.

Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod* 1989;41:199–203.

Johnson LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci* 2000;60–61:93–107.

Lenz RW, Gonzalez-Marin C, Gilligan TB, DeJarnette JM, Utt MD, Helser LA, Hasenpusch E, Evans KM, Moreno JF, Vishwanath R. SexedULTRATM, a new method of processing sex-sorted bovine sperm improves conception rates. *Reprod Fertil Dev* 2016;29:203-204.

National Research Council. 2015. *Critical Role of Animal Science Research in Food Security and Sustainability*. Washington, DC: The National Academies Press.

Schenk JL, Suh TK, Cran DG, Seidel Jr GE. Cryopreservation of flow-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 1999;52:1375–91.

Evans KM. Interpretation of sex-sorting process and new developments. In: *Proceedings of the 25<sup>th</sup> Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction* 2010, pp 93-98.

Johnson LA, Welch GR. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 1999;52:1323-41.

Seidel GE Jr. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology*. 2003;59:585-98.

Seidel GE Jr, Garner DL. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 2002;124:733-43. 15

Seidel Jr GE, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD, et al. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 1999;52:1407–20.

Vishwanath R. SexedULTRA – raising the fertility bar of sexed sorted semen. In: *Proceedings of the 25<sup>th</sup> Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction* 2014, pp 57-61.

Sharpe JC, Evans KM. Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology* 2009;71:4- 10.

Wu G, Fanzo J, Miller DD, Pingali P, Post M, Steiner JL, Thalacker-Mercer AE. Production and supply of high-quality food protein for human consumption: sustainability, challenges, and innovations. *Ann N Y Acad Sci* 2014 1321:1-19.