

TAVŞANLARDA SWİM-UP YÖNTEMİNİN YAVRU CİNSİYET ORANLARI ÜZERİNE ETKİSİ*
The Effect of Swim-Up Technique on Sex Ratio of Newborns in Rabbits

**Ömer Orkun DEMİRAL¹, Tayfur BEKYÜREK², Mustafa ÜN³,
Murat ABAY⁴, Nesibe Özlem ATABAY⁵**

Özet : Bu çalışmada tavşanlarda swim-up yönteminde farklı inkübasyon sürelerinin yavru cinsiyet oranları üzerine etkisi araştırıldı. Araştırmada hayvan materyali olarak; 108 adet dişi, 8 adet erkek Yeni Zelanda Beyazı tavşan kullanıldı.

Sperma erkek tavşanlardan suni vagen yöntemi ile alındı. Spermalara yıkandıktan sonra, 15 (grup 1), 30 (grup 2) ve 45 (grup 3) dakika (dak) süre ile swim-up yöntemi uygulandı. Dişi tavşanlar Swim-up gruplarında inkübasyon (37.5 °C'de, % 5 CO₂'li havada) sonunda spermanın üst ½'lik kısmı ile, kontrol gruplarında ise spermanın tamamı ile intrauterin yolla tohumlandı (grup 1K, 2K, 3K). Tohumlama anında dişi tavşanlara intramusküler (IM) yolla 0,0042 mg Buserelin asetat (Receptal® Intervet, Germany) enjekte edildi. Yavru cinsiyetleri doğum sonrasında kaydedildi.

Gebelik oranları 1, 2 ve 3. gruplarda sırasıyla % 33,33, % 22,22 ve % 50 (p: 0,214); kontrol gruplarında (grup 1K, 2K, 3K) ise % 50, % 44,44 ve % 44,44 olarak tespit edildi (p: 0,928). Yavru cinsiyetleri % erkek oranı olarak değerlendirildiğinde; 1., 2. ve 3. gruplarda sırasıyla % 65,7, % 30 ve % 51,7 (p: 0,038); kontrol gruplarında ise %50,9, %46,7 ve % 37,50 olarak belirlendi (p: 0,480). Sonuç olarak tavşanlarda swim-up yöntemi uygulanan spermalarda, kısa süreli inkübasyon ve spermanın üst bölümünün kullanılması ile yavru cinsiyet oranlarının değiştirilebileceği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Tavşan, swim-up, cinsiyet oranı

¹ Yrd.Dç.Dr.Erc.Ün.Vet.Fak.Dölerme-Suni Toh. AD, Kayseri

² Prof.Dr.Erc.Ün.Vet.Fak.Doğum ve Jinekoloji. AD, Kayseri

³ Yrd.Dç.Dr.Erc.Ün.Vet.Fak.Doğum ve Jin. AD, Kayseri

⁴ Öğr. Gör.Erc.Ün.Vet.Fak.Doğum ve Jin. AD, Kayseri

⁵ Doktora Öğr.Erc.Ün.Sağ.Bil.Ens.Vet.Doğ-Jin. AD, Kayseri

Geliş Tarihi : 12.11.2007 Kabul Tarihi : 17.12.2007

Summary : The present study investigates the effect of different incubation periods on gender ratios of offspring in rabbits in the swim-up technique. 108 female and 8 male New Zealand White rabbits were used in the study as an animal subject. Ejaculates were collected from the male rabbits by using an artificial vagen. The washed sperms were applied using the swim-up technique for periods of 15 (group1), 30 (group2), and 45 (group3) minutes. Female rabbits were inseminated by the upper ½ part of the semen in the swim-up groups (groups 1, 2 and 3), while the control groups were inseminated using the whole semen (groups 1K, 2K and 3K) at the end of incubation (at 37.5°C, under 5 % CO₂ in air) . Doses were injected intramuscularly with 0.0042 mg Buserelin asetat (Receptal® Intervet, Germany) at the time of insemination. The sex ratios of offsprings were recorded after parturitions. The pregnancy rates were detected as 33.33%, 22.22 % and 50.00% (p=0.214) in groups 1, 2, and 3 respectively. As for the control groups, the pregnancy rates were 50.00%, 44.44% and 44.44% (p=0.928) for groups 1K, 2K and 3K, respectively. The male sex ratios of the newborns were 65.70%, 30.00% and 51.70% (p=0.038) in groups 1, 2 and 3 respectively. In the control groups (1K, 2K and 3) the male sex ratios were 50.90%, 46.70% and 37.50% (p=0.480), respectively. It was concluded that the sex ratio of offsprings in rabbits could be manipulated in the swim-up technique by using the upper part of the semen and applying a shorter incubation period.

Key words: Rabbit, swim-up, sex ratio

Yavru cinsiyet oranı; erkek yavruların dişi yavrulara oranı, erkek yavru sayısının her 100 dişi yavruya oranı veya erkeklerin yüzdesi olarak veya birincil, ikincil ve üçüncül cinsiyet oranı olarak tanımlanmaktadır. Birincil cinsiyet oranı, fertilizasyon anında meydana gelen cinsiyet oranı; ikincil cinsiyet

* Bu çalışma IV.Reproduksiyon ve Suni Tohumlama Kongresinde bildiri olarak sunulmuş olup, Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu Birimi tarafından VA-03-07 nolu proje ile desteklenmiştir.

oranı, doğum anında erkeklerin dişilere oranı olarak ve üçüncül cinsiyet oranı ise doğum sonrası yavruların belli yaşa geldikleri (puberta) andaki cinsiyet oranlarıdır (1). Memelilerde ikincil cinsiyet oranlarının (İCO) üzerine etkin olan mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu durumun; spermada bulunan X ve Y kromozomlarını taşıyan spermatozoa oranı, motilite ve erkek ile dişi embriyolarının implantasyon ve gelişim farkları gibi genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile açıklanabileceği bildirilmektedir (1-3). Memeli hayvanlarda İCO üzerine etkin olduğu düşünülen; anne yaşı, stres, mevsim, anne hormon düzeyleri, tohumlama zamanı ve servis şekli gibi faktörler üzerine birçok çalışma yapılmıştır (3-5).

Memelilerde cinsiyet oranlarının değiştirilmesinde kullanılan tekniklerin temel prensibi, X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoonlar arasındaki farklılıklardır (6). Spermanın cinsiyete göre separasyonu amaçlı kullanılan reproduktif biyoteknolojiler; elektroforez, immünolojik seleksiyon, flow sitometri (Fluorescence Activated Cell Sorting) (FS) ve self migrasyon (swim-up, swim-down) yöntemleri olarak sıralanabilir. Self migrasyon yöntemlerinde, farklı cinsiyet kromozomlarına sahip spermatozoonun yüzme kabiliyetleri ve penetrasyon hızlarından yararlanarak separasyon işlemi gerçekleştirilir (5-7).

Sperma separasyonu ile yapılan cinsiyet ön seleksiyonunda FS yöntemi günümüzde en etkin yöntem olarak tanımlanmaktadır (8). Flow sitometri yönteminin cinsiyet separasyonunda etkinliği ispat edilmesine rağmen, uygulamada işlem süresinin uzun olması, pahalı bir donanım gerektirmesi, üretim maliyetlerinin yüksek olması ve elde edilen dölveriminin düşük olması gibi nedenlerden sahada uygulanabilirliği tartışmalıdır (8-11). Ayrıca FS ile işlem gören spermanın yaklaşık % 70'lik kısmı hasar görmekte, ancak % 0,2 - % 0,4 oranında bir geri kazanım olmaktadır. Bu nedenle ticari olarak ihtiyaç duyulan (örn: Amerika için) günlük gereksinimin ancak % 0,5'i karşılanabilmektedir (6, 8).

Ejekülat içerisinde bulunan spermatozoonun cinsiyet oranı her bireyde veya aynı bireye ait farklı spermalarda eşit dağılım göstermemektedir. Aynı boğadan aynı anda veya aralıklarla elde edilen

spermalar ile yapılan tohumlamalarda erkek yavru oranı % 16,1 - % 72,3 arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir. Bu nedenle ırk veya bireysel olarak memelilerde cinsiyet ön seleksiyonu söz konusu değildir. Dolayısıyla aynı sperma içerisinde bulunan farklı cinsiyet kromozomlarının seleksiyonu cinsiyet ön seleksiyonu için vazgeçilmez bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (12).

Sperma separasyonunda farklı cinsiyet kromozomuna sahip spermatozoonun yüzme kabiliyetlerinin değişik olmasından yola çıkılarak birçok araştırma yapılmıştır. İnsanlarda yapılan bir çalışmada, spermatozoa hareketlerinin incelenmesi sonunda spermatozoonların yerçekimine belli sürelerde karşı koyabildiği ve değişik yönlerde yüzme eğiliminde olduğu ortaya konmuştur. Daha hafif olan erkek kromozomunun taşıyan spermatozoonların daha hızlı hareket edebileceği ve yerçekimi gücüne karşı koyma durumunun farklı olması fikri ile yapılan cinsiyet ön seleksiyonu çalışmaları da bulunmaktadır (13).

Bu araştırma ile memelilerde sperma separasyon yöntemlerinden swim-up yönteminin cinsiyet oranları üzerine etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 108 adet dişi, 8 adet erkek, Yeni Zellanda Beyazı tavşan kullanıldı. Çalışma boyunca tavşanlar konsantre yem ve kuru yonca ile beslendi. Çalışmada dişi tavşanlar, spermaya uygulanan swim-up işlem sürelerine göre (15, 30, 45 dak) 3 ayrı gruba ayrıldı (n=18), (grup 1, grup 2, grup 3). Her bir grup için de aynı şekilde 3 kontrol grubu oluşturuldu (n=18), (grup 1K, grup 2K, grup 3K).

Spermalar suni vagen yöntemi ile alındı ve miks ejakülat haline getirildi. Miks ejakülatlar tris (313, 79 mM), sitrik asit (103, 07 mM), fruktoz (33, 3 mM) içeren sulandırıcı ile sulandırıldı (14). Sulandırılmış spermalar swim-up işlemi yapılmak üzere laboratuara getirildi ve 2200 rpm (ratio per minute) devirde, yedi dak süre ile santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı. Yıkamış spermalar iki saat süre ile 37 C°'de, % 5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiş SP-

TALP ile 1/1 oranında sulandırıldı. Yıkama sonrası sulandırılan sperma (1 ml) 1 ml SP-TALP altına yerleştirildi. Tüm tüpler swim-up için 15 (grup 1), 30 (grup 2), 45 (grup 3) dakika süre ile inkübasyona bırakıldı. Kontrol gruplarında ise spermalar hiçbir işlem görmeden çalışma gruplarındaki sürelerde inkübasyonda bekletildi.

İnkübasyon sonunda, swim-up işlemi uygulanmış spermaların, gruplara göre etülden çıkarıldıktan sonra tüpün altında kalan 1 ml'lik kısımları atıldı. Üstte kalan kısım, 0,5 ml'lik miktar dozlarında tavşanların intrauterin tohumlanmasında kullanıldı. Tohumlama sonrası tavşanlara, IM yolla 0,0042 mg Buserelin asetat, (Receptal® Intervet, Germany) uygulandı. Tohumlamadan 15 gün sonra hayvanların gebelik muayeneleri abdominal palpasyon yöntemiyle yapıldı. Gebe hayvanlar ayrı kafeslere yerleştirildi. Doğum yapan hayvanların doğumdan 24 saat

sonra yavru sayıları ve cinsiyetleri belirlendi.

Çalışmada gebelik oranları ve yavru cinsiyet oranlarının karşılaştırılmasında, windows altında çalışan SPSS 11,0 hazır programı ile Pearson Ki Kare Testi kullanıldı. Farklılık bulunan gruplarda farkın hangi gruptan kaynaklandığının tespitinde yine Ki kare testi yapıldı.

BULGULAR

Çalışmada, denek gruplarında ortalama % 35,18 gebelik oranı ve toplam 115 (60 erkek, 55 dişi) adet yavru elde edildi. Kontrol gruplarında ise ortalama % 46,29 gebelik oranı, toplam 132 (61 erkek, 71 dişi) adet yavru elde edildi. Çalışma ve kontrol gruplarında doğum başına elde edilen yavru sayısı sırasıyla ortalama 5, 52 ve 4, 88 olarak belirlendi. Araştırma sonunda elde edilen veriler Tablo I, II, III ve IV' de özetlendi.

Tablo I. Çalışma gruplarında elde edilen gebelik oranları

Gruplar (n:18)	Gebe kalan hayvan sayısı	Gebe kalmayan hayvan sayısı	Gebelik oranı (%)	χ^2	p
Grup 1 (15dak. inkübasyon)	6	12	33,3		
Grup 2 (30 dak. inkübasyon)	4	14	22,2	3,086	0,214
Grup 3 (45 dak. inkübasyon)	9	9	50		

Tablo II. Kontrol gruplarında elde edilen gebelik oranları

Gruplar (n:18)	Gebe kalan hayvan sayısı	Gebe kalmayan hayvan sayısı	Gebelik oranı (%)	χ^2	p
Grup 1K (15dak. inkübasyon)	9	9	50		
Grup 2K (30 dak. inkübasyon)	8	10	44,4	0,149	0,928
Grup 3K (45 dak. inkübasyon)	8	10	44,4		

Tablo III. Çalışma grubu hayvanlarda doğan yavruların cinsiyet oranları

Gruplar (n:18)	Erkek yavru sayısı	Dişi yavru sayısı	Erkek oranı (%)	χ^2	p
Grup 1 (15dak. inkübasyon)	23	12	65,7 ^a		
Grup 2 (30 dak. inkübasyon)	6	14	30 ^b	6,519	0,038
Grup 3 (45 dak. inkübasyon)	31	29	51,7 ^{ab}		

^{a,b}Aynı sütunda farklı harfler istatistiksel olarak anlamlıdır.

Tablo IV. Kontrol grubu hayvanlarda doğan yavruların cinsiyet oranları

Gruplar (n:18)	Erkek yavru sayısı	Dişi yavru sayısı	Erkek oranı (%)	χ^2	p
Grup 1K (15dak. inkübasyon)	28	27	50,9 ^a		
Grup 2K (30 dak. inkübasyon)	21	24	46,7 ^a	1,469	0,480
Grup 3K (45 dak. inkübasyon)	12	20	37,5 ^a		

TARTIŞMA

Cinsiyet ön seleksiyonu insan hekimliğinde en çok cinsiyetle ilişkili olarak aktarılan genetik hastalıkların engellenmesi amacıyla yapılırken, veteriner hekimliği alanında tamamen ekonomik nedenlerle ön plana çıkmıştır.

Sperma separasyonu ile yapılan cinsiyet ön seleksiyonunda FS yöntemi günümüzde en etkin yöntem olarak tanımlanmaktadır (8). Yöntemin etkinliği ispat edilmesine rağmen uygulamada; işlem süresinin uzun olması, pahalı bir donanım gerektirmesi, üretim maliyetlerinin yüksek olması ve döl veriminin düşük olması nedeniyle sahada uygulanabilirliği kısıtlıdır (8–11). Bu nedenlerden dolayı sahada kolay uygulanabilen, etkin, ucuz ve döl verimini etkilemeyecek yöntem arayışı sürmektedir.

Çalışma ve kontrol gruplarında elde edilen gebelik oranları açısından kendi içlerinde ve aralarında istatistiki değerlendirmede anlamlı fark belirlenmemiştir ($p > 0,05$).

Çalışma gruplarında, (grup 1, 2 ve 3) gebelik oranları sırasıyla % 33, 3, %22,2 ve % 50, 0 olarak bulundu ($p > 0, 05$). Aynı gruplar için oluşturulan kontrol gruplarında ise (grup 1K, 2K ve 3K'da) gebelik oranları sırasıyla % 50, 0, % 44,4 ve % 44, 4 olarak belirlendi ($p > 0, 05$). Grup 1'de spermanın üst kısmı ile yapılan tohumlamalar sonunda elde edilen gebelik oranlarının grup 2'den yüksek, grup 3'ten düşük olmasının sperma inkübasyon süreleri, tohumlama dozu ve gruplardaki hayvanların östrus dönemi farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünüldü. Kontrol gruplarında elde edilen gebelik oranlarının yüksek olması yapılan tohumlamalarda tohumlama dozunun hacme dayalı olması nedeniyle, kontrol gruplarındaki dozun separe edilen spermaya oranla yüksek olmasına bağlandı.

Çalışmada, erkek yavru oranları; çalışma gruplarında (grup1, 2 ve 3) sırasıyla % 65,7, % 30 ve % 51,7 ($p < 0,05$); kontrol gruplarında ise (grup 1K, 2K ve 3K da) sırasıyla % 50,9, % 46,7, % 37,5 olarak belirlendi ($p > 0, 05$). Cinsiyet oranlarının değişkenliğinin erkek kromozomu taşıyan spermatozoanın hızlı yüzdüğü hipotezine dayandığı düşünüldü.

Castellini ve arkadaşları(15) tavşanlar üzerine yaptıkları bir çalışmada farklı motil spermatozoa içeren dondurulmuş sperma dozları ile çiftleşmeyi kabul etmeye hazır ve hazır olmayan hayvanlarda, doza bağımlı olarak gebelik oranlarının % 47,2 – 53,3 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Bunun yanında, çiftleşmeye hazır olan ve olmayan tavşanlarda ise gebelik oranlarını sırasıyla % 58 ve % 7,8 olarak belirlemişlerdir. Sunulan çalışmada özellikle kontrol gruplarında elde edilen gebelik oranlarının genel ortalama olarak Castellini ve arkadaşlarının (15) sonuçları ile uyumlu olduğu; ancak çalışma grubunda elde edilen oranların Castellini ve arkadaşlarının (15)'nin bildirdikleri oranlardan düşük olduğu görüldü. Yine aynı araştırmacının bildirdiği çiftleşmeye hazır olmayan tavşanlardaki gebelik oranlarının ise bu çalışmada elde edilen kontrol ve çalışma grubu gebelik oranlarından düşük olduğu görüldü. Yapılan çalışmada tavşanların tohumlanması esnasında hayvanların çiftleşmeye duyarlı olup olmadıklarına bakılmaksızın tohumlandıklarından elde edilen gebelik oranlarının kabul edilebilir düzeyde olduğu düşünüldü. Castellini ve arkadaşları (15) aynı çalışmada yavru sayılarını doğum başına ortalama 7,6 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise doğum başına yavru sayısı çalışma gruplarında ortalama 6,05, kontrol gruplarında ise 5,28 olarak belirlendi. Gruplardaki doğum başına ortalama yavru sayıları arasındaki farkın; ırk, bakım ve beslenme farklarından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Çalışma gruplarında; swim-up işlemi uygulanmış üst sperma fraksiyonu ile yapılan tohumlamalarda elde edilen cinsiyet oranlarının kendi aralarında karşılaştırılması sonunda önemli istatistiksel fark ($p<0,05$) oluşurken, aynı gruplar kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan bir fark belirlenmemiştir.

Gruplar arasında erkek yavru oranı en yüksek grup 1 de elde edilirken, en düşük grup 2 de elde edildi ve bu değerlerin normal olan % 50 erkek oranından sayısal olarak farklı olduğu bulundu. Üçüncü grupta ve kontrol gruplarında ise elde edilen erkek yavru oranının fizyolojik sınırlar içerisinde olduğu gözlemlendi.

Sunulan araştırmada, çalışma ve kontrol gruplarında doğan yavrulardaki erkek oranlarının farklı olmasının; sperma yüzmeye kabiliyetindeki farklılığın, süre ve yerçekimi etkisine bağlı olarak cinsiyet oranlarında değişkenlik yapmış olmasından kaynaklandığı düşünüldü. Bunu destekler nitelikte, Makler ve arkadaşları (13) yaptıkları çalışmada insan sperması ile swim-up ve swim-down yöntemlerini karşılaştırdıklarında, yerçekimi ve süre etkeninin sperma separasyon yöntemleri arasında kalite açısından büyük fark oluşturduğunu bildirmiştir.

Johnson ve arkadaşları (16); tavşanlarda FS yöntemi ile separe edilmiş sperma ile yaptıkları bir çalışmada spermayı taşıdıkları cinsiyet kromozomlarına göre % 86 X ve % 81 Y şeklinde saflaştırabildiklerini ve bu spermalarla yapılan intrauterin tohumlamalar sonunda % 94 oranında dişi, % 81 oranında erkek yavru elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada gebelik oranları ise % 21,41 – 31,25 olarak belirlenmiştir. Sunulan çalışmada elde edilen cinsiyet oranları Johnson ve arkadaşlarının (16) çalışmasından daha düşüktür. Bunun nedeninin kullanılan yöntem farklarından kaynaklandığı kesindir. Sunulan çalışmada elde edilen gebelik oranları ve doğum başına düşen ortalama yavru sayıları daha yüksektir. Gebelik oranlarının ve yavru sayısının yüksek olmasının sperma dozu ve kalitesinden kaynaklanabileceği düşünüldü.

Khatamee ve arkadaşları (17) insanlarda, ovulasyon senkronizasyonu ve swim-up yöntemiyle spermanın üst ve alt fraksiyonlarının kullanılması sonunda yavru cinsiyet oranlarının anlamlı düzeyde değiştirilebileceğini bildirmişlerdir (% 89,2 kız, % 86,7 erkek). Tür farklılığı olmasına rağmen elde edilen cinsiyet oranlarının sunulan çalışmada bildirilenden daha yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmalar arasındaki farkın, tür ve spermaya yapılan uygulama farklılıkları ile ovulasyon senkronizasyonundan kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.

De Jonge ve arkadaşları (18) insan spermasında 15, 30, 45 ve 60 dak'lık inkübasyonlarla uyguladıkları swim-up işlemi sonunda üst ve alt fraksiyonlardaki X ve Y kromozom oranlarını floresans in situ hibridizasyon yöntemi ile belirlemişlerdir. Çalışmaları sonunda 15 ve 60. dak'larda X / Y kromozom

oranlarının istatistiki olarak değişiklik göstermediğini ancak 30 ve 45 dak'lık inkübasyonlar sonunda bu oranların değiştiğini, ancak bu durumun biyolojik ve klinik olarak anlam ifade etmediğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada elde edilen sonuçlara göre sayısal olarak erkek yavru oranlarındaki farklılığın De Jonge ve arkadaşlarının (18) çalışmalarında elde ettikleri sonuç ile uyumlu olduğu düşünüldü.

Rose ve Wong (19) yine insanlarda cinsiyet seleksiyonu amaçlı yaptıkları bir araştırmada albumin kolon yöntemi ile separasyon işlemi yapmışlar; cinsiyet oranlarında farklılık belirlerken De Jonge ve arkadaşları (18) gibi separasyon sonunda spermalarda Florasan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile baktıkları X/Y kromozom oranlarında bir değişikliğe rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bununla birlikte spermadaki kromozom oranlarında bir değişim olmadan cinsiyet oranlarında değişim olmasını X kromozomu taşıyan spermatozoanın inaktivasyonuna bağlamışlardır. Bunu destekler nitelikte Silverman ve arkadaşları (20) ise araştırmalarında aynı yöntemin farklı bir teknikle uygulanması ve ovulasyon senkronizasyonu ile birlikte kız çocuk oranında artış olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak tavşanlarda swim-up yöntemi uygulanan spermalarda kısa süreli inkübasyon ve istenilen cinsiyete bağlı olarak spermanın üst veya alt bölümünün kullanılması ile yavru cinsiyet oranlarının değiştirilebileceği düşünüldü.

KAYNAKLAR

1. Pineda MH. *The biology of sex*. In: Pineda MH and Dooley MP (eds), *Mc Donalds Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Fifth ed. Iowa State Press, Iowa 2003, pp 201-238.
2. Ericsson RJ, Ericsson SA. *Sex ratios*. In: Knobil E and Neill JD (eds), *Encyclopedia of Reproduction*. Volume 4. Academic Press, California 1998, pp 431-437.
3. Gordon IR. *Reproductive Technologies in Farm Animals*. CABI publishing, Cambridge 2005, pp 49-81.
4. Clutton-Brock TH and Iason GR. *Sex ratio variation in mammals*. *The Quarterly Review of Biology* 1986, 61(3): 339-374.
5. Renaville R, Haezebroeck V, Parmentier I, Pirard M, Fontaine S and Portetelle D. *Sex preselection in mammals*. In: Renaville R , Burny A (eds), *Biotechnology in Animal Husbandry*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands 2001, pp 225-233.
6. Botchan A, Hauser R, Gamzu R, Yogev L, Paz G and Yavetz H. *Sperm separation for gender preference: Methods and efficacy*. *J Andrology* 1997, 18 (2):107-108.
7. Kochbar HS, Kochbar KP, Basrur PK and Kinget WA. *Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced embryos*. *Anim Reprod Sci* 2003, 77:33-49.
8. Weigel KA. *Exploring the role of sexed semen in dairy production systems*. *J Dairy Sci (E. Suppl)* 2003, 87:120-130.
9. Johnson LA. *Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art*. *Anim Reprod Sci* 2000, 60-61: 93-107.
10. Seidel GE. *Economics of selecting for sex: the most important genetic trait*. *Therionology* 2003, 59: 585-598.
11. Hollinshead FK, Brien Jk, et al. *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.
12. Chandler JE, Steinholt-Chenevert HC, et al. *Sex ratio variation between ejaculates within sire evaluated by polymerase chain reaction, calving and farrowing records*. *J Dairy Sci* 1998, 81:1855-1867.
13. Makler A, Stoller J, et al. *Investigation in real time of the effect of gravitation on human spermatozoa and their tendency to swim-up and swim-down*. *Int J Androl* 1993, 16: 251-257.

14. Roca J, Martinez S, Vazquez J. M, et al. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris- buffer extenders and stored at 15°C. *Anim Reprod Sci* 2000, 64: 103-112.
15. Castellini C, Pizzi f, Theau-Clement M, et al. Effect of different number of frozen spermatozoa inseminated on the reproductive performance of rabbit does. *Theriogenology* 2006, 66: 2182-2187.
16. Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm seperated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod* 1989, 41: 199-203.
17. Khatamee MA, Horn SR, et al. A controlled study for gender selection using swim-up seperation. *Gynecol Obstet Inves* 1999, 48:7-13.
18. De Jonge CJ, Swann NJ, et al. Failure of multitube sperm swim-up for sex selection. *Fertil Steril* 1997, 67(6): 1109-1114.
19. Rose AG and Wong A. Experiences in Hong Kong with the theory and practice of the albumin column method of sperm seperation for sex selection. *Hum Reprod* 1998, 13(1): 146-149.
20. Silverman AY, Stephens SR, et al. Female sex selection using clomiphene citrate and albumin separation of human sperm. *Hum Reprod* 2002, 17(5): 1254-1256.