

Reproduktionspotential hos hanvarg i Sverige



Amanda Petersen

*Uppsala
2019*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697

Reproduktionspotential hos hanvarg i Sverige

Reproductive potential of male wolves in Sweden

Amanda Petersen

Handledare: Anne-Marie Dalin, institutionen för kliniska vetenskaper

Ev. Biträdande handledare: Eva Axné, institutionen för kliniska vetenskaper; Erik Ågren, SVA; Mikael Åkesson, institutionen för ekologi, Grimsö forskningsstation, Riddarhyttan

Examinator: Jane Morell, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Omslagsillustration: fotografi taget av Amanda Petersen

Nyckelord: varg, hanvarg, testiklar, testikelvikt, testikelstorlek, reproduktion

Key words: wolf, male wolf, testicles, testicular weight, testicular size, reproduction

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Vargpopulationen i Skandinavien består av familjegrupper och revirmarkerande par vars revir ligger inom både Sverige och Norge. Vargpopulationen var mycket låg år 1966 och har sedan dess ökat kraftigt i populationsstorlek. Vargarna i Skandinavien anses ha en hög inavelsgrad till följd av att hela populationen härstammar från några få individer. Inavelskoefficienten hos vargar i Skandinavien har varierat mellan 0,25 år 1990 till 0,3 år 2006 för att sedan minska till 0,228 år 2016 och 2017. Testikelstorlek hos varg har setts variera med säsong, där den största testikelstorleken ses vid parningssäsong. Parningssäsongen i Sverige är under slutet av februari till början på mars. Syftet med denna studie var att undersöka svenska hanvargars reproduktionspotential genom undersökning av testiklar och bitestiklar från varg som insamlats på Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) mellan år 2003 och 2018, och korrelera dessa data till vargarnas inavelskoefficient.

Testiklar och bitestiklar från 221 vargar undersöktes i studien. Alla testiklar hade förvarats frysta på SVA sedan obduktion och organen tinades innan undersökning. Testiklar och bitestiklar fridissekerades och undersöktes med avseende på mått och vikt. Biopsier togs från testiklar och bitestiklar och fixerades i formalin innan de snittades och färgades med Hematoxylin- och eosinfärgning. De undersöktes sedan i mikroskop för att bedöma om spermier kunde ses i testikelvävnaden (*tubuli seminiferi*) och i bitestikelsvansen (*cauda epididymidis*) eller inte. Individer där spermier kunde påvisas bedömdes som fertila och de individer där inga spermier kunde ses bedömdes som infertila. Bakgrundsdata gällande vargarna insamlades från SVA:s journalsystem och SKANDULV:s databas.

212 av de 221 individer som undersöktes inkluderades i studien. Av dessa hade åtta individer en avvikande viktskillnad mellan de båda testiklarna. Fyra av dessa individer samt sex andra individer från studien (utan avvikande viktskillnad mellan testiklarna) var kryptorkida. Av de vargar som ingick i studien bedömdes 145 vara fertila, 51 infertila och hos 16 individer kunde fertilitet med säkerhet inte bedömas. Testikelvikten sågs vara positivt korrelerad med kroppsvikten och testikelvolymen. Säsongsvariation sågs påverka testikelvikt, testikelvolym och gonadosomatiskt index signifikant, där dessa parametrar nådde sitt största värde vid december – mars för att sedan minska under de övriga månaderna på året. Vid ett års ålder var nästan alla vargarna i studien könsmogna och några individer sågs vara könsmogna redan innan de nådde ett års ålder. Under vilda förhållanden parar sig varghanarna dock troligtvis först efter 20 månaders ålder då de lämnat sina föräldrars flock och funnit en vargtik i löp som inte hör ihop med en annan alfahane. Testikelvolymen uppvisade en signifikant skillnad mellan fertila och infertila individer, något som i framtiden skulle kunna användas för att bedöma spermieförekomst i bitestikelsvansen hos vargar in vivo. Inavelskoefficienten uppvisade ingen signifikant korrelation med testikelvikt eller gonadosomatiskt index, men en svag negativ korrelation kunde ses mellan inavelskoefficient och kroppsvikt. Inga slutsatser kunde dras om huruvida en hög inavelskoefficient korrelerar med kryptorkism.

Baserat på materialet som undersökts i denna studie är reproduktionspotentialen hos hanvargar i Sverige god.

SUMMARY

The wolf population of Scandinavia consists of family groups and pair-bonded wolves located both in Sweden and Norway. The wolf population in 1966 was very low, but their numbers have replenished over the last half-century. The wolf population of Scandinavia is today considered to be severely inbred since they all descend from only a few individuals. The inbreeding coefficient of wolves in Scandinavia has varied from 0.25 in 1990 to 0.3 in 2006, however has declined to 0.228 in the years 2016 and 2017. Testicular size in wolves have been observed to change with season, and the largest size is seen around mating season. The mating season in Sweden occurs from late February to the beginning of March. The aim of this study was to evaluate the reproductive potential of male wolves in Sweden by examination of testicles and *epididymides* collected by the Swedish National Veterinary Institute (SVA) between the years 2003 and 2018, and to correlate these findings to the inbreeding coefficient.

Male gonads from 221 wolves were examined in this study. All organs had been kept frozen at SVA since the necropsy and were thawed before examination took place. The *epididymides* were removed from the testicles and both parts were measured and weighed. Biopsies from testicles and *epididymides* were fixed in formalin, cut into thin sections and stained with Hematoxylin and eosin. The sections were then examined using a microscope to determine the presence of spermatozoa in the seminiferous tubules of the *testes* and the *cauda epididymides*. Individuals were considered to be fertile when spermatozoa were present and infertile when no spermatozoa were to be found in the sections. Information regarding the individual wolves were collected from SVA's and SKANDULV's databases.

Two hundred and twelve out of the 221 wolves that were examined were included in the study. Eight of these wolves had a significant difference in weight between the left and right testicles. Four of these wolves, along with six other wolves that did not have a weight difference between the testicles, had notes in their files stating that they were cryptorchid. One hundred and forty-five wolves in the study were estimated to be fertile, 51 to be infertile and for 16 wolves the fertility could not be properly evaluated. Testicular weight was found to have a positive correlation to body weight and testicular volume. The seasonality was found to have a significant impact on testicular weight, testicular volume and gonadosomatic index, where the largest values of these parameters were found in December – March with lesser values being seen during the rest of the year. Almost every wolf had reached sexual maturity at the age of one year, and some wolves younger than one year were found to be fertile as well. In a wild wolf population, it is likely that breeding does not occur before the age of 20 months for most male wolves, as they need to have left the pack of their parents and found a wolf bitch in heat that has not yet pair-bonded with another alpha male. A significant difference in testicular volume between fertile and infertile wolves was shown, which could be used to estimate fertility in wolves in vivo in future studies. The inbreeding coefficient showed no significant correlation with testicular weight or gonadosomatic index, although a small negative correlation was found with the body weight. No conclusions could be drawn regarding whether a high inbreeding coefficient was correlated to cryptorchidism

Based on the findings in this study, the reproductive potential of male wolves in Sweden is considered good.

INNEHÅLL

INLEDNING.....	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
Vargpopulationen i Skandinavien.....	2
Inavelskoefficient och inavelsdepression	3
Åldersbestämning	5
Kroppsvikt	6
Testiklarnas och bitestiklarnas anatomi och reproduktionsfysiologi.....	6
Anatomi och histologi testiklar och bitestiklar.....	6
Testiklarnas nedvandring och kryptorkism	8
Könsmognad och pubertet.....	9
Testiklarnas storlek och säsongsvariation	9
Reproduktionsendokrinologi.....	10
MATERIAL OCH METODER	12
Organgenomgång.....	12
Histologisk undersökning	14
Data, journaler och åldersbestämning.....	14
Statistik	15
RESULTAT	16
Testikelstorlek.....	20
Säsongsvariation	24
Inavel	26
Kryptorkism och individer med avvikande viktskillnad mellan testiklarna	28
DISKUSSION.....	30
Organgenomgång, histologisk bedömning och data från databaser	30
Testikelvikt, gonadosomatiskt index och testikelvolym.....	31
Inavel	33
Kryptorkism och avvikande viktskillnad mellan testiklarna	34
KONKLUSION	35
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING	37
TACK.....	40
REFERENSER	41

INLEDNING

Vargen (*Canis lupus*) är ett rovdjur (*Carnivora*) inom familjen hunddjur (*Canidae*), vars närvaro i Skandinavien är omtyckt av människor men även ogillad då vissa ser vargens närvaro som ett hot mot jakt och näring. (Sand *et al.*, 2014). Den skandinaviska vargstammen, som har revir både i Sverige och Norge, betraktades som utrotad under 1960-talet (Wabakken *et al.*, 2001; Svensson *et al.*, 2017). Vargen fridlystes i både Norge och Sverige och i kombination med invandring av vargar från den finsk-ryska vargstammen har antalet vargar successivt ökat och består år 2018 av fler än 400 vargar (Sand *et al.*, 2014; Svensson *et al.*, 2017; Wabakken *et al.*, 2018).

Vargarna i Skandinavien har visats ha en hög inavelsgrad till följd av att hela populationen härstammar från endast ett fåtal individer. Inavelskoefficienten är ett mått på sannolikheten att två identiska alleler som en individ bär på härrör från en gemensam förfader. Inavelskoefficienten kan ha ett värde mellan noll och ett, där noll innebär att föräldrarna är obesläktade och ett innebär att föräldrarna är genetiskt identiska. Inavelskoefficienten hos skandinavisk varg har ökat från 1990-talet till år 2006 för att minska i de senaste mätningarna som gjorts år 2016 och 2017 (Liberg *et al.*, 2005; Bensch *et al.*, 2006; Åkesson *et al.*, 2016; Åkesson & Svensson, 2018).

Reproduktionsförmågan hos vargtikar i Skandinavien har undersökts i en tidigare studie (Cederlund, 2017) och denna indikerade att reproduktionsförmågan hos tikarna är god. Motsvarande studie av reproduktionsförmågan hos hanvargar i den skandinaviska vargstammen saknas och den aktuella studien är den första genomgången av det material som insamlats på Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) under perioden 2003 – 2018.

Syftet med den aktuella studien är att studera hanvargarnas reproduktionspotential genom att undersöka testiklar och bitestiklar från varg i den skandinaviska vargstammen och att koppla dessa resultat till vargarnas inavelskoefficient.

LITTERATURÖVERSIKT

Vargpopulationen i Skandinavien

Den skandinaviska vargpopulationen är gemensam för Sverige och Norge. En del flockar har revir enbart i Sverige, enbart i Norge eller revir som överlappar landsgränserna (Svensson *et al.*, 2017). I mitten på 1800-talet uppskattades vargpopulationen i Skandinavien till 1000 – 2000 individer, men denna population minskade kraftigt på grund av årliga avskjutningar. Mellan år 1827 och 1839 har det beräknats att det sköts av ca 500 vargar per år i Skandinavien, något som minskade till att ca 100 djur sköts av år 1870. Ca 10 vargar uppskattades finnas i Skandinavien år 1960 (Aronson & Sand, 2004) och vargpopulationen i Sverige och Norge betraktades som i praktiken utrotad år 1966, då den senaste kullen dessförinnan föddes år 1964 (Wabakken *et al.*, 2001).

Idag har vargstammen i Skandinavien återhämtat sig, mycket tack vare fridlysningen av varg i Sverige och Norge år 1966 respektive 1972. Det dröjde dock till 1990-talet innan tillväxten av vargstammen i Sverige och Norge tilltog ordentligt. Vintern år 1990/1991 uppskattades antalet vargar i Skandinavien till 8 - 10 individer, något som ökade kraftigt upp till 100 vargar år 2002, 430 vargar år 2016 och 410 vargar år 2018 (Aronson & Sand, 2004; Liberg *et al.*, 2005; Sand *et al.*, 2014; Svensson *et al.*, 2017; Wabakken *et al.*, 2018). Under 2017 påvisades 41 familjegrupper (grupper bestående av tre eller fler individer) av varg i den skandinaviska vargpopulationen varav 28 av dessa var i Sverige, åtta i Norge och fem levde på gränsen mellan de två länderna (Wabakken *et al.*, 2018). Hos 39 av dessa 41 familjegrupper i Skandinavien skedde föryngring år 2017 (Åkesson & Svensson, 2018).

Vargpopulationen anses ha kommit tillbaka till Sverige och Norge genom invandring av varg från den delade populationen i Finland och Ryssland år 1977 – 1978. År 1978 föddes en vargkull i Skandinavien för första gången sedan 1964 (Wabakken *et al.*, 2001; Aronson & Sand, 2004). I en studie sågs att år 1983 fanns det ett reproducerande vargpar i Skandinavien som fick kullar tre år i rad tills vargtiken blev skjuten, och efter detta fortsatte deras avkommor att föröka sig inom samma område med sina släktingar fram till år 1994 (Liberg *et al.*, 2005). Efter år 1983 föddes valpar varje år i Skandinavien, förutom år 1986 (Sand *et al.*, 2014). Från 1980 – 1998 ökade vargpopulationen i Skandinavien med 19% per år, men om beräkningen görs för de år då vargpopulationen faktiskt ökade (år 1990 – 1998) var tillväxten 29% per år (Wabakken *et al.*, 2001). Tillgång till föda anses vara den viktigaste faktorn som påverkar tillväxten hos vargpopulationer (Wabakken *et al.*, 2001), något som kan förklara att vargar i fångenskap kan para sig och bli dräktiga redan vid 10 månaders ålder (Medjo & Mech, 1976) medan de i det vilda ofta inte blir dräktiga innan 22 månaders ålder (Rausch, 1967; Seal *et al.*, 1979; Sand *et al.*, 2014). Det var dock ingen brist på byte i Skandinavien mellan år 1980 – 1990. Avsaknaden av tillväxt hos vargpopulationen under dessa år tros därför inte bero på detta, då det uppskattades att så många som 100 fler vargar kunde leva i Sverige under denna period utan att det skulle vara brist på föda. Andra förklaringar till att tillväxten av vargstammen inte ökade innan år 1990 har ansetts kunna vara en hög inavelsgrad med inavelsdepression som senare blev lägre då fler vargar immigrerade från den finsk-ryska stammen. Dock har DNA-tester från vargar mellan 1983 och 1990 inte visat att nytt genetiskt material skulle ha införts (Wabakken *et al.*, 2001). Den troligaste anledningen till den försenade tillväxten anses därför bero på

svårigheter att hitta en partner, i kombination med dödsfall inom stammen (naturliga eller jakt), som i en liten population kan vara avgörande för tillväxten (Wabakken *et al.*, 2001).

Vargtikar löper endast en gång per år. Vilken tid på året löpet sker har visats bero på latituden och därmed troligtvis på säsongsmässiga förhållanden i det aktuella området (Mech, 2002; Sand *et al.*, 2014). Här i Skandinavien är parningssäsongen i slutet av februari till början av mars (Sand *et al.*, 2014) men parningssäsongen har setts kunna ändras något och tidigareläggas i samband med att klimatet blir varmare (Schmidt *et al.*, 2008). En vargtik kan producera 40 – 60 valpar under sin livstid och lever i ett livslångt parförhållande med hanen. En valpkull i ett område innebär därför att det måste ha funnits ett vargpar i området samma vinter, senast i slutet av februari, vilket används vid inventering av vargpopulationen. Medelvärdet för antalet valpar i en kull har visats vara 5,6 i en studie gjord i Skandinavien (Sand *et al.*, 2014). En flock består ofta av ett reproducerande vargpar, en alfahane och en alfahona, och deras ungar från de senaste 1 – 3 åren. Ibland kan även en flock bestå av flera sådana familjer (Mech, 1999). Trots att det vanligtvis bara är en vargtik i varje flock som blir dräktig och får avkommor kan även flera honor i flokken få valpar vid god tillgång till föda (Sand *et al.*, 2014). Detta har dock inte setts i Skandinavien (Chapron *et al.*, 2016). Det kan till stor del bero på att vargarna ofta lämnar föräldraflocken redan innan eller strax efter att de blivit könsmogna, vid ca 10 – 15 månaders ålder, och det finns därför oftast bara en könsmogen vargtik i varje flock (Sand *et al.*, 2014; Chapron *et al.*, 2016). Sedan år 1983 har 329 – 335 föryngringar skett i Skandinavien (Sand *et al.*, 2014).

Dödligheten hos vargarna i Skandinavien beror i huvudsak på avsiktligt dödande, genom licensjakt, skyddsjakt eller olaglig jakt, men även trafikolyckor och andra dödsorsaker, såsom drunkning eller fall från hög höjd, förekommer. Den illegala jakten visades stå för ca 50% av dödligheten hos varg under åren 1999 – 2014. Den högsta dödligheten hos varg har visats vara hos vargar som lämnat sin föräldraflock men ännu inte skapat sitt eget revir, då utvandringen utsätter dem för många faror (Sand *et al.*, 2014; Åkesson *et al.*, 2016). Den genomsnittliga årliga dödligheten för dessa utvandringsvargar år har visats vara $53,6 \pm 10,1\%$ år 1999 – 2014 (Sand *et al.*, 2014).

Inavelskoefficient och inavelsdepression

Besläktade individer bär på en ökad mängd identiskt genetiskt material än obesläktade individer (Åkesson & Svensson, 2018). Varje gen hos en individ finns i två upplagor, där en har ärvts från modern och en från fadern. Två upplagor av samma gen som har två identiska alleler kallas homozygota medan gener med två olika alleler kallas heterozygota (Griffiths *et al.*, 2012; Sand *et al.*, 2014). Ett ökat antal homozygota alleler kan ses hos inavlade individer jämfört med icke inavlade (Griffiths *et al.*, 2012; Kardos *et al.*, 2018). Detta ökar därmed risken för att inavlade individer är homozygota för recessiva alleler som kodar för en genetisk sjukdom. Förekomsten av identiska alleler ökar i en inavlad population, vilket både leder till ökad risk att överföra allelen till sin avkomma och minskad genetisk variation (Griffiths *et al.*, 2012). Inavel kan leda till nedsatt reproduktionsförmåga och svagare individer, vilket kallas inavelsdepression. Om båda kopiorna av en gen hos en individ är identiska med genen hos en förälder eller förfäder kallas dessa gener för ”identical by descent” (IBD) (Griffiths *et al.*, 2012; Kardos *et al.*, 2018). Inavelskoefficienten är ett mått på sannolikheten att två identiska alleler hos en individ är IBD,

dvs att de härrör från en gemensam förfader (Griffiths *et al.*, 2012; Kardos *et al.*, 2018; Åkesson & Svensson, 2018). Inavelskoefficienten för en individ kan variera mellan noll och ett, där noll innebär att föräldrarna är helt obesläktade och ett innebär att föräldrarna är genetiskt identiska (Åkesson & Svensson, 2018). En inavelskoefficient på 0,25 hos en avkomma indikerar därmed en parning mellan helsyskon (Liberg *et al.*, 2005; Griffiths *et al.*, 2012) eller en parning mellan en förälder och dennes egen avkomma (Griffiths *et al.*, 2012).

Inavelskoefficienten kan antingen bestämmas utifrån ett släkträd eller genom DNA-analys där individens genetiska variation bedöms (Kardos *et al.*, 2018). För att bestämma inavelskoefficient hos vargar i Skandinavien används det släkträd över vargpopulationen som byggts upp av forskningsprojektet SKANDULV. Släkträdet började konstrueras 1983 och består idag av minst 266 föräldrapar och deras avkommor (Åkesson & Svensson, 2018). Vid bestämning av inavelskoefficienten utgående från ett släkträd görs ett antagande om att grundarna till populationen var obesläktade (Griffiths *et al.*, 2012; Kardos *et al.*, 2018; Åkesson & Svensson, 2018). Även individer som invandrat och senare blivit del av populationen antas vara obesläktade (Griffiths *et al.*, 2012). Om grundarna till populationen och övriga individer som invandrat och bidragit till populationens tillväxt själva var inavlade kan detta ge en falskt låg inavelskoefficient hos individer vars inavelskoefficient bestämts utifrån ett släkträd (Griffiths *et al.*, 2012; Kardos *et al.*, 2018). I den skandinaviska vargpopulationen är grundarna fem vargar som invandrat från den finsk-ryska vargstammen (Kardos *et al.*, 2018; Åkesson & Svensson, 2018). Två av dessa grundare kom till Skandinavien redan tidigt under 1980-talet, en varg invandrade år 1991 och ytterligare två individer invandrade år 2007 (Åkesson *et al.*, 2016).

Inavelsdepression anses vara ett allvarligt problem i små populationer. Vargarna i Skandinavien härstammar från endast ett fåtal individer och studier har visat att populationen lider av en kraftig inavelsdepression (Liberg *et al.*, 2005; Bensch *et al.*, 2006; Räikkönen *et al.*, 2013; Åkesson *et al.*, 2016). Studier på varg i Skandinavien har visat att antalet valpar som föds och överlever till nästa vinter påverkas negativt av en hög inavelskoefficient hos både avkomma och modern (Liberg *et al.*, 2005; Sand *et al.*, 2014). Inavelskoefficienten hos fadern visades dock inte ha någon signifikant korrelation med kullstorleken (Liberg *et al.*, 2005). I en studie på mexikansk varg (*Canis lupus baileyi*) visades dock att hög inavelskoefficient hos varghanen ledde till att kullstorleken blev mindre redan vid födseln. Detta ansågs bero på en sämre spermie kvalitet hos individer med en hög inavelskoefficient, och detta anses också vara en orsak till infertilitet hos vuxna hanvargar (Fredrickson *et al.*, 2007). I en studie gjord på vargar i fångenskap i Skandinavien visades en negativ påverkan på reproduktionen vid en hög inavelskoefficient hos modern och även då föräldrarna var nära besläktade. Graden av inavel hos hanvargen sågs i denna studie inte påverka reproduktionsförmågan (Laikre & Ryman, 1991). Även kroppsvikten har visats påverkas negativt av hög inavelsgrad (Laikre & Ryman, 1991; Fredrickson & Hedrick, 2002). En hög frekvens av missbildningar har även beskrivits i den skandinaviska vargpopulationen, något som anses ha en koppling till den höga inavelsgraden hos vargar i Skandinavien (Sand *et al.*, 2014; Räikkönen *et al.*, 2013).

Mellan år 1994 och 2002 sågs endast två parningar mellan helsyskon i Skandinavien, men trots detta låg inavelskoefficienten baserat på släkträdet mellan 1997 – 2002 på strax under eller

över 0,25 för majoriteten av vargarna (Liberg *et al.*, 2005). År 1990 sågs en genomsnittlig inavelskoefficient på 0,25 hos de skandinaviska vargarna (Åkesson & Svensson, 2018), något som därefter minskade till följd av invandring av ännu en varg från den finsk-ryska vargstammen år 1991 (Bensch *et al.*, 2006). År 2001 – 2002 hade dock inavelskoefficienten ökat till 0,25 igen, och fortsatte öka upp till 0,3 år 2006 (Bensch *et al.*, 2006; Åkesson *et al.*, 2016). Efter att två hanvargar invandrat år 2007 och parat sig med vargtikar i Skandinavien började inavelskoefficienten minska och år 2017 var den genomsnittliga inavelskoefficienten $0,228 \pm 0,079$. År 2016 hade även samma värde setts som sågs 2017 (Åkesson & Svensson, 2018). Inavelskoefficienten bestämdes utifrån släkträdets för alla dessa mätningar (Liberg *et al.*, 2005; Bensch *et al.*, 2006; Åkesson *et al.*, 2016; Åkesson & Svensson, 2018). I en studie visades dock att flera av de vargar som invandrat från den finsk-ryska vargstammen och blivit en del av den skandinaviska vargpopulationen själva var inavlade (Kardos *et al.*, 2018). Detta inkluderar de fem grundarna, som i beräkningar av inavelskoefficienten utifrån släkträdets har antagits ha en inavelskoefficient lika med noll (Kardos *et al.*, 2018; Åkesson & Svensson, 2018). Detta innebär att vargarna i Skandinavien kan ha en högre inavelskoefficient än vad som beräknats utifrån släkträdets (Kardos *et al.*, 2018).

Åldersbestämning

Ålder på varg kan bestämmas utifrån data gällande vilka föräldrar individen hade och vilka år föräldrarna reproducerade sig. Forskningsprojektet SKANDULV gör föräldraskapsbestämning på varg i Skandinavien som används för att konstruera deras släkträd (Liberg *et al.*, 2005; Åkesson *et al.*, 2016). Vid föräldraskapsbestämningen används en kombination av DNA-analys och information gällande revirmarkerande vargpar och familjegrupper som fåtts från beståndsövervakning av vargpopulationen i Skandinavien. DNA för analyser har tagits från djuren antingen post mortem (vid obduktion på SVA), vid infångst av levande djur eller som funnits i naturen i form av blod, päls, urin eller avföring vid beståndsövervakning (Liberg *et al.*, 2005; Åkesson *et al.*, 2016). Föräldraskapsbestämning sker genom uteslutning av möjliga föräldrapar baserat på individens genetiska information med utgångspunkt i Mendelsk nedärvningsprincip, tillsammans med information om revirmarkerande vargpar och familjegrupper i området. I de fall flera föräldrapar inte kan uteslutas tilldelas avkomman inte något föräldraskap. I de fall inga revirmarkerande par matchar avkomman har föräldrapar sökts efter i programvaran CERVUS och då ett föräldrapar visats vara statistiskt mer sannolikt ($p < 0,05$) jämfört med alla andra har dessa föräldrar valts (Åkesson *et al.*, 2016; Åkesson *et al.*, 2018).

Vargen har samma tanduppsättning som tamhund, det vill säga 4 incisiver, 1 canintand och sammanlagt 6 premolarer och molarer för varje käkhalva (Sand *et al.*, 2014). Förutom åldersbestämning via föräldraskap kan även vargens tänder användas för att bedöma dess ålder. Studier har visat att åldersbestämning via tandsnitt har en säkerhet på ± 1 år för individer upp till 9 års ålder, och en säkerhet på 1 – 3 år för individer ≥ 9 års ålder om undersökningen görs av en erfaren person. Åldersbestämning genom undersökning av nedslitning av tänderna är en mindre precis metod men kan användas för att skilja juvenila djur från vuxna och kan även användas på levande infångade djur då tänderna inte behöver avlägsnas för analys (Goodwin & Ballard, 1985; Landon *et al.*, 1998; Gipson *et al.*, 2000).

Kroppsvikt

I en studie i Minnesota samlades vilda vargar (*Canis lupus*) in för vägning av kroppsvikt och mätning av testiklarna, och där visades det att kroppsvikten för hanvargar var signifikant högre än för vargtikarna. Kroppsvikten ökade med ökande ålder till ca 6 års ålder, då vikten istället började minska. Den högsta kroppsvikten sågs hos både hanvargar och vargtikar vid 5 – 6 års ålder och låg där på ett medelvärde på 40,8 kg för hanvargar respektive 31,2 kg för vargtikarna (Mech, 2006). I den skandinaviska vargpopulationen har man funnit att de vuxna varghanarnas kroppsvikt varierade mellan 45 – 55 kg och de vuxna vargtikarnas mellan 35 – 45 kg (Sand *et al.*, 2014). En äldre studie har visat att vuxna hanvargar i Skandinavien hade i medeltal en kroppsvikt på $44,7 \pm 3$ kg (Wabakken *et al.*, 2001).

Testiklarnas och bitestiklarnas anatomi och reproduktionsfysiologi

Anatomi och histologi testiklar och bitestiklar

Vid litteratursökning kunde ingen studie hittas rörande reproduktionsorganens anatomi och histologi hos hanvarg, men då hund anses härstamma direkt från varg och de två fortfarande kan betraktas som samma art (Sand *et al.*, 2014) följer en beskrivning av hundens reproduktionsanatomi och histologi.

Anatomi

De hanliga reproduktionsorganen består av testiklar (*testis*), bitestiklar (*epididymides*), sädesledaren (*ductus deferens*), urinröret (*uretra*), de accessoriska könskörtlarna, och penis (König & Liebich, 2009). Testiklarna ligger i *scrotum* och har en horisontell-snett horisontell längsaxel mot kroppen (Axné, 2010). Testiklarna omges av en stram bindvävshinna (*tunica albuginea*) som består av kollagena fibrer och innehåller stora blodkärl (*arteria testicularis* och *vena testicularis*). *Tunica albuginea* täcks av *tunica vaginalis visceralis* och *tunica vaginalis parietalis*, som är en dubbelväggig fortsättning på bukhinnan (*peritoneum*) ned i *scrotum* (König & Liebich 2009). Mellan *tunica vaginalis visceralis* och *tunica vaginalis parietalis* finns ett hålrum, *cavum vaginale*. Stråk av bindväv (*septula testis*) går ned i testikelvävnaden från *tunica albuginea* och delar upp testikeln i multipla lobuli. Var och en av dessa lobuli består av interstitium och flertalet sädeskanaler (*tubuli seminiferi*) där spermier bildas. *Tubuli seminiferi* mynnar i en lång rak kanal som leder till *rete testis*, igenom vilken spermatozoer transporteras (Axné, 2010). I testikelns mitt möts *septula testis* och bildar ett bindvävsstråk (*mediastinum testis*) som *rete testis* passerar igenom. Från *rete testis* löper flertalet efferenta gånger (*ductuli efferentes*) som transporterar de färdigutvecklade men omogna spermatozoerna vidare till bitestikelhuvudet (König & Liebich 2009). Testiklarnas storlek är relaterade till hundens kroppsstorlek och vikt och ska vara symmetriska med en halvelastisk konsistens. Mjuka testiklar kan tyda på nedsatt spermatogenes medan hårda testiklar kan tyda på fibros eller nybildning. Testiklarnas storlek är direkt relaterade till individens förmåga att producera spermier (Axné, 2010).

Bitestikeln kan delas in i bitestikelhuvud (*caput epididymidis*), bitestikelkropp (*corpus epididymidis*) och bitestikelsvans (*cauda epididymidis*). Bitestikeln består av en enda lång, vindlande gång (*ductus epididymidis*) som sträcker sig från *caput epididymidis* till *cauda epididymidis*. I slutet på *cauda epididymidis* övergår *ductus epididymidis* i *ductus deferens* som

fortsätter genom sädessträngen (*funiculus spermaticus*) och inguinalkanalen och går in i *uretra* i området för prostata. Hos hund är *ductus epididymidis* ca 5 – 8 m lång i sin helhet (König & Liebich, 2009). Transporten för spermerna genom bitestikeln tar 1 – 2 veckor och under denna tid mognar spermatozoerna och utvecklar sin motilitet (Sjaastad *et al.*, 2010). Även vätska från testikeln absorberas, cellfragment fagocyteras och näring för spermatozoerna utsöndras. Spermerna lagras i *cauda epididymidis* tills ejakulation sker (König & Liebich, 2009). Tiden det tar för en spermie att bildas är hos hund 62 dagar (Axné, 2010). Bitestikeln hos hund är dorsalt placerad på testikeln, med *caput epididymidis* i kranial riktning och *cauda epididymidis* i kaudal riktning. Om bitestikelsvansen är mindre än normalt kan detta tyda på upphörd spermieproduktion (Axné, 2010).

Det finns fyra olika accessoriska könskörtlar och deras förekomst varierar mellan olika djurslag: *ampulla ductus deferentis*, *glandula vesicularis*, prostata samt *glandula bulbourethralis* (König & Liebich, 2009). Hos hund finns endast prostata men det finns dock små förtjockningar på *ductus deferens* sista del som motsvarar ampullerna, men dessa saknar signifikant betydelse för hanhundens reproduktionsfysiologi. Prostatan omger *uretra* vid urinblåsans hals (*cervix vesicae*) och är tvådelad hos hund. Prostatas storlek ökar med stigande ålder hos många hundar. Blod-prostatabarriären hindrar många ämnen från att passera från blodet till prostata, både på grund av att kapillärernas endotel inte är fenestrerat, men även eftersom en pH-gradient existerar mellan blod och prostata (Axné, 2010).

Histologi

Tubuli seminiferi i testiklarna består av ett specialiserat epitel som i sin tur består av sertoliceller och spermatogena celler (Bacha & Bacha, 2012). Spermatogonierna ligger dikt an mot basalmembranet och är medelstora, runda celler med en något oval och mörk cellkärna utan en tydligt synlig nukleol. Dessa genomgår mitotisk delning och producerar då primära spermatoocyter. De primära spermatoocyterna är de största spermatogena cellerna och känns igen på sin ljusblåa cytoplasma och sin stora cellkärna med framträdande kromatin vid färgning (Santos *et al.*, 2010). De primära spermatoocyterna genomgår meios och bildar då sekundära spermatoocyter, som är mindre än de primära och ligger närmare lumen. De sekundära spermatoocyterna ses sällan i histologiska preparat eftersom de genomgår ännu en meios snart efter att de bildats, och blir då haploida spermater. Tidiga spermater är runda celler med en blek cellkärna som återfinns i grupper nära lumen i *tubuli seminiferi*. Sena spermater karakteriseras av små, avlånga huvuden och en lång, smal svans (Santos *et al.*, 2010; Bacha & Bacha, 2012). De sena spermater frigörs från epitelet i *tubuli seminiferi* in i lumen och benämns där spermatozoer (Bacha & Bacha, 2012).

Sertolicellerna hos hund är stora (30 – 35 μm i diameter), runda eller något ovala till formen med en blek cytoplasma. Cellkärnan är rund och innehåller en framträdande nukleol (Santos *et al.*, 2010). Sertolicellerna sträcker sig från basalmembranet till lumen av *tubuli seminiferi* (Bacha & Bacha, 2012). Sertolicellerna sitter tätt ihop vilket bildar blod-testis barriären som skyddar de spermatogena cellerna från kroppens immunförsvar (Axné, 2010; Sjaastad *et al.*, 2010). I interstitiet utanför *tubuli seminiferi* finns Leydigceller som producerar testosteron (Bacha & Bacha, 2012). Leydigcellerna är runda celler med en liten, rund cellkärna och en cytoplasma innehållande multipla vakuoler och ibland även basofila strukturer. Trots att

leydigcellerna står för ca 2 – 15% av testikelns volym (Kothari *et al.*, 1972; Woodall & Johnstone, 1988b) har de varit få i histologiska snitt från biopsier på hund (Santos *et al.*, 2010). Där *tubuli seminiferi* övergår i de långa raka kanalerna som leder till *rete testis* finns fler sertoliceller och färre spermatogena celler än i *tubuli seminiferi* (Bacha & Bacha, 2012).

De efferenta gångarna som leder mellan *rete testis* och *ductus epididymidis* in i *caput epididymidis* har ett flerradigt eller enkelskiktat epitel med cilier. *Ductus epididymidis* struktur varierar mellan bitestikelhuvudet till bitestikelsvansen. Dess flerradiga epitel är tjockare i *caput epididymidis* och omges där av glatt muskulatur. I *corpus epididymidis* är epitelet tunnare och det finns mindre glatt muskulatur. I *cauda epididymidis* är epitelet som tunnast och det finns rikligt med glatt muskulatur (Bacha & Bacha, 2012).

I en studie som gjordes på mink har det setts att tiden från död/avlivning till dess att fixering sker av biopsi från testikelvävnad har stor betydelse för den histopatologiska morfologin (Spörndly-Nees *et al.*, 2015). Redan vid 6 timmars intervall mellan individens död och fixering sågs en ökad oordning bland cellerna och en ökad mängd cytoplasma i lumen på *tubuli seminiferi*, och efter 18 h var alla lumen fyllda av cytoplasma. Testikelvävnad som frystes 6 h efter minkens död för att sedan tinas och fixeras saknade den vanliga cellstrukturen i *tubuli seminiferi*. Ingen lumen kunde då ses och cellerna låg i oordning och hade lossnat från epitelet. Alla celler hade kompakt kromatin och pyknotiska cellkärnor, och identifieringen av olika celler kunde inte göras. De enda cellerna som dock kunde identifieras var elongerade (sena) spermatiser. Det kunde också ses att diametern och arean på *tubuli seminiferi*, och även testikelvikten, minskade efter nedfrysning och upptining (Spörndly-Nees *et al.*, 2015).

Testiklarnas nedvandring och kryptorkism

Gubernaculum testis är en sträng i *peritoneum* som sträcker sig mellan testiklarna i buken och ned i *processus vaginalis* i *scrotum*, och drag från denna tillsammans med ökat intraabdominellt tryck får testiklarna att vandra ned i *scrotum*. Testiklarnas nedvandring i *scrotum* är nödvändig för att utvecklingen och produktionen av spermatozoer ska ske normalt, eftersom spermatogenesisen kräver en lägre temperatur än den generella kroppstemperaturen (König & Liebich, 2009; Sjaastad *et al.*, 2010). Hos hund passerar testiklarna vanligtvis inguinalkanalen vid ca 3 – 4 dagars ålder och når sin slutliga position i *scrotum* vid ca 35 – 40 dagars ålder. Inguinalkanalen sluts dock inte förrän vid sex månaders ålder, vilket medför att testiklarna, om nedvandringen är sen, kan passera genom kanalen innan dess (Axné, 2010). Om en eller båda testiklarna inte passerat ned i *scrotum* innan inguinalkanalen sluts benämns individen unilateralt respektive bilateralt kryptorkid, vilket leder till onormal produktion och utveckling av spermatozoer (König & Liebich, 2009; Sjaastad *et al.*, 2010). Kryptorkism har visats ha genetisk koppling hos hund och dessa individer bör därför ej avlas på för risk att föra vidare detta till sin avkomma (Cox *et al.*, 1978; Hayes *et al.*, 1985; Romagnoli, 1991; König & Liebich, 2009; Khan *et al.*, 2018). I studier på hund har det även visats att hundar med bilateral kryptorkism var mer inavlade än de med unilateral kryptorkism (Cox *et al.*, 1978; Hayes *et al.*, 1985; Romagnoli, 1991).

Könsmognad och pubertet

Under puberteten utvecklas könsorgan och andra könskaraktistika. Åldern då en hanhund blir könsmogen, dvs har spermier i ejakulatet, varierar mellan 5 och 12 månader. Detta är inget som syns tydligt, exempelvis som ett löp hos en tik oftast gör, och därför är det svårt att exakt definiera könsmognaden på ett handjur utan att ta upprepade spermaprov (Axné, 2010).

Storleken på *tubuli seminiferi* har setts öka markant hos beagle mellan 22 och 28 veckors ålder, där maximal storlek sågs vid 28 veckors ålder. Fram till 16 veckors ålder kunde endast sertoliceller och spermatogonier ses i *tubuli seminiferi* vid histologisk undersökning. Spermatoocyter och spermatider sågs vid histologisk undersökning vid 20 – 22 veckors ålder. Spermatozoer observerades först vid 26 veckors ålder hos 40% av hundarna och sågs hos alla hundarna vid 28 veckors ålder. Även storleken på *ductus epididymidis* i bitestikelsvansen sågs öka markant mellan vecka 20 och 28 veckors ålder. Vid 32 veckors ålder kunde en större mängd spermier ses i *corpus-* och *cauda epididymidis*. En markant ökning av testiklarnas vikt kunde också ses mellan 24 och 32 veckors ålder och skillnaden i vikt mellan vänster och höger testikel var försumbar från födsel till 48 veckors ålder (Kawakami *et al.*, 1991). Även en ökning av androgener i plasma, framförallt testosteron, kunde ses mellan 22 – 28 veckors ålder och höga nivåer kvarstod fram till studiens slut vid 48 veckors ålder (Tsutsui *et al.*, 1987).

Honvargar i det vilda blir könsmogna senare än hundtikar enligt flertalet studier, där åldern för könsmognad har setts vara 22 månader. Dessa studier har baserats på åldern då vargtiken blir dräktig som ett mått på könsmognad, eller då iakttagelser gjorts av en vargtik som visat tecken på löp eller tecken på parning från spår (Rausch, 1967; Seal *et al.*, 1979; Schmidt *et al.*, 2008; Sand *et al.*, 2014; Geiger *et al.*, 2016). I en studie sågs att en hanvarg parade en könsmogen vargtik när båda var 10 månader gamla, vilket ledde till dräktighet. Dock var dessa båda vargarna uppfödda i fångenskap och hölls tillsammans separerade från andra vargar och med god tillgång till föda, vilket skulle kunna tidigarelägga könsmognad och parningsaktivitet (Medjo & Mech, 1976). I en studie av Geiger *et al.* (2016) nämns att det finns mycket lite data gällande hanvargens könsmognad, jämförelsevis med tikens. Oftast lämnar vargarna föräldrarnas flock vid ca 10 – 15 månaders ålder och finner eller bildar en ny flock innan 20 månaders ålder. Detta medför att de parar för första gången när nästa parningssäsong infinner sig, vilket oftast är vid ca 22 – 24 månaders ålder (Rausch, 1967; Chapron *et al.*, 2016).

Testiklarnas storlek och säsongsvariation

I en studie på 133 olika däggdjursarter togs en regressionsformel fram för att uppskatta testikelvikten utifrån kroppsvikten för dessa däggdjur. I denna studie visades att de 7 arterna som var karnivorer hade en lägre testikelvikt än formeln visade, det vill säga en lägre testikelvikt i förhållande till kroppsvikten än flera av de andra grupperna. Detta ansågs i studien bero på att karnivorer oftare lever i monogama parförhållanden och därför inte kräver lika stor spermieproduktion som många herbivora arter (Kenagy & Trombulak, 1986).

I en studie som gjordes på vilda vargar (*Canis lupus*) i Minnesota undersöktes testiklar från 43 vuxna individer (1 – 9 års ålder) med avseende på längd och bredd. Det sågs då att testiklarnas storlek ökade signifikant med åldern upp till minst 8 års ålder, och storleken (längd plus bredd) varierade mellan 1,9 cm från en ettårig varg upp till 7,8 cm för en treårig individ. Inga separata

mått för längd och bredd finns dock redovisade i denna studie. Storleken på testiklarna anses variera med årstiden hos varg, där den största storleken uppnås i samband med parningssäsongen (Mech, 2006). Denna variation i testikelstorlek har visats bero på ökad och minskad spermieproduktion hos djur med säsongsmässigt styrd parning, som refereras till i en studie av Woodall & Johnstone (1988a).

I studier på hund har det visats att det finns en stark korrelation mellan testikelvikt och kroppsvikt, och även mellan testikelvolym och testikelvikt (Dahl, 2017, Woodall & Johnstone, 1988a; Woodall & Johnstone, 1988b). I en studie på hund av Woodall & Johnstone (1988a) sågs att trots att testikelvikten ökade linjärt med ökad kroppsvikt så skedde en snabbare (allometrisk) utveckling av bitestikels volym och framförallt bitestikelsvansens volym. Detta anses kunna bero på att domesticerade hundar, jämfört med vilda hunddjur, har en högre konkurrens vid parning då de ofta inte lever i monogama parförhållanden och därför kan para flera olika tikar under en kort tidsperiod, och därmed behöver större lagringskapacitet för spermier. Detta anses därför inte kunna ses hos vilda hunddjur som lever i monogama parförhållanden, som exempelvis varg (Woodall & Johnstone, 1988a).

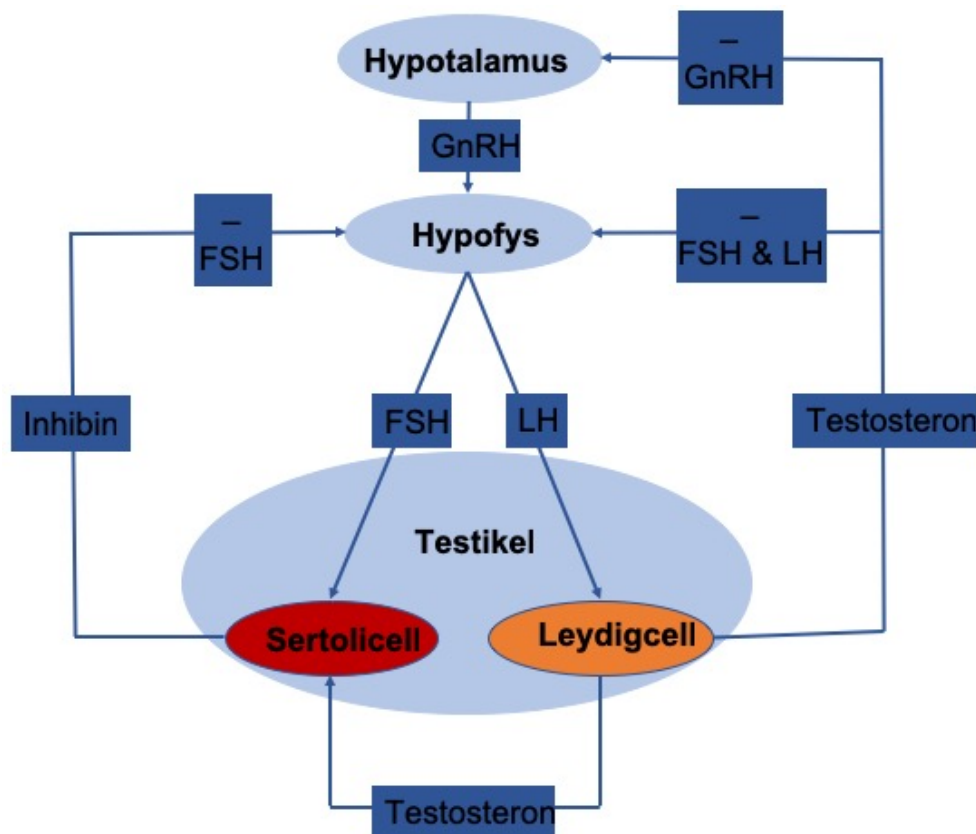
Testikelvikten och testikelvolymen har även setts vara starkt korrelerad till en hunds förmåga att producera och ejakulera spermier (Olar *et al.*, 1983). Detta eftersom *tubuli seminiferi* utgör ca 70 – 92% av testikelns volym, vilket kan korreleras till totalantalet spermier och daglig spermieproduktion (Woodall & Johnstone, 1988a; Gouletsou *et al.*, 2008). Gonadosomatiskt index (summan av båda testiklarnas vikt utan bitestiklar dividerat med kroppsvikten) har på hund setts kunna användas som indikation på om individen producerar spermier eller inte, då hanhundar som inte producerar spermier har ett lågt gonadosomatiskt index medan hundar som producerade spermier hade ett högre värde (Dahl, 2017). Detta samband har också setts i studier på vilda lodjur i Skandinavien (Axnér *et al.*, 2009). Det har dock även visats att vuxna hundar med normalstora testiklar i förhållande till sin kroppsvikt inte alltid har spermier i bitestikelsvansen och stora testiklar är därför ingen garanti för spermieproduktion (Woodall & Johnstone, 1988b). Gonadosomatiskt index hos hund har i en studie setts ligga mellan 0,020% och 0,159%, och mellan 0,073% och 0,159% hos de hundar som hade spermier i bitestikeln (Dahl, 2017).

Reproduktionsendokrinologi

Inga studier där hanvargarnas reproduktionsendokrinologi har undersökts har hittats vid litteratursökning, men då hund anses härstamma direkt från varg och de två fortfarande kan betraktas som samma art (Sand *et al.*, 2014) följer en beskrivning av hanhundens reproduktionsendokrinologi.

Produktionen av spermier styrs av ett samspel mellan hypotalamus, hypofysen och testiklarna. GnRH utsöndras från hypotalamus och stimulerar hypofysens framlob till att frisätta hormonerna FSH och LH (Axnér, 2010; Sjaastad *et al.*, 2010). FSH stimulerar sertoliceller som i sin tur stimulerar spermatogonier vilket leder till produktion av spermier och utsöndring av hormonet inhibin, som inhiberar utsöndring av FSH från hypofysen genom negativ feedback. LH verkar endast på leydigcellerna och stimulerar dessa till att frisätta testosteron, som i sin tur stimulerar spermatogenesen genom att verka på sertolicellerna. Testosteron verkar också på

både hypotalamus och hypofysen via negativ feedback, och vid hög koncentration testosteron i blodet inhiberas utsöndring av GnRH samt FSH och LH (Sjaastad *et al.*, 2010). En schematisk illustration av hormonernas samspel kan ses i figur 1. Hos hund har det setts att hypofysens framlob genomgår en utvecklingsfas vid 20 – 24 veckors ålder, och snart efter detta (vid 26 – 28 veckors ålder) ökade koncentrationen testosteron i plasma markant. Under samma period (24 – 32 veckors ålder) sågs även testiklarna genomgå en utveckling och öka i storlek (Tsutsui *et al.*, 1987).



Figur 1. Visar samspelen mellan hormonerna i hanhundens reproduktionsendokrinologi. Minustecken indikerar inhiberande effekt på utsöndringen av hormonet från organet som pilen visar. Modifierad efter en figur av Axné (2010).

MATERIAL OCH METODER

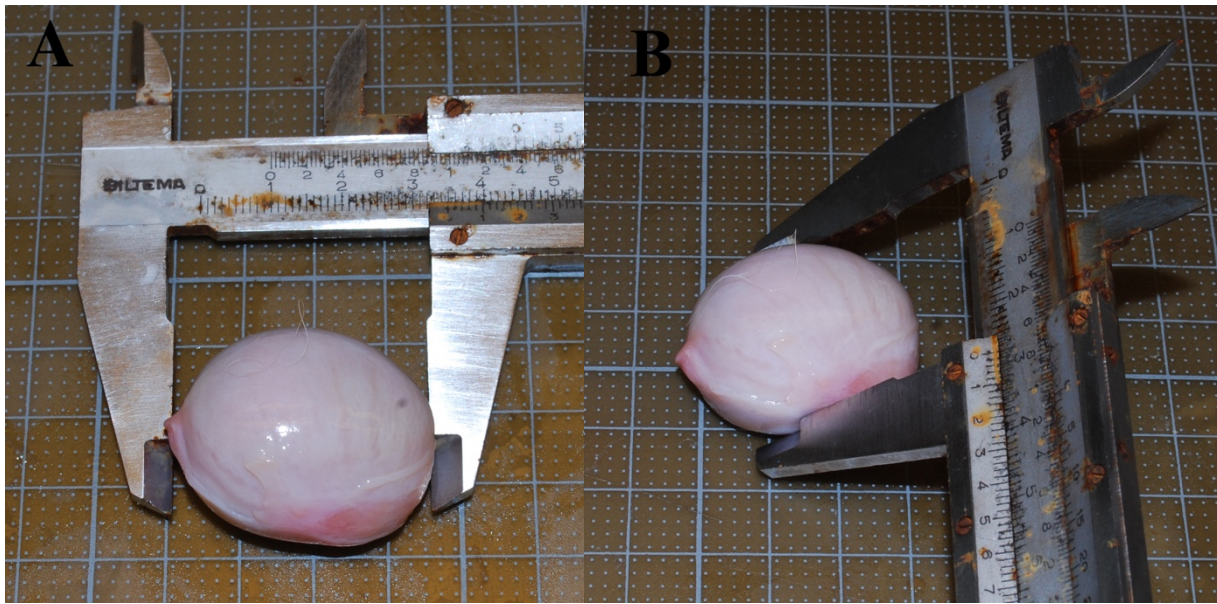
Organgenomgång

Alla vargar som skjuts under licensjakt, skyddsjakt, upphittas döda eller avlider i trafikolyckor inkommer till Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) för obduktion. Testiklar och bitestiklar separeras då från kroppen och fryses in. I denna studie undersöktes testiklar och bitestiklar från 221 hanvargar, insamlade på SVA från år 2003 till 2018. Organen undersöktes med avseende på mått, vikt, konsistens, snittyta och fyllnadsgrad i *cauda epididymidis*. Biopsier togs även från testikelvävnad och *cauda epididymidis* för att undersöka förekomsten av spermier i *tubuli seminiferi* och *cauda epididymidis*. Material som användes för organgenomgången var skalpell, kirurgisk pincett, sax, skjutmått med millimetergradering, linjal med millimetergradering och en våg, vars lägsta mätbara vikt var 0,01 g.

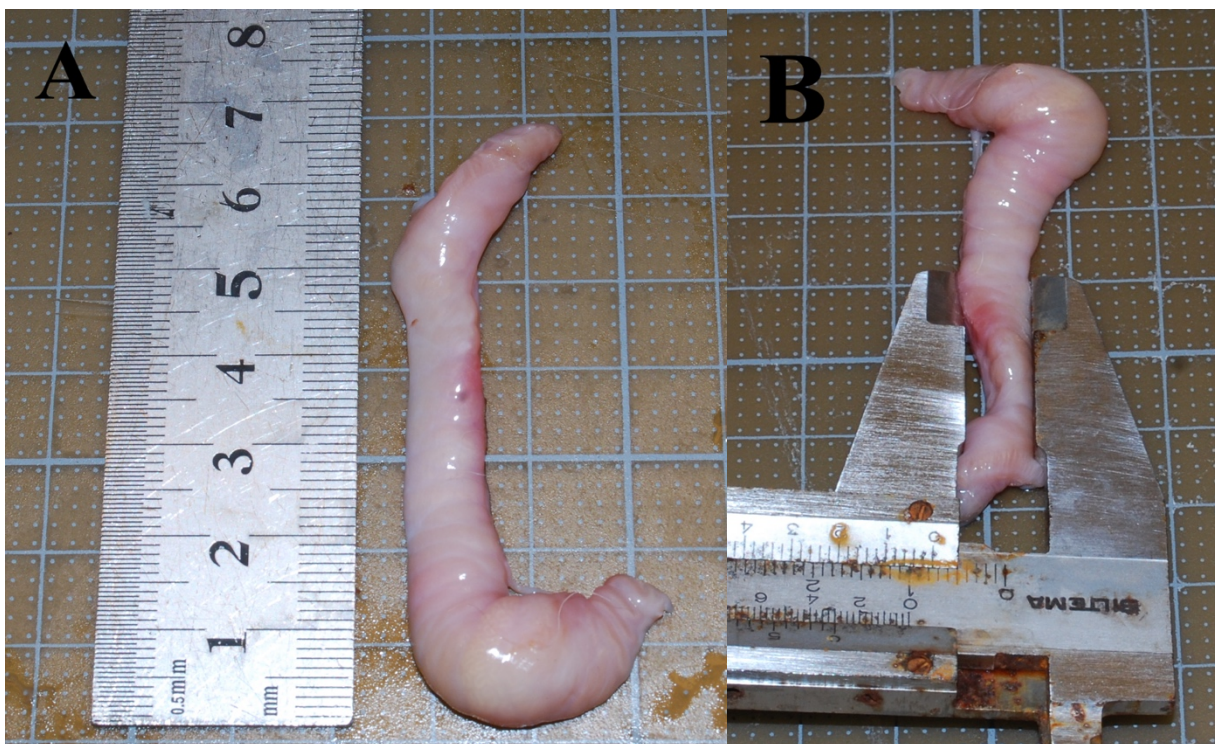
De frysta organen tinades över natten i kylrum för att undersökas dagen därpå. Hud, *tunica dartos*, ytliga och djupa fascior samt *tunica vaginalis parietalis* var i de flesta fall redan borttagen från testiklarna men *tunica vaginalis parietalis* kvarstod på vissa organ, varvid den dissekerades bort med skalpell för att frilägga testikel och bitestikel. *Ductus deferens* identifierades och med hjälp av att den ligger medialt om *epididymis* kunde det avgöras om det var vänster eller höger testikel och bitestikel. Alla organ fotograferades innan undersökning.

Höger testikel och bitestikel separerades med sax och, vid behov, skalpell. *Ductus deferens* klipptes av där den utgick från *cauda epididymidis* och hinnor dissekeras bort. Elasticiteten på testikeln bedömdes subjektivt på en sexgradig skala mellan mjuk (1), mer mjuk än halvelastisk (2), mer halvelastisk än mjuk (3), halvelastisk (4), halvelastisk till hård (5) och hård (6), där halvelastisk beskriver en testikels normala konsistens. Bitestikelsvansen bedömdes subjektivt med avseende på fyllnadsgrad på en skala mellan ej fylld, fylld, välfylld och mycket välfylld, där kriteriet för mycket välfylld innebar att *ductus epididymidis* var tydligt synlig genom vävnaden.

Höger testikel mättes med skjutmått med avseende på längd, bredd och höjd och vägdes sedan. Två eller tre snitt (beroende på testikelns storlek) lades genom testikeln med 90° vinkel mot dess längsaxel för att undersöka förekomst av makroskopiska förändringar i testikelvävnaden och även för att bedöma snittytan med avseende på färg och hur framvällande vävnaden var. Biopsi togs från testikelvävnaden med hjälp av skalpell och lades i formalin för fixering. Höger bitestikel mättes med hjälp av ett skjutmått eller linjal med avseende på längd och även bredd över *corpus epididymidis*. Längden mättes då bitestikeln låg i sin naturliga form. Därefter vägdes bitestikeln och biopsi togs med skalpell från *cauda epididymidis* mest fyllda område som lades att fixeras i formalin. Snitt lades även genom *caput epididymidis* i de fall makroskopiska avvikelser kunde anas. Figur 2 och figur 3 nedan visar hur måtten på testiklarna (längd och bredd) respektive bitestiklarna är tagna.



Figur 2a). Visar hur måttet på längden på testikeln är taget med skjutmått. b) Visar hur måttet på bredden på testikeln är taget med skjutmått.



Figur 3a). Visar hur måttet på längden av bitestikeln är taget med linjal. b) Visar hur måttet av bredden över corpus epididymidis är taget med skjutmått.

Samma procedur utfördes på vänster testikel och bitestikel med skillnaden att ingen biopsi togs från dessa om inte makroskopiska avvikelser eller markant viktskillnad mellan testiklarna kunde ses. En markant viktskillnad definierades som en viktskillnad större än eller lika med en tredjedel av den minsta testikelns vikt. Biopsi togs dock från vänster testikel och bitestikel istället för höger i vissa fall där höger testikel och bitestikel uppvisade kraftigare kadaverösa förändringar än på vänster sida.

Efter undersökningen lades testiklar och bitestiklar ned i plastpåsar med individens ID-nummer på för att igen frysas in och sparas.

Histologisk undersökning

De histologiska snitten, biopsierna, preparerades på SVA. Biopsierna skars ned till 3 millimeters tjocklek, bäddades in i kassetter och snittades. Snitten färgades sedan med Hematoxylin- och eosinfärgning (H&E-färgning).

De histologiska snitten från testikel och bitestikel från samma sida och individ undersöktes systematiskt var för sig i mikroskop med fokus på om spermatozoer kunde ses i lumen i *tubuli seminiferi* i testikeln eller i lumen i *ductus epididymidis* i *cauda epididymidis*. De olika vävnaderna identifierades med hjälp av sitt histologiska utseende (förekomst av *tubuli seminiferi*). Förekomst av spermatozoer i lumen i *tubuli seminiferi* noterades i ett dokument tillsammans med övriga observandum, såsom postmortala förändringar, ihopfallna lumen, små eller stora lumen. Detsamma gjordes med de histologiska snitten från bitestikelsvansen, där det även noterades om *ductus epididymidis* hade innehåll utöver spermier, såsom epitelceller och fibroblaster. Resultaten noterades i ett separat dokument, d v s utan tillgång till tidigare data från organundersökningen eller journaler för att minimera bias. De individer där spermier kunde ses i bitestikelsvansen tolkades som fertila, de individer där inga spermier kunde ses tolkades som infertila eller inte könsmogna, beroende på ålder. De som var svårbedömda och där fertilitet inte kunde säkert bedömas betecknades som individer med okänd fertilitetsstatus, och delades in i en egen grupp i statistiken.

Inga försök till att identifiera andra stadier av spermatogenesisen i *tubuli seminiferi* gjordes då detta kräver mycket färsk vävnad vid fixeringen.

Data, journaler och åldersbestämning

Data gällande vargarna, såsom ID, datum för död, kroppsvikt efter avhudning, ålder, dödsorsak, datum för obduktion och avvikande obduktionsfynd, insamlades från journalsystemen på SVA. Journalsystem som data togs från var SVALA, Rovbase och ACCESS. Åldrarna i dessa journaler hade bestämts genom tandsnittsanalys på Matson's Laboratory, USA. Kroppsvikterna som användes var vikter tagna på kroppen efter avhudning, vid ankomst till SVA.

Data gällande inavelskoefficient och ålder på vargarna i studien insamlades från SKANDULV:s databas. Åldern hade bestämts med hjälp av föräldraskapsbestämning och data gällande föräldradjurens ålder och parningshistorik. Inavelskoefficienten hade beräknats baserat på SKANDULV:s släktträd. Även data gällande vilken population vargarna tillhörde (skandinaviska eller finsk-ryska) samt vilka individer som var hybrider mellan varg och hund insamlades från SKANDULV:s databas.

Vargarna delades in i tre olika åldersgrupper: < 1 år, 1 år och ≥ 2 år. Åldrarna som användes i studien är tagna både från föräldraskapsbestämning från SKANDULV och tandsnittsanalys från Matson's Laboratory. I de allra flesta fallen kompletterade dessa båda databaser varandra med åldrar på olika individer, men i en del fall överlappade de. I de fall åldrarna från de olika metoderna inte har överensstämmt har vargarna fått ett åldersspann tilldelat vars övre och nedre

gräns motsvarade de olika metodernas åldersbestämning. Vargarna med ett åldersspann har sedan om möjligt delats in i åldersgrupper tillsammans med dem med exakt ålder för att användas i vissa delar av statistiken.

Statistik

För all statistik användes programvaran Minitab 18. För korrelation användes Spearmans korrelationskoefficient och den statistiska signifikansnivån var satt till $p < 0,05$. En one-way ANOVA användes för att jämföra testikelvikt, testikelvolym, gonadosomatiskt index, kroppsvikt och inavelskoefficient mellan åldersgrupper, efter att det kontrollerats att residualerna var normalfördelade i Minitab. Jämförelse mellan olika grupper av data gjordes med general linear model (GLM) ANOVA och Tukey's test.

Gonadosomatiskt index beräknades genom att använda följande formel:

$$\text{Gonadosomatiskt index (\%)} = \left(\frac{\text{Sammanlagd testikelvikt (kg)}}{\text{Kroppsvikt (kg)}} \right) \times 100.$$

För att beräkna testikelvolymen utifrån måtten som tagits användes formeln för en ellipsoid där både längd (l), höjd (h) och bredd (b) användes enligt nedan. Denna formel har i en studie på hund visats vara den bästa uppskattningen av testikelvolymen när måtten tagits med hjälp av skjutmått eller ultraljud (Gouletsou *et al.*, 2008).

$$\text{Volymen (cm}^3\text{)} = l \times h \times b \times 0,5236$$

RESULTAT

Testiklar från 221 vargar som inkommit till SVA sedan 2003 undersöktes i studien.

Tre av dessa vargar var från den finsk-ryska vargstammen och togs därför inte med i statistiken då de inte tillhör den skandinaviska vargpopulationen som denna studie fokuserar på. En av dessa vargar hade en avvikande viktskillnad mellan testiklarna (11,76 g respektive 8,29 g) och den större testikeln hade även en röd färgförändring över ett 1 x 0,4 x 0,3 cm stort område, vilken tolkades som en blödning. Om denna blödning uppkommit innan eller i samband med dödstillfället kunde ej avgöras.

Sex av individerna som undersöktes var hybrider mellan varg och tamhund och inkluderades därför inte i statistiken. En av dessa hade uttalad unilateral testikelhypoplasi med stor viktskillnad mellan höger och vänster testikel (11,38 g respektive 1,15 g).

Av de vargarna som inräknats i studien, totalt, 212, hade åtta av vargarna i studien en avvikande viktskillnad mellan testiklarna, definierad som en viktskillnad större än eller lika med en tredjedel av den minsta testikelns vikt. Fyra av dessa individer stod noterade som kryptorkid i databasen men notering om huruvida det rörde sig om unilateral eller bilateral kryptorkism framgick endast hos en individ. Om testiklarna var placerade i buken eller i inguinalkanalen framgick inte i databaserna för någon av de kryptorkida individerna. Hos övriga vargar i studien var viktskillnaden mellan höger och vänster testikel liten. Vid organgenomgången sågs att från sju vargar fanns endast en testikel sparad och dessa har inte inkluderats i statistik med gonadosomatiskt index då deras sammanlagda testikelvikt blir missvisande låg. Hos en av dessa vargar fanns det en notis i databasen om att en testikel var bortflådd med huden redan när vargen inkom till SVA. Hos övriga vargar fanns det ingen notis om orsaken bakom detta. Hos en av dessa vargar fanns även en notis om att den var kryptorkid, dock stod det ej om unilateralt eller bilateralt. Eftersom den testikel som fanns sparad från denna varg hade en normal vikt (7,31 g) och spermier fanns i bitestikelsvansen var denna varg med i statistiken då det tolkades som att testikeln som saknades var den som hade varit placerad i buken eller i inguinalkanalen. Ytterligare fem vargar i studien stod noterade som kryptorkida utan att ha en avvikande viktskillnad mellan testiklarna. Tre av dessa individer var åldersbestämda som < 1 års ålder och då testikelvikten i samtliga fall var normala för åldern togs dessa vargar med i statistiken. För dessa tre vargar stod det ej om de var unilateralt eller bilateralt kryptorkida. Den fjärde och femte vargen stod som bilateralt kryptorkida i databaserna, var åldersbestämda till 1 års ålder och båda hade normal testikelvikt för sin ålder. Dessa båda vargar hade även spermier i bitestikeln och inkluderades i statistiken trots notisen om kryptorkism eftersom alla parametrar bedömdes vara normala.

Testikelvikten för alla vargar i studien varierade mellan 0,5 g hos en individ yngre än ett år och 20,0 g hos en sex år gammal individ. Medelvärdet på en enskild individs testikelvikt varierade mellan 0,5 g och 19,72 g. Fördelningen över testikelvikterna för olika åldersgrupper kan ses i tabell 1. Åldern på vargarna i studien varierade mellan <1 år upp till 7 år (en individ). Kroppsvikten hos vargarna varierade mellan 11 kg hos en individ som var yngre än ett år till 54 kg hos en 5 år gammal individ, med ett medelvärde på 38,6 kg. Gonadosomatiskt index varierade mellan 0,0068% och 0,0885% med ett medelvärde på 0,0324%. Hos de individer som

bedömdes som fertila (där spermier återfanns i bitestikelsvansen) varierade gonadosomatiskt index mellan 0,0073% och 0,0885%. Medelvärdet på en individs testikelvolym varierade mellan 0,38 cm³ hos en individ som var yngre än ett år och 18,78 cm³ hos en sex år gammal individ, med ett totalt medelvärde på 6,07 cm³ för alla vargar som ingick i studien. Fördelningen över testikelvolymen hos olika åldersgrupper kan ses i tabell 1. Inavelskoefficienten för vargarna i studien varierade mellan 0 och 0,486 med ett medelvärde på 0,257. En mycket ung varg ingick i studien och mätdata från denna togs inte med i statistiken, på grund av de avvikande mätvärden som fås från en så ung individ. Denna varg var uppskattningsvis två veckor gammal, hade en testikelvikt på 0,01 g (endast en testikel fanns med i materialet), en kroppsvikt på 0,7 kg, gonadosomatiskt index på 0,0014%, inavelskoefficient på 0,312 och en testikelvolym på 0,006 cm³. Totalt bedömdes 145 individer som fertila, 51 individer som infertila/ej könsmogna och 16 individer hade okänd fertilitetsstatus (svårbedömda).

Tabell 1. Visar fördelningen av testikelvikt och testikelvolym för olika åldersgrupper. Medelvärden visas som medelvärde \pm standardavvikelse (antalet individer).

Ålder	Testikelvikt (g)			Testikelvolym (cm ³)		
	Medelvärde	Min	Max	Medelvärde	Min	Max
< 1 år	2,85 \pm 1,68 (34)	0,50	7,17	2,59 \pm 1,60 (34)	0,38	6,43
1 år	7,17 \pm 3,84 (43)	1,57	14,42	6,78 \pm 3,72 (43)	1,45	15,25
\geq 2 år	8,05 \pm 4,21 (58)	2,29	19,72	7,58 \pm 4,14 (58)	1,58	18,78
Alla åldrar	6,43 \pm 4,21 (203)	0,5	19,72	6,07 \pm 4,1 (203)	0,38	18,78

Tabell 2 nedan visar medelvärde med standardavvikelse för testikelvikt, kroppsvikt, gonadosomatiskt index och testikelvolym hos vargarna för olika åldersgrupper. Vid jämförelse mellan testikelvikt och olika åldersgrupper sågs en signifikant skillnad mellan de < 1 års ålder och de \geq 1 år, vilket ses i tabell 2. Detta sågs även för gonadosomatiskt index, kroppsvikt och testikelvolym när de jämfördes mellan olika åldersgrupper.

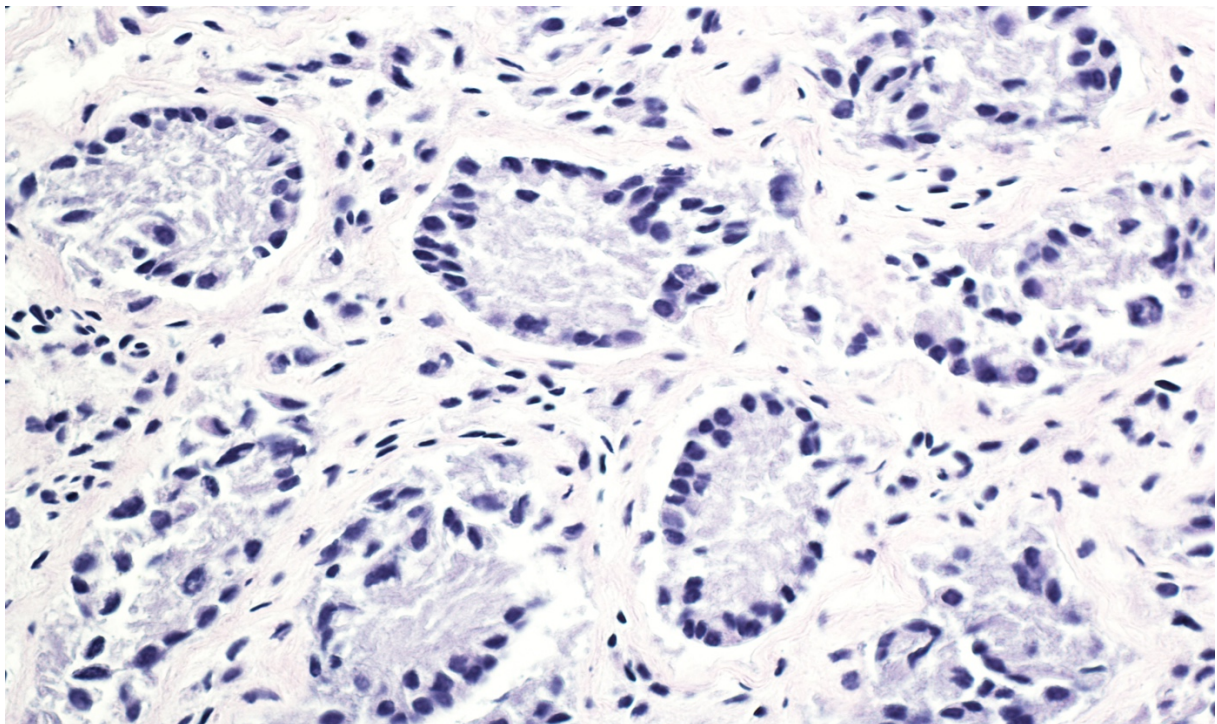
Tabell 2. Medelvärde \pm standardavvikelse (antalet individer) för medelvärde på testikelvikt ($p < 0,001$), kroppsvikt ($p < 0,001$), gonadosomatiskt index ($p < 0,001$) och medelvärde på testikelvolym ($p < 0,001$) för de olika åldersgrupperna. De olika bokstäverna (a, b, c) i exponentläge visar på statistiskt signifikant ($p < 0,05$) skillnad inom kolumnerna

Åldersgrupp (år)	Medelvärde testikelvikt (g)	Kroppsvikt (kg)	Gonadosomatiskt index (%)	Medelvärde testikelvolym (cm ³)
< 1 år	2,85 \pm 1,68 ^a (34)	32,0 \pm 6,9 ^a (34)	0,017 \pm 0,008 ^a (34)	2,59 \pm 1,6 ^a (34)
1 år	7,17 \pm 3,84 ^b (43)	41,2 \pm 6,0 ^b (43)	0,035 \pm 0,018 ^b (43)	6,78 \pm 3,72 ^b (43)
\geq 2 år	8,05 \pm 4,21 ^b (58)	41,8 \pm 4,8 ^b (58)	0,039 \pm 0,02 ^b (58)	7,58 \pm 4,14 ^b (58)

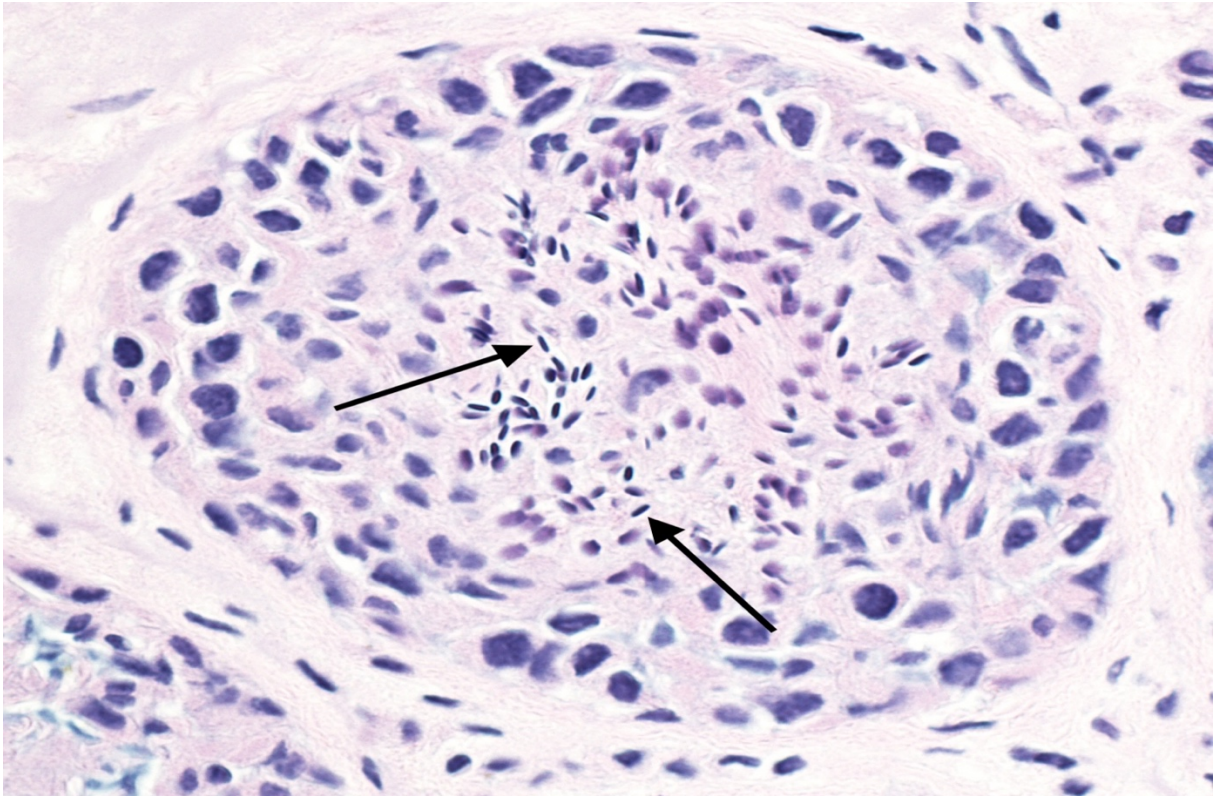
Konsistensen på testiklarna varierade mellan mjuk (1), mer mjuk än halvelastisk (2), mer halvelastisk än mjuk (3) och halvelastisk (4) hos individerna som undersöktes, men ingen

testikel med halvelastisk till hård (5) eller hård (6) konsistens hittades. Testiklarna som hade mjuk konsistens hade ofta uttalade kadaverösa förändringar.

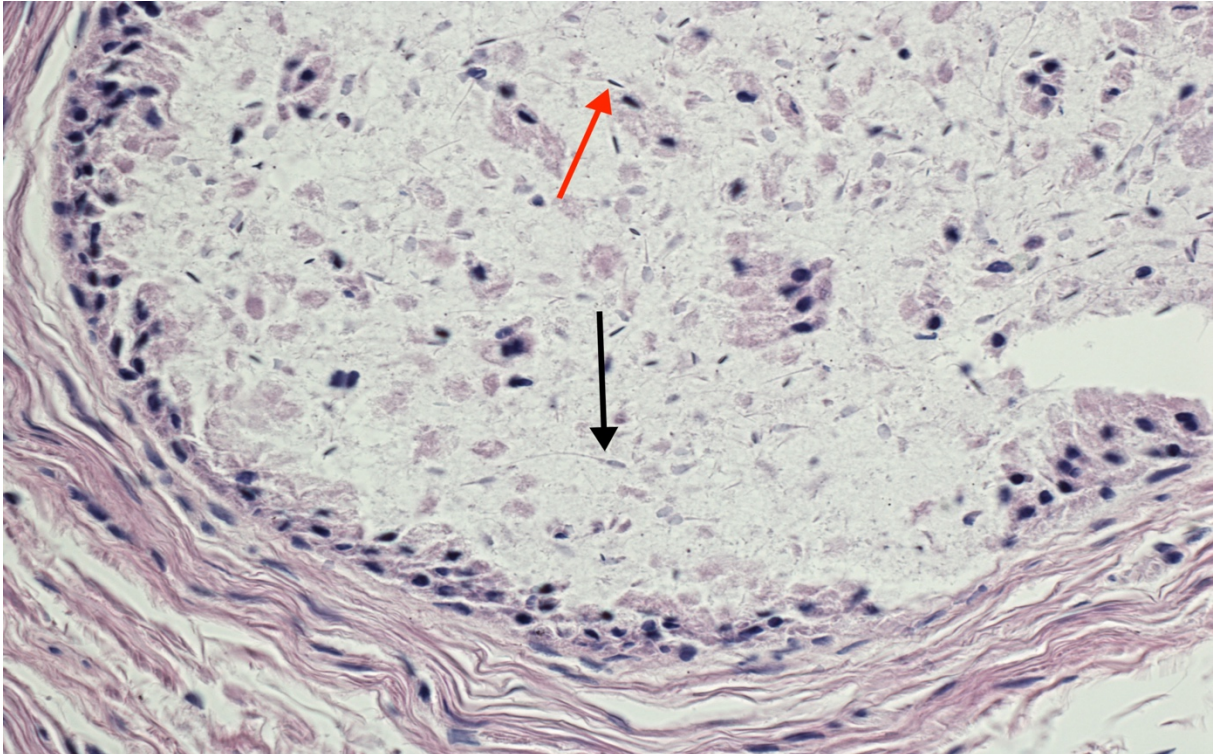
Vid histologisk undersökning av snitten kunde inga tydliga lumen ses i *tubuli seminiferi*, vilket heller inte förväntades kunna ses när vävnaden varit fryst. Ett fåtal vargar hade på något enstaka ställe i snittet ett lumen i *tubuli seminiferi*, men om denna hade uppkommit på grund av trasig vävnad eller om det var en äkta lumen kunde ej avgöras. Cellerna i *tubuli seminiferi* låg i oordning och det gick ej att identifiera specifika celler, förutom spermater vars avlånga huvud gjorde dem lätta att känna igen. Storleken på *tubuli seminiferi* och även antalet celler i dessa varierade mellan individer. I vissa fall var testikelvävnaden väldig oregelbunden och trasig, där inga intakta *tubuli seminiferi* kunde ses, och celler låg fritt fördelat i hela preparatet. Detta sågs oftast hos testiklar med kraftiga kadaverösa förändringar, men inte enbart hos dessa, och gjorde snitten mycket svårbedömda med avseende på fertilitet då fibroblaster och spermater vid kraftig kadaverös förändring har en snarlik morfologi. Storleken på tvärsnitt av *ductus epididymidis* i *cauda epididymidis* varierade också mycket mellan individer och i de allra flesta fall hade epitelet lossnat och fallit in i lumen. Mogna spermier i bitestikeln gick att skilja från epitelcellerna med hjälp av deras avlånga huvud. De vargar som hade spermier i bitestikeln tolkades som fertila, oavsett mängden spermier som sågs, och de vargar där inga spermier kunde ses tolkades som infertila. Hos en av individerna kunde spermater ses i *tubuli seminiferi* men inte i bitestikeln, och den tolkades då som okänd fertilitetsstatus då den troligtvis inte var riktigt könsmogen än men förmodligen snart skulle bli det. Ingen exakt ålder fastställd med tandsnittsanalys eller föräldraskapsbestämning fanns på denna individ men vid obduktion uppskattades åldern till < 1 år. Figur 4, 5 och 6 nedan visar exempel på fynd från den histologiska undersökningen, och alla dessa fotografier är tagna med samma förstoring (10x).



Figur 4. Testikelvävnad. *Tubuli seminiferi* med liten diameter, utan tydlig lumen och utan spermier. *Tubuli seminiferi* innehåller få celler.



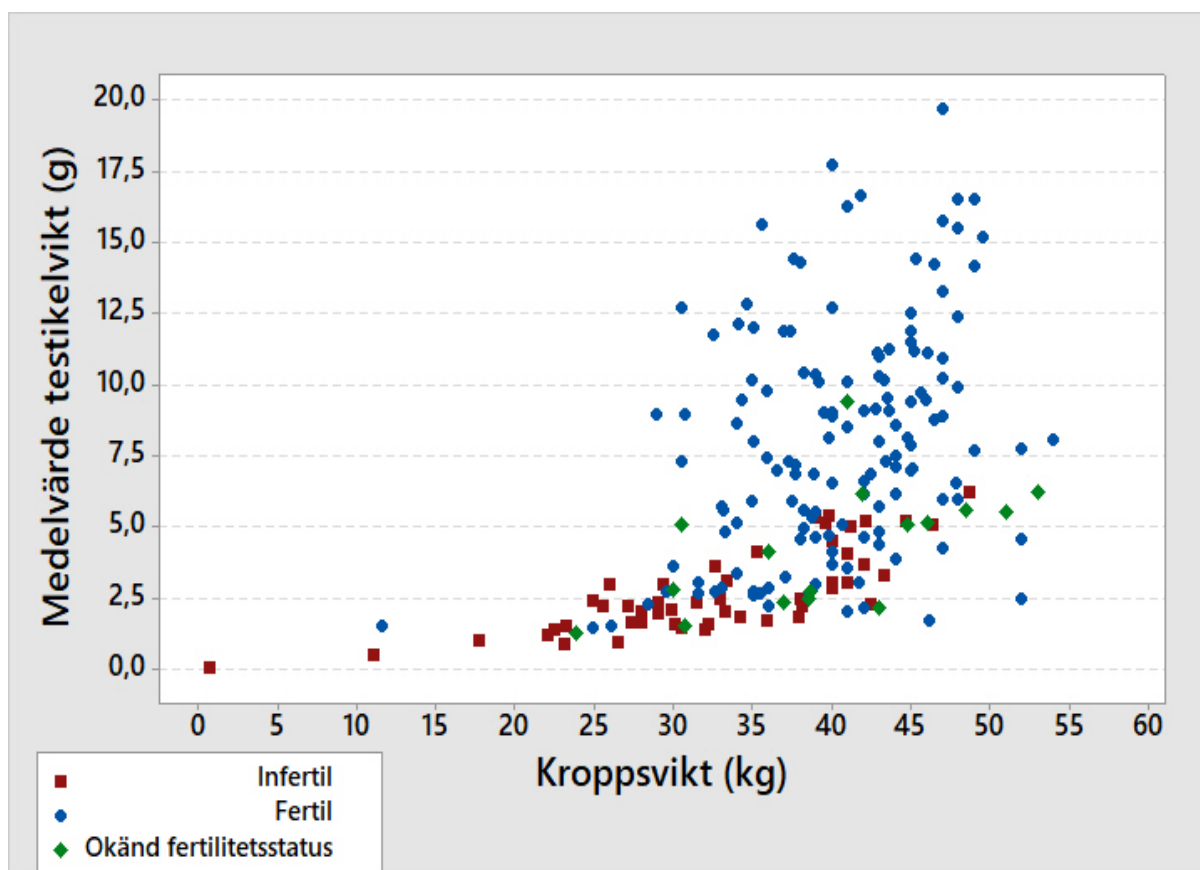
Figur 5. Testikelvävnad. Tubuli seminiferi med stor diameter och mycket celler. Rikligt med spermier kan ses som små celler med kompakt kromatin (pil). Ingen identifierbar lumen kan ses.



Figur 6. Cauda epididymidis. Rikligt med spermier i lumen på ductus epididymidis. Spermier kan ses som ett avlångt huvud med kompakt kromatin (röd pil) och även som mer transparenta där både spermies huvud och svans kan ses (svart pil).

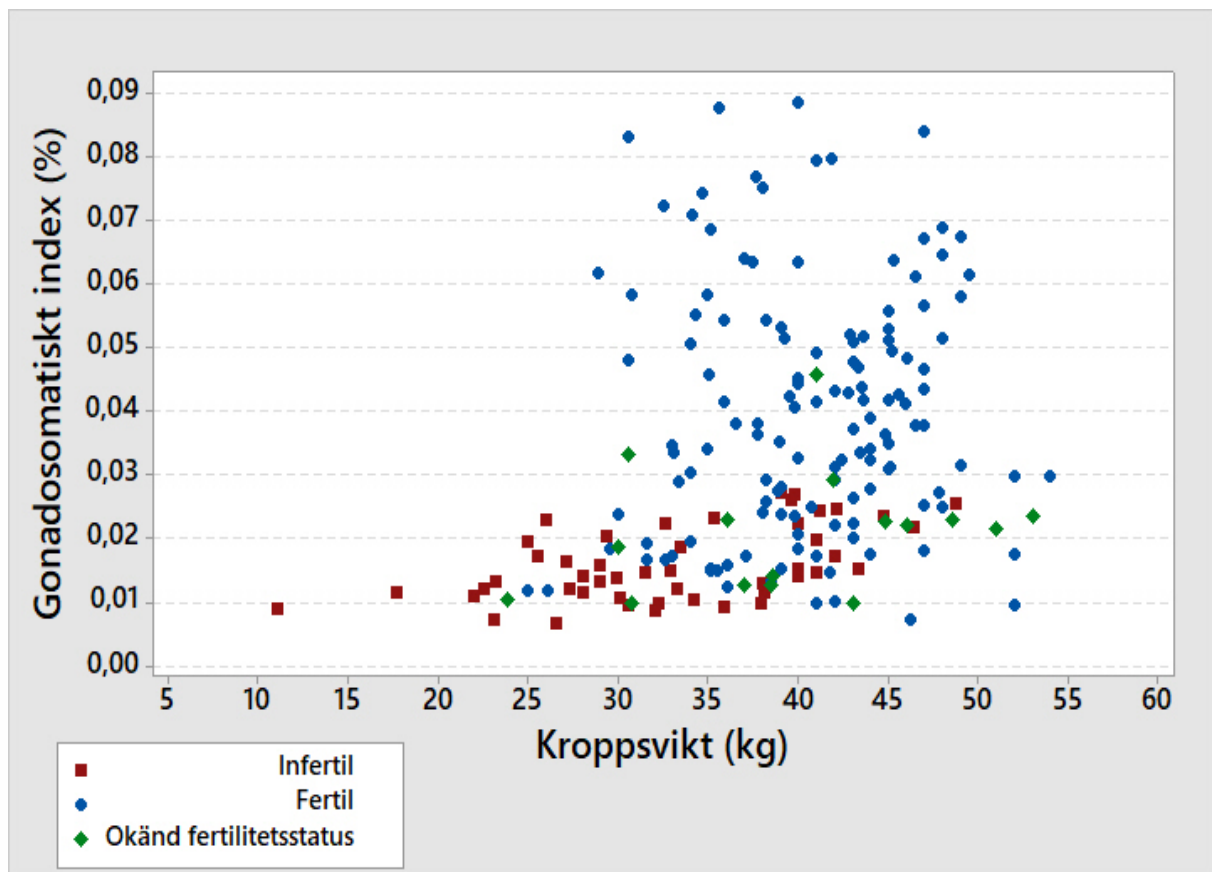
Testikelstorlek

Figur 7 visar vargarnas testikelvikt i förhållande till deras kroppsvikt, vilka sågs vara korrelerade till varandra med $r = 0,547$. Vid regressionsanalys sågs att $p < 0,001$, vilket visar ett signifikant samband mellan testikelvikt och kroppsvikt. Vid jämförelse av medelvärde på testikelvikt mellan fertila (8,0 g, $n = 138$) och infertila (2,74 g, $n = 49$) individer sågs en signifikant skillnad ($p < 0,05$). Vid jämförelse av medelvärdet på testikelvikt mellan infertila (3,99 g, $n = 21$) och fertila individer (8,08 g, $n = 12$) yngre än ett år sågs också en signifikant ($p < 0,05$) skillnad.



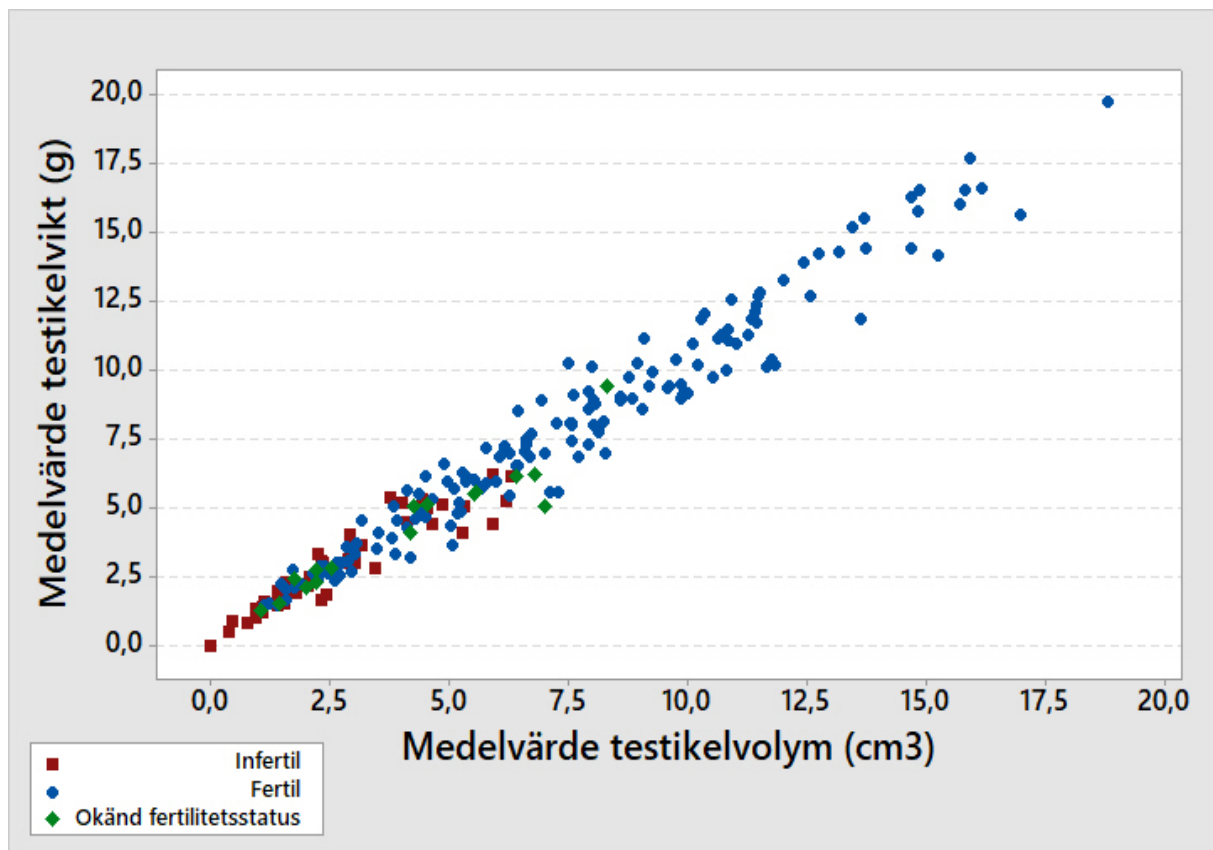
Figur 7. Visar medelvärdet av individernas testikelvikt i förhållande till kroppsvikt. $n = 204$, $p < 0,001$ och $r = 0,547$. Formeln för regressionslinjen: Medelvärde testikelvikt (g) = $-4,323 + 0,2791 \times$ kroppsvikt (kg). Inga vargar med en avvikande viktskillnad mellan testiklarna är med i denna figur.

Figur 8 visar förhållandet mellan gonadosomatiskt index och kroppsvikt hos vargarna. Dessa sågs vara korrelerade med en korrelationskoefficient på 0,374 och $p < 0,001$, vilket därmed visade ett statistiskt signifikant samband. Medelvärdet för gonadosomatiskt index uppvisade en signifikant skillnad ($p < 0,05$) mellan fertila (0,040%, $n = 133$) och infertila (0,016%, $n = 48$) individer. Ingen statistiskt signifikant skillnad sågs vid jämförande av gonadosomatiskt index mellan infertila individer < 1 års ålder (troligtvis ej ännu könsmogna), infertila individer som var 1 år gamla (troligtvis snart könsmogna) och infertila individer ≥ 2 års ålder kunde ses.



Figur 8. Visar gonadosomatiskt index i förhållande till kroppsvikt. $n = 198$, $p < 0,001$ och $r = 0,374$.
 Formeln för regressionslinjen: $\text{Gonadosomatiskt index (\%)} = 0,00078 + 0,000818 \times \text{kroppsvikt (kg)}$.

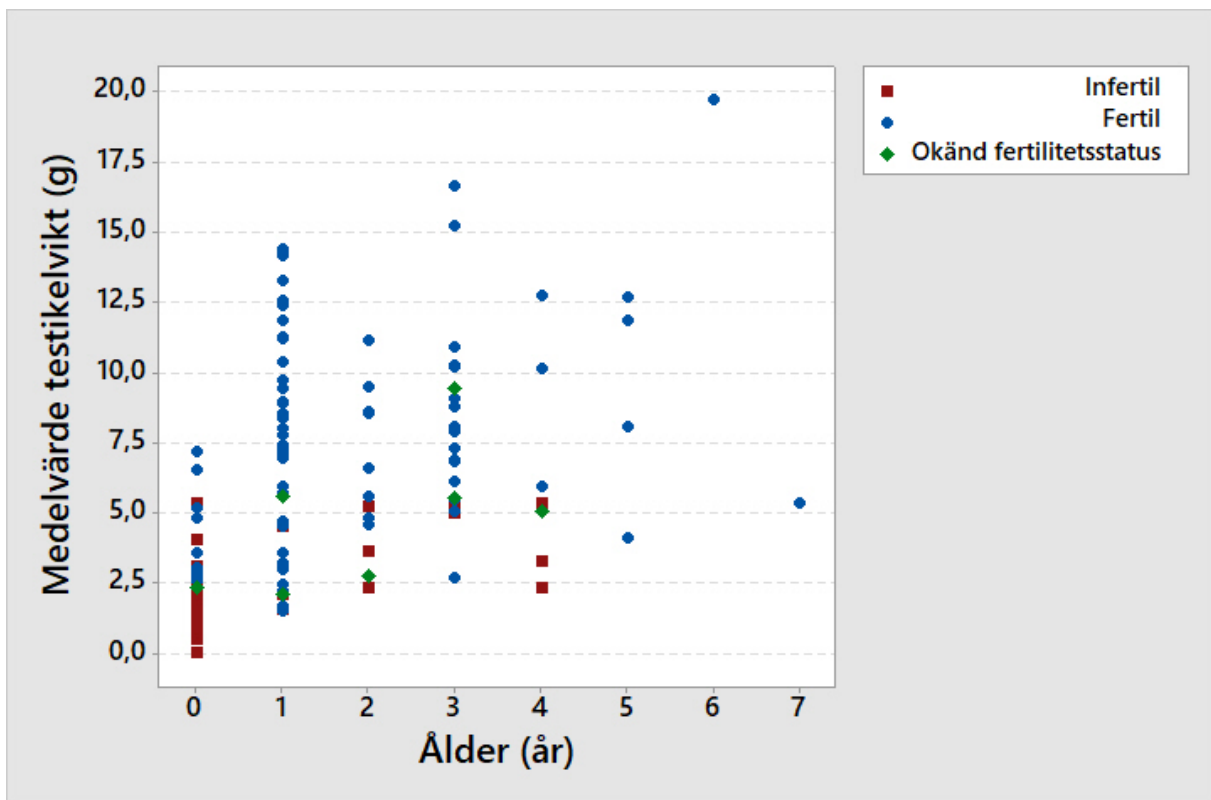
Figur 9 visar förhållandet mellan testikelvikt och testikelvolym. I denna graf är alla vargar med, även dem med en avvikande viktskillnad mellan testiklarna, eftersom deras medelvärde på testikelvikt och testikelvolym jämförs med varandra och ej med kroppsvikten. Vid jämförelse mellan medelvärdet på testikelvolymen hos fertila ($7,57 \text{ cm}^3$, $n = 138$) och infertila ($2,48 \text{ cm}^3$, $n = 49$) individer sågs en statistiskt signifikant ($p < 0,05$) skillnad.



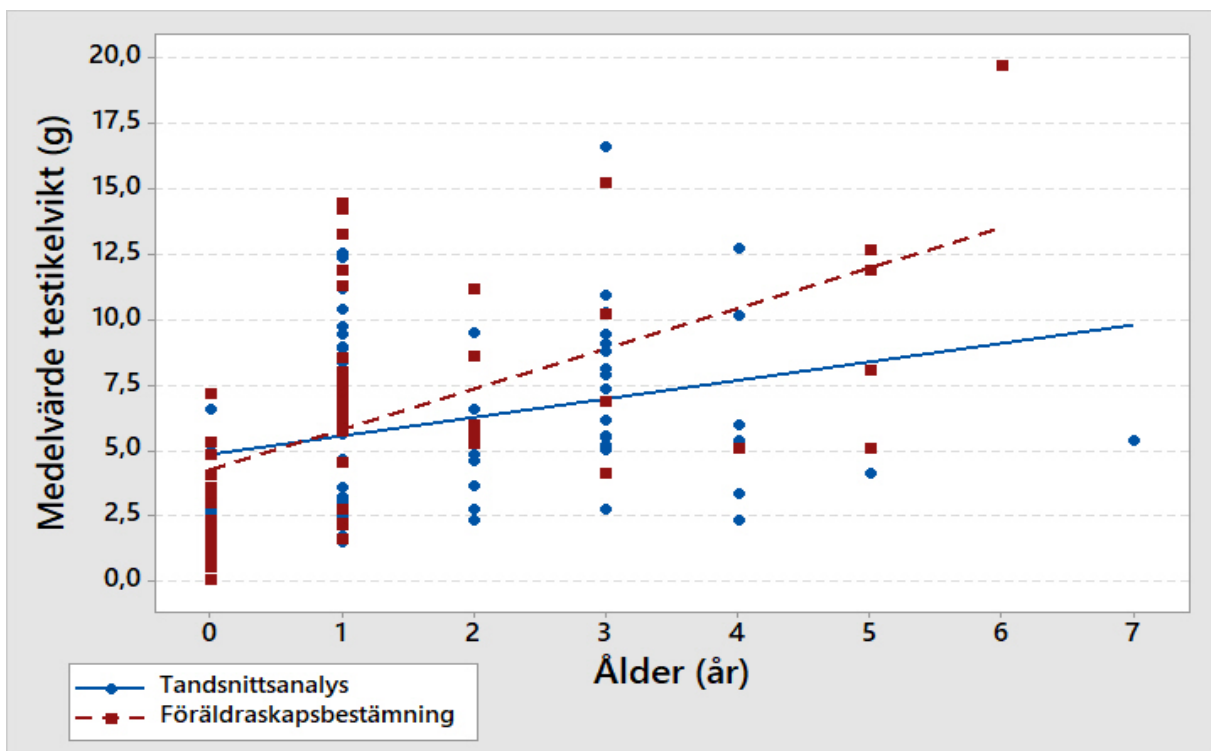
Figur 9. Visar förhållandet mellan testikelvikt och testikelvolym. $n = 203$ $p < 0,001$ och $r = 0,984$
 Formeln för regressionslinjen: Medelvärde testikelvikt (g) = $0,2588 + 1,011 \times$ medelvärde testikelvolym (cm^3).

I figur 10 ses förhållandet mellan testikelvikt och ålder, vilket visade ett signifikant samband ($p < 0,001$). Vid korrelationsanalys sågs att korrelationen mellan testikelvikt och ålder var $r = 0,517$ när data från båda databaserna inkluderades ($n = 126$), $r = 0,393$ när endast åldrar från tandsnittsanalys användes ($n = 91$) och $r = 0,615$ när endast ålder från föräldraskapsbestämning användes ($n = 58$). Figur 11 illustrerar skillnaden mellan åldrarna från tandsnittsanalys jämfört med åldrarna från föräldraskapsbestämning i förhållande till testikelvikt. I figur 10 och figur 12 ses att hos de allra flesta individer som åldersbestämts till 1 års ålder, och även hos några som åldersbestämts till < 1 års ålder, finns det spermier i bitestikelsvansen.

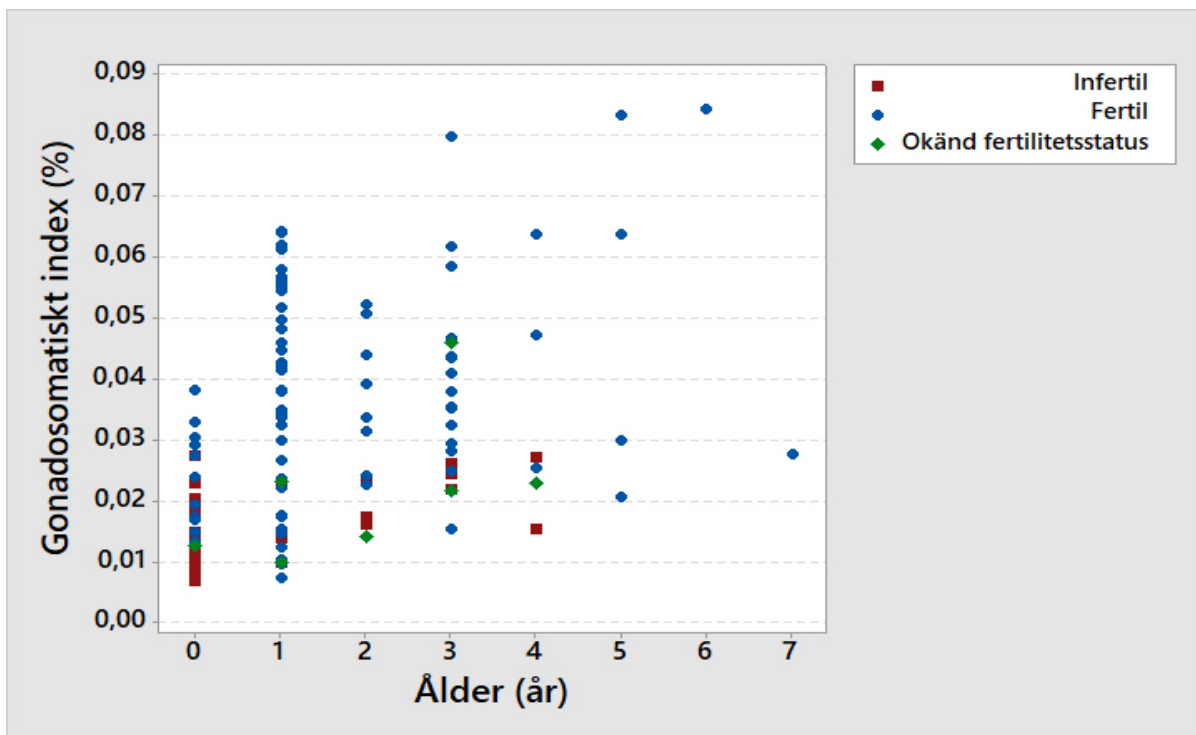
I figur 12 ses förhållandet mellan gonadosomatiskt index och ålder, vilket sågs ha ett statistiskt signifikant samband ($p < 0,001$). Vid korrelationsanalys sågs att $r = 0,471$ när data från båda databaserna användes ($n = 121$), $r = 0,374$ när endast åldrar från tandsnittsanalys användes ($n = 87$) och $r = 0,544$ när endast ålder från föräldraskapsbestämning användes ($n = 57$).



Figur 10. Visar förhållandet mellan testikelvikt och ålder. 0 år innebär < 1 års ålder. $n = 126$, $p < 0,001$ och $r = 0,517$. Ekvationen för regressionslinjen: Testikelvikt (g) = $4,229 + 1,544 \times \text{ålder (år)}$.



Figur 11. Visar förhållandet mellan testikelvikt och individens ålder (inklusive regressionslinjer) för två olika metoder för åldersbestämning på varg. $r_{\text{tandsnitt}} = 0,393$ och $r_{\text{föräldraskap}} = 0,615$. 0 år innebär < 1 års ålder.



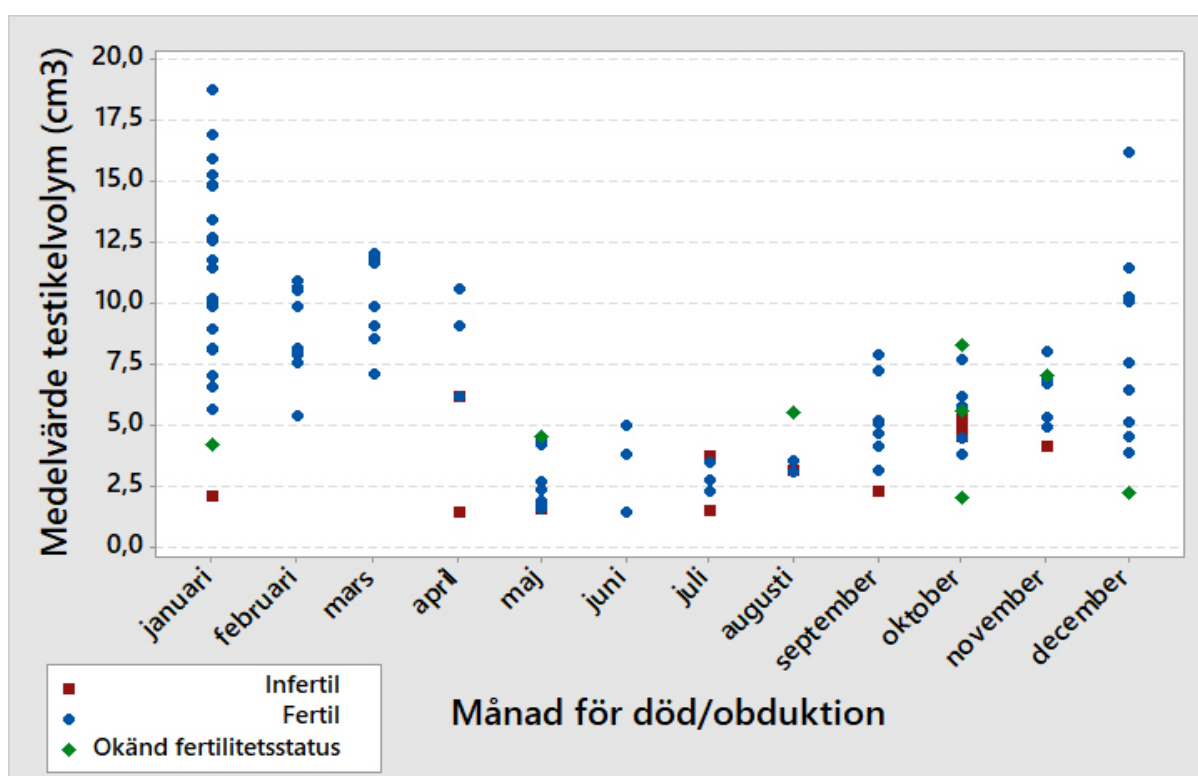
Figur 12. Visar förhållandet mellan gonadosomatiskt index och ålder. 0 år innebär < 1 års ålder. $n = 121$, $p < 0,001$ och $r = 0,471$. Ekvationen från regressionslinjen: Gonadosomatiskt index (%) = $0,02324 + 0,004875 \times \text{ålder (år)}$.

Säsongsvariation

Majoriteten av vargarna i studien hade dött under januari månad, men en viss variation fanns, som kan ses i tabell 3 och figur 13 nedan. Månad för obduktion har använts istället för döds månad i statistiken då månad för dödsfallet inte fanns tillgänglig för alla individer, vilket månad för obduktion gjorde. I de fall de kunnat jämföras har det varit samma månad för obduktion som för död. I figur 13 sågs att en säsongsvariation fanns där den största testikelvolymen var vid parningssäsongen och ca 2 månader innan (december – mars). Medelvärdet på testikelvolymen låg vid månaderna runt parning (december – mars) på ett värde på $9,63 \pm 3,74 \text{ cm}^3$ ($n = 50$) och vid övriga månader (april – november) var medelvärdet $4,97 \pm 2,68 \text{ cm}^3$ ($n = 55$), vilket uppvisade en statistiskt signifikant skillnad ($p < 0,05$) mellan dessa två grupper. Medelvärden på testikelvolymen för de olika månaderna kan ses i tabell 3. Gonadosomatiskt index, testikelvikt och testikelvolym jämfördes med månader runt parning (december – mars) och övriga månader (april – november), och där sågs för alla dessa faktorer ett statistiskt signifikant samband ($p < 0,001$) med det största värdet vid månaderna runt parning. Medelvärdet på testikelvikten var vid månaderna runt parning $12,24 \text{ g}$ ($n = 72$) och $7,25 \text{ g}$ ($n = 60$) vid övriga månader, vilket visades vara en statistiskt signifikant ($p < 0,05$) skillnad. Medelvärdet på gonadosomatiskt index var vid månaderna runt parning $0,033\%$ ($n = 69$) och vid övriga månader $0,019\%$ ($n = 54$), vilket var en signifikant ($p < 0,05$) skillnad. Medelvärde på gonadosomatiskt index under december – mars för vargar ≥ 1 års ålder var $0,042\%$ och $0,018\%$ för vargar < 1 års ålder under samma månader, och även dessa medelvärden uppvisade en signifikant ($p < 0,05$) skillnad.

Tabell 3. Fördelning över döds månad hos alla vargarna i studien samt medelvärde testikelvolym (cm³) ± standardavvikelse (antal individer) för vargar ≥ 1 års ålder. De olika bokstäverna i exponentläge (a, b, c, d, e) visar på statistiskt signifikant (p < 0,05) skillnad inom kolumnerna.

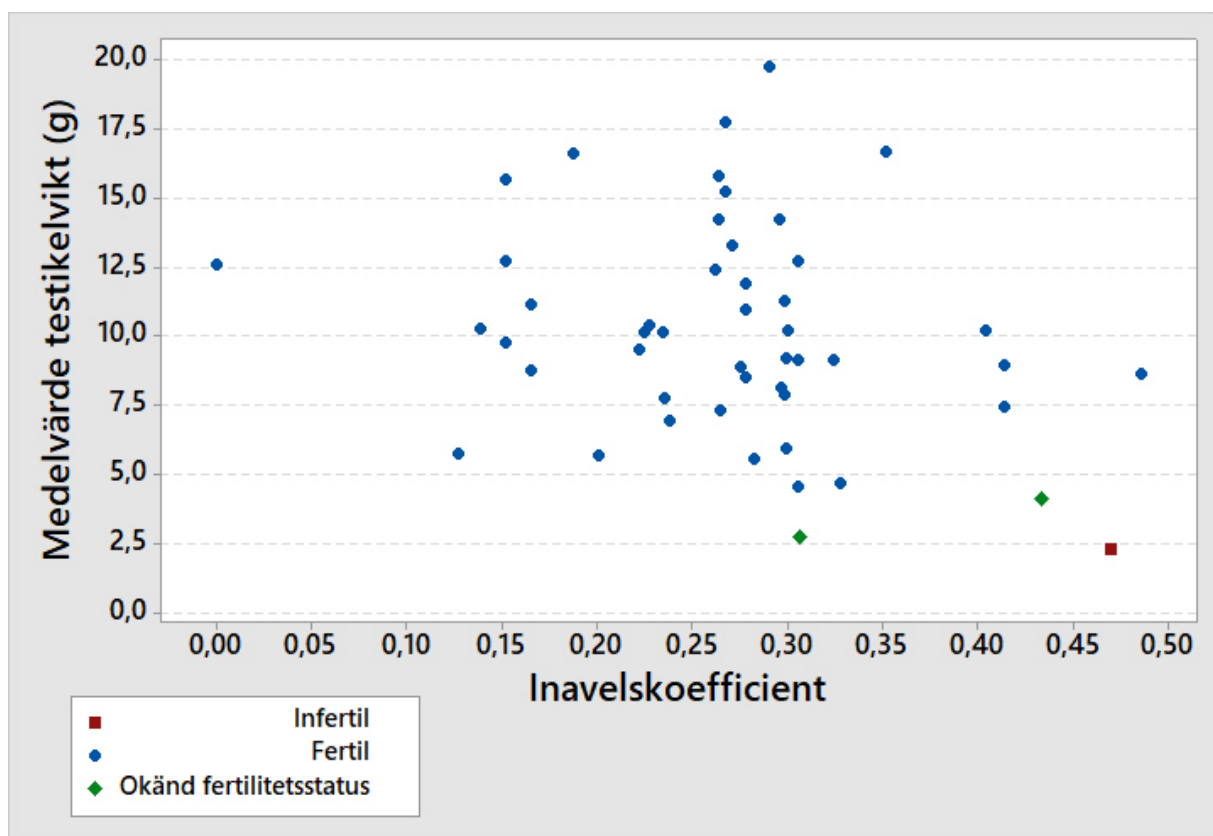
Månad	Antal vargar (alla individer)	Medelvärde testikelvolym (cm ³)
Januari	67	10,88 ± 4,32 (22) ^a
Februari	17	8,60 ± 1,71 (11) ^{a, b, c}
Mars	19	10,02 ± 1,88 (7) ^{a, b}
April	14	6,69 ± 3,50 (5) ^{a, b, c, d, e}
Maj	15	2,77 ± 1,25 (9) ^e
Juni	8	3,40 ± 1,82 (3) ^{b, c, d, e}
Juli	6	2,76 ± 0,92 (5) ^{d, e}
Augusti	4	3,82 ± 1,15 (4) ^{c, d, e}
September	14	4,94 ± 1,91 (8) ^{c, d, e}
Oktober	15	5,33 ± 1,74 (11) ^{c, d, e}
November	12	6,146 ± 1,385 (7) ^{b, c, d, e}
December	16	7,77 ± 4,23 (10) ^{a, b, c, d}
Okänd döds månad	5	



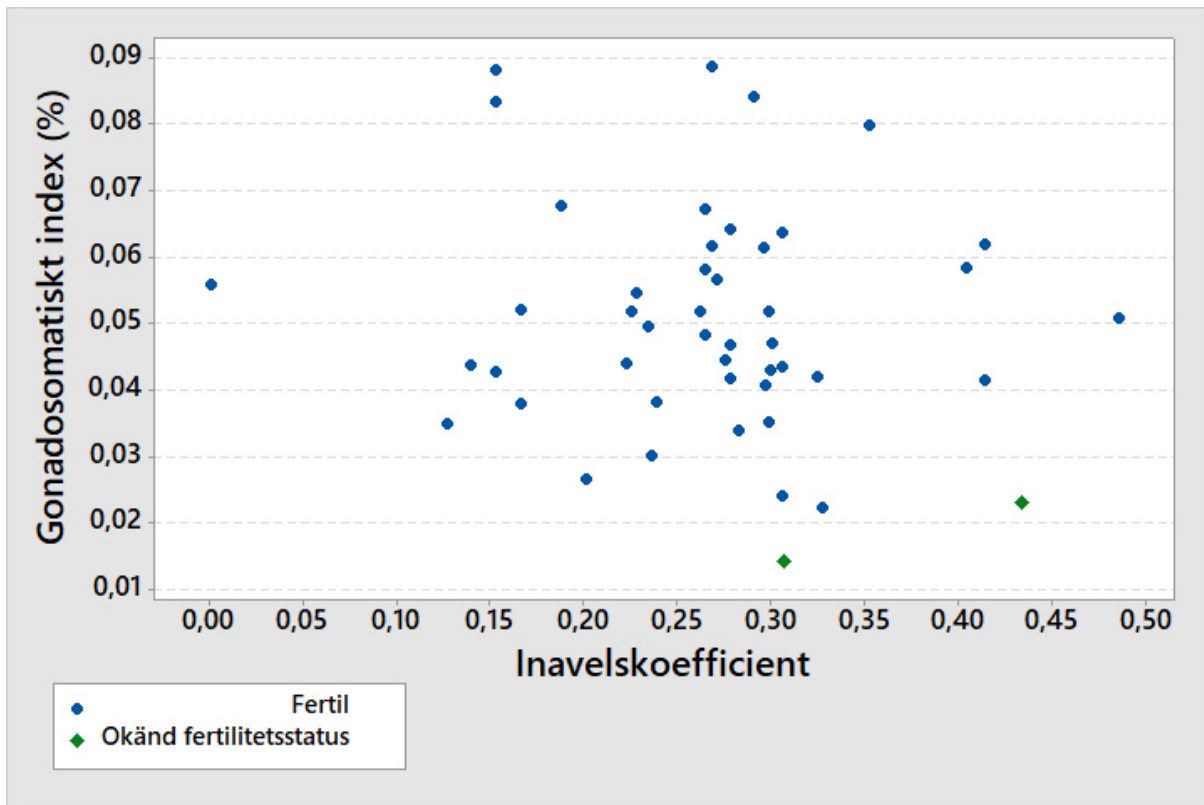
Figur 13. Visar förhållandet mellan testikelvikt och döds månad. n = 102, p < 0,001 och r = -0,424. Formeln för regressionskurvan var: Medelvärde testikelvolym (cm³) = 398658 - 18,26 × månad för död/obduktion + 0,000209 × månad för död/obduktion². Inga vargar yngre än ett år eller som hade en avvikande viktskillnad mellan testiklarna är med i denna figur.

Inavel

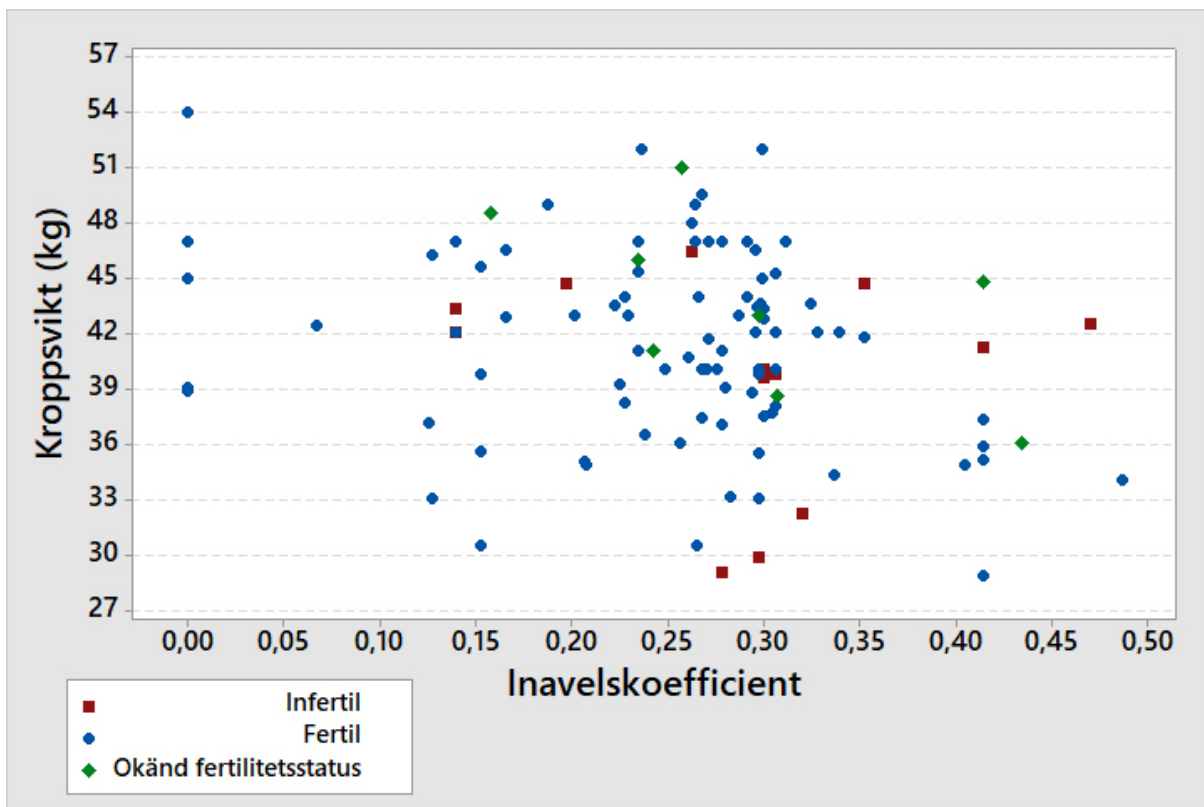
Figur 14, 15 och 16 visar förhållandet mellan inavelskoefficient och testikelvikt, gonadosomatiskt index och kroppsvikt. I alla tre figurer är endast vargar med vars döds månad var december – mars och som var åldersbestämda till ≥ 1 års ålder. Inget signifikant samband sågs mellan inavelskoefficient och fertilitet ($p = 0,34$). Vid jämförelse mellan medelvärden på inavelskoefficienten för vargar som var fertila (0,2452, $n = 79$), infertila (0,2682, $n = 11$) och de med okänd fertilitetsstatus (0,2927, $n = 8$) för individer ≥ 1 år sågs ingen signifikant ($p > 0,05$) skillnad.



Figur 14. Visar förhållandet mellan testikelvikt och inavelskoefficient för vargar ≥ 1 års ålder och vars döds månad var december – mars. $n = 50$, $p = 0,056$ och $r = -0,315$. Ekvationen för regressionslinjen var: Medeltestikelvikt (g) = $13,28 - 11,92 \times$ Inavelskoefficient.



Figur 15. Visar förhållandet mellan gonadosomatiskt index och inavelskoefficient för vargar ≥ 1 års ålder och vars döds månad var december – mars. $n = 48$, $p = 0,416$ och $r = -0,148$. Ekvationen för regressionslinjen var: $\text{Gonadosomatiskt index (\%)} = 0,05626 - 0,0240 \times \text{inavelskoefficient}$.



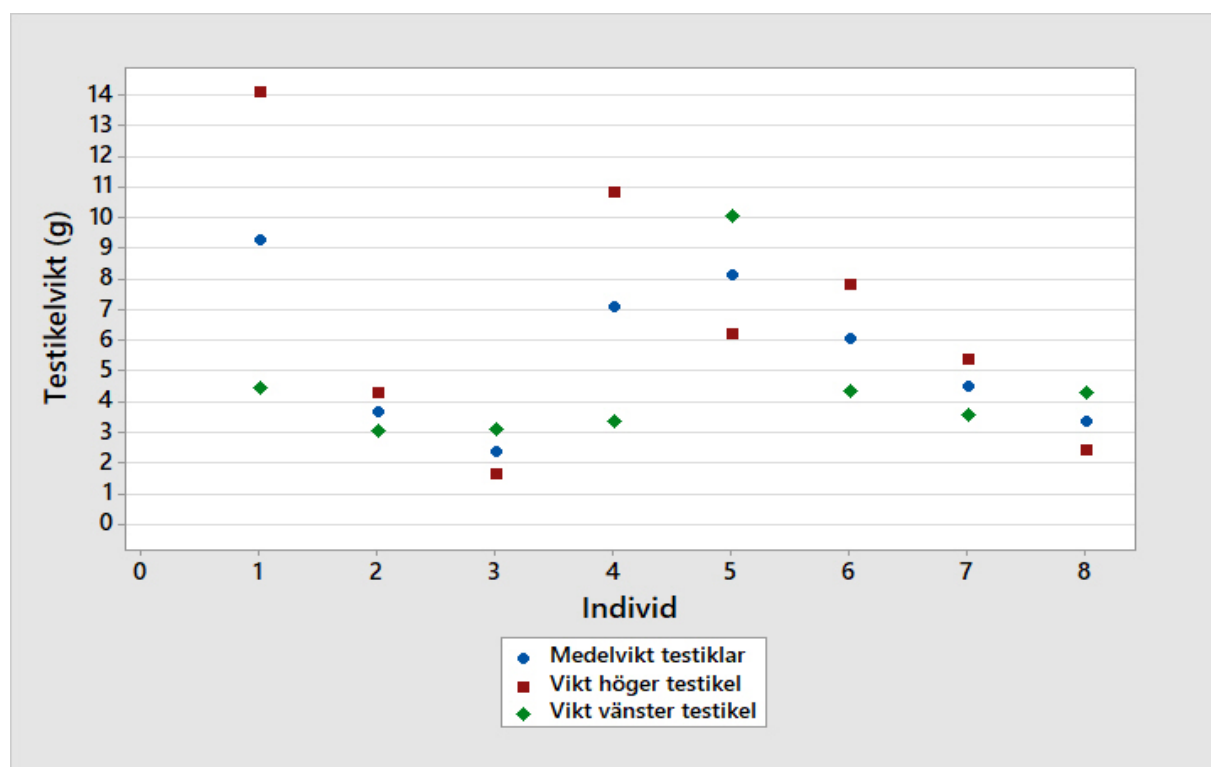
Figur 16. Visar förhållandet mellan kroppsvikt och inavelskoefficient för vargar ≥ 1 års ålder. $n=109$, $p = 0,009$ och $r = -0,243$. Formeln för regressionslinjen var: $\text{Kroppsvikt (kg)} = 44,81 - 13,78 \times \text{inavelskoefficient}$.

Kryptorkism och individer med avvikande viktskillnad mellan testiklarna

Åtta av vargarna som ingick i studien hade en markant viktskillnad mellan testiklarna, i denna studie definierad som en storleksförändring större än en tredjedel av den minsta testikelns vikt. Data för dessa individer gällande testiklarnas vikt, kroppsvikt, fertilitet, inavelskoefficient och gonadosomatiskt index illustreras i tabell 4. En grafisk illustration av viktskillnaden mellan testiklarna visas i figur 17 nedan.

Tabell 4. Data över vargar med avvikande viktskillnad mellan testiklarna

Individ	Kroppsvikt (kg)	Vikt testiklar (g)			Medelvikt	Gonadosomatiskt index (%)	Inavelskoefficient	Fertil (ja/nej)
		Höger	Vänster					
1	33,0	14,05	4,4	9,225	0,056	0,2969	Ja	
2	35,0	4,26	2,99	3,625	0,021	0,2491	Ja	
3	35,5	1,62	3,05	2,335	0,013	0,2974	Ja	
4	37,7	10,81	3,31	7,06	0,037	0,3040	Ja	
5	40,0	6,18	9,99	8,085	0,040	0,2478	Ja	
6	43,0	7,78	4,29	6,035	0,028	0,3196	Ja	
7	44,7	5,33	3,54	4,435	0,020	0,3520	Nej	
8	45,0	2,39	4,23	3,31	0,015	0,2289	Ja	



Figur 17. Visar viktskillnaden mellan vänster testikel, höger testikel och deras medelvärde för individerna med en markant viktskillnad mellan testiklarna.

Av dessa åtta vargar med avvikande viktskillnad mellan testiklarna var det fyra som var beskrivna som kryptorkida i databaserna. Dessa var individ 1, 4, 7 och 8. Om kryptorkismen var unilateral eller bilateral samt om testiklarna var placerade i buken eller i inguinalkanalen framgick inte av tillgängliga data. Individ 1, 4, 7 och 8 var skjutna i Dalarnas län, individ 2 var skjuten i Värmlands län och individ 3 och 5 var skjutna i Jämtlands län. Ingen information om vart i landet individ 6 sköts fanns att tillgå.

Förutom individ 1, 4, 7 och 8 i tabell 4 och figur 17 så fanns notiser om att ytterligare sex individer i studien var kryptorkida men som inte hade någon avvikande viktskillnad mellan testiklarna. Tabell 4 nedan visar data gällande alla vargar som noterats som kryptorkida i studien. Individ 1, 4, 7 och 8 från tabell 4 och figur 17 har samma individnummer även i tabell 5. Individ 9 i tabell 5 stod noterad som bilateralt kryptorkid i databaserna, hos de övriga individerna stod det inte specificerat om det var unilateral eller bilateral kryptorkism. För individ 10 fanns endast en testikel sparad.

Tabell 5. Visar data över alla vargar i studien som stod noterade som kryptorkida i databaserna. Individ 1, 4, 7 och 8 är samma som motsvarande siffra i tabell 3 och figur 17. Länet avser det län där vargarna dog. Ålder anges som åldersgrupp eller exakt ålder, med minsta möjliga ålder och maximala möjliga ålder inom parantes där exakt ålder ej kunnat bestämmas.

Individ	Kroppsvikt (kg)	Medelvikt testiklar (g)	Viktskillnad mellan testiklar (g)	Inavelskoefficient	Fertil (ja/nej)	Ålder (år)	Län
1	33	9,225	9,65	0,2969	Ja	>2 (6–8)	Dalarnas län
2	23,2	1,53	0	0,3196	Nej	<1	Västmanlands län
3	29	1,925	0,09	0,3196	Nej	<1	Västmanlands län
4	37,7	7,06	7,5	0,3040	Ja	3	Dalarnas län
5	33,2	2,005	0,05	0,2970	Nej	Okänd (<1–1)	Jämtlands län
6	46,2	1,93	0,1	0,2667	Ja	1	Dalarnas län/ Värmlands län
7	44,7	4,435	1,79	0,3520	Nej	>2 (8–9)	Dalarnas län
8	45	3,31	1,84	0,2289	Ja	Okänd (1–2)	Dalarnas län
9	42	2,125	0,13	0,1389	Ja	1	Örebros län
10	37,3	7,31	0 (endast en testikel)	0,4135	Ja	≥2 (2–5)	Gävleborgs län

Vid jämförelse av kryptorkism och inavelskoefficient sågs inget signifikant samband ($p = 0,345$) och ingen signifikant skillnad sågs mellan medelvärdet på inavelskoefficienten för kryptorkida individer ($0,2797$, $n = 10$) och icke kryptorkida individer ($0,2543$, $n = 186$).

DISKUSSION

Syftet med denna studie var att studera hanvargars reproduktionspotential i den skandinaviska vargpopulationen genom undersökning av testiklar och bitestiklar insamlade sedan år 2003, och att korrelera dessa fynd till vargarnas inavelskoefficient. Detta är den första svenska studie där testiklar hos varg har undersökts för att bedöma reproduktionsförmågan. Studien var retrospektiv och bestod av ett stort underlag av undersökta reproduktionsorgan från 221 hanvargar varav 212 av dessa inkluderades i studien.

Organgenomgång, histologisk bedömning och data från databaser

Alla organen som användes i studien hade varit frysta och tinades innan mätning, vägning och biopsitagning. Tiden som organen varit frysta varierade från mindre än 1 år upp till 15,5 år och graden av postmortala förändringar på organen varierade mycket. Detta medförde vissa svårigheter både i den makroskopiska organgenomgången och vid den histologiska bedömningen av biopsierna. Mätning av bitestiklar (både längd och bredd) blev missvisande redan då lindriga-måttliga postmortala förändringar hade inträtt eftersom de då förlorade mycket av sin konsistens och form. Detta gjorde att de var svåra att mäta liggandes i sitt naturliga läge eftersom det inte längre var tydligt exakt var infästningen till testikeln hade varit. Bitestikeln blev också längre och smalare till följd av nedsatt konsistens. På grund av detta har inga resultat från mätningar (längd, bredd, vikt) av bitesticklarna tagits med i denna studie. Mätning av testicklarna försvårades vid måttliga-kraftiga postmortala förändringar då de fick nedsatt konsistens och en något ökad längd och minskat djup. Testicklarna kunde dock i de flesta fall manipuleras tillbaka i sin naturliga form utan svårighet, och eftersom alla tre måtten (längd, bredd och djup) användes i beräkningen av testikelvolymen bedömdes de postmortala förändringarna inte leda till missvisande data gällande volymen på testicklarna. Eftersom testicklarna hade varit frysta och tinade innan fixering var den histopatologiska morfologin mycket annorlunda jämfört med vävnad som fixerats direkt efter dödsfallet (Spörndly-Nees *et al.*, 2015). Den förändrade strukturen i *tubuli seminiferi* ledde till att den histologiska bedömningen försvårades då alla celler låg i oordning och ovanpå varandra och i många fall kunde ingen tydlig gräns mellan *tubuli seminiferi* och omkringliggande vävnad ses. Uttalade kadaverösa förändringar hade dock ingen inverkan på den histologiska morfologin och även testiklar och bitestiklar som vid den makroskopiska organgenomgången bedömts ha kraftiga kadaverösa förändringar kunde bedömas histologiskt. I en studie på mink (Spörndly-Nees *et al.*, 2015) sågs att nedfrysning och upptining av testiklar ger en minskad testikelvikt. Eftersom testikelvikterna som använts i denna studie är tagna efter infrysning och upptining kan testikelvikten på alla vargar i studien vara falskt låg jämför med testikelvikten då de levde. Inga testikelvikter var dock tagna utan att organen varit frysta och testikelvikterna bör därmed vara jämförbara med varandra inom denna studie.

De kroppsvikter som har använts i denna studie var vikterna tagna på vargens kropp efter avhudning, då dessa vikter fanns för alla vargar. Kroppsvikt innan avhudning (levandevikt) fanns inte att tillgå för alla individer. Till följd av detta är kroppsvikterna på vargarna i denna studie generellt lägre än vad som normalt setts i andra studier på varg (Wabakken *et al.*, 2001; Sand *et al.*, 2014). Kroppsvikterna efter avhudning kunde också vara missvisande i vissa fall, när mer vävnad följt med vid avhudningen hos vissa individer än hos andra, vilket kunnat ge

falskt låg vikt hos vissa individer. Det var även möjligt att kroppsdelar eller organ av misstag avlägsnats med huden och saknades vid ankomst till SVA, vilket såklart även det ger en falskt låg vikt. Även fysiologiska faktorer såsom hull över eller under medelgott påverkar kroppsvikten och all statistik som tas fram med dessa data, och det skulle därför vara intressant att göra en uppföljande studie där endast vargar inkluderas som bedömts ha medelgott hull och där det finns vikt innan avhudning tillgänglig. Dock faller det inte inom ramen för detta arbete.

Testikelvikt, gonadosomatiskt index och testikelvolym

Gonadosomatiskt index för en individ beräknas genom att dividera individens totala testikelvikt (utan bitestiklar) med kroppsvikten. Detta gör att en individ med hull över eller under medelgott kommer få ett falskt lågt respektive falskt högt gonadosomatiskt index. Eftersom kroppsvikterna som använts i denna studie är vikt efter att avhudning gjorts, och därmed är lägre än levandevikten, kommer gonadosomatiskt index för vargarna i studien att vara något högre än det skulle varit om levandevikten använts.

Vargarna i denna studie sågs ha ett lägre gonadosomatiskt index än vad som setts hos hund i en tidigare studie (Dahl, 2017). En möjlig förklaring till detta är att varg har en säsongsmässig ökning av testikelvolym och testikelvikt inför och under parningssäsongen, något som sedan minskar igen efter att parningssäsongen är avslutad (Mech, 2006). Denna säsongsmässiga ökning och minskning av testikelvolym och testikelvikt är inget som setts hos hund, troligtvis eftersom tikar hos hund löper individuellt i olika perioder under året och inte under en specifik månad som vargtikar gör. Vid jämförelse av medelvärdet på gonadosomatiskt index mellan vargar som dött under december – mars och vargar som dött under april – november sågs en statistiskt signifikant skillnad mellan dem, där det högsta värdet var under december – mars. Samma sak sågs även vid jämförelse av både testikelvikt och testikelvolym under december – mars jämfört med april – november. Detta innebär att den säsongsmässiga faktorn ger ett lägre gonadosomatiskt index, lägre testikelvikt och lägre testikelvolym under månaderna april – november, vilket behöver tas hänsyn till vid studier gällande testikelstorlek hos varg. Dock sågs att vargarna i denna studie hade lägre gonadosomatiskt index än vad som setts hos hund även då endast de individer inkluderades som hade dött under december – mars. Detta talar för att även om den säsongsmässiga variationen är en bidragande faktor så är det inte den enda orsaken till detta. Studien som gjorts på hund (Dahl, 2017) inkluderade 16 hundar av varierade ras och kroppsstorlek. Även fast hund och varg kan betraktas som samma art (Sand *et al.*, 2014) så finns det stor variation i utseende och kroppsbyggnad mellan hundraser, vilket är något som eventuellt skulle kunna påverka resultaten i denna typ av studie. En studie som inkluderade fler olika hundar där slutsatser kunde dras om hur gonadosomatiskt index varierade mellan hundraser skulle vara intressant för att tolka resultaten i även denna studie på varg.

Testikelvikten har i denna studie setts öka med ökande kroppsvikt, vilket även setts i studier på hund (Woodall & Johnstone, 1988b; Dahl, 2017) och lodjur (Axné *et al.*, 2009). Sambandet visades vara statistiskt signifikant men korrelationen mellan testikelvikt och kroppsvikt var inte lika starkt positiv i denna studie som tidigare setts på hund och lodjur. En möjlig orsak till detta skulle kunna vara den säsongsvariation som påverkar testikelstorleken hos varg. En annan möjlig orsak till detta skulle kunna vara falskt låga kroppsvikter hos flera av vargarna till följd av avhudningen eller på grund av undervikt/utmärgling. Korrelationen hade troligen även blivit

starkare om de ej ännu köns mogna vargarna tagits bort ur denna statistik, då deras låga testikelvikt i förhållande till deras kroppsvikt kan påverka den linjära regressionen. Testikelvikt och testikelvolym uppvisade i denna studie en stark positiv korrelation och ett statistiskt signifikant samband, något som även setts i tidigare studier på hund och lodjur (Woodall & Johnstone, 1988b; Axner *et al.*, 2009; Dahl, 2017)

Korrelationen mellan ålder och testikelvikt sågs variera mellan de två olika metoderna för åldersbestämning hos varg som användes i denna studie, där den högsta korrelationen sågs för åldersbestämning genom föräldraskapsbestämning. Samma sak sågs mellan ålder och gonadosomatiskt index. Ingen siffra på osäkerheten för åldersbestämning genom föräldraskapsbestämning finns då det inte finns något sätt att utvärdera resultatet eftersom den exakta "sanna" åldern förblir okänd. Osäkerheten för åldersbestämning med tandsnittsanalys anses vara ± 1 år (Landon *et al.*, 1998; Gipson *et al.*, 2000). Tandsnittsanalys skulle därför kunna användas som stöd för åldersbestämning via föräldraskap i de fall där minsta möjliga ålder och högsta möjliga ålder skiljer sig åt på flera år. I denna studie har dessa åldrar använts som exakt ålder i de fall en av metoderna har gett en exakt ålder och även då de båda metoderna har angett samma ålder på en varg. I de fall de båda metoderna gett olika ålder på samma varg har vargen inte tilldelats en exakt ålder utan istället blivit tilldelad ett åldersspann baserat på de båda metodernas åldersbestämning. Vargarna har även delats in i åldersgrupperna <1 år, 1 år och ≥ 2 år. Genom att dela in vargarna i dessa åldersgrupper har fler vargar kunnat vara med i statistiken än om endast de med exakt ålder hade inkluderats. Med en osäkerhet på ± 1 år för åldersbestämning via tandsnittsanalys och en okänd osäkerhet på åldersbestämning via föräldraskap är dock denna indelning av åldersgrupperna aningen snäv. En individ som åldersbestämts till 1 år skulle därmed kunna vara <1 år eller 2 år, och tillhöra någon av de andra grupperna. Denna indelning av åldersgrupperna valdes för att kunna studera tidpunkten för köns mognad hos vargarna. Det var av stort intresse att se om det fanns signifikanta skillnader mellan testikelvikt, testikelvolym och gonadosomatiskt index just vid köns mognad och därför var det viktigt med denna gruppindelning.

Studier där köns mognad på varg diskuterats använder åldern vid första parning som ett mått på köns mognad för varg. Inga studier där hanvargarnas köns mognad har undersökts med avseende på spermier i bitestikelsvansen har återfunnits. Det är troligt att vargarna parar sig för första gången efter 20 månaders ålder (ca 22 – 24 månaders ålder) då de lämnar föräldrarnas flock vid 10 – 15 månaders ålder och finner en ny flock innan 20 månaders ålder. De parar därför vid nästa parningssäsong, som under svenska förhållanden inträffar när vargtikarna löper i februari – mars (Rausch, 1967; Sand *et al.*, 2014; Chapron *et al.*, 2016). I denna studie sågs att de allra flesta vargarna hade spermier i *cauda epididymidis* vid ett års ålder, och därmed var köns mogna, vilket var tidigare än den åldern då vargtikar blir köns mogna enligt litteraturen (Rausch, 1967; Seal *et al.*, 1979; Schmidt *et al.*, 2008; Sand *et al.*, 2014; Geiger *et al.*, 2016). Det sågs även att några vargar som hade åldersbestämts till yngre än ett år hade spermier lagrade i bitestikelsvansen. Detta har även setts i en studie av Medjo & Mech (1976), där det sågs att en 10 månader gammal varghane framgångsrikt betäckte en vargtik i samma ålder, vilket resulterade i dräktighet. Fynd av spermier i bitestikelsvansen visar på att vargarna sannolikt var köns mogna vid sin död men deras förmåga att betäcka, spermiernas funktionsduglighet och vargarnas libido går inte att bedöma utifrån det material som undersökts. För att en hanvarg ska

betäcka krävs dessutom en vargtik i l p och avsaknad av en annan alfahane, och eftersom vargtikar endast löper en gång per  r g r detta det svårare att bedöma exakt tidpunkt när hanvargen är fullt könsmogen och redo att reproducera.

Testikelvikt, testikelvolym, kroppsvikt och gonadosomatiskt index s gs i denna studie uppvisa en statistisk signifikant skillnad mellan individer < 1 års ålder och individer ≥ 1 års ålder, med en positiv korrelation med ökande ålder. Att dessa parametrar ökar med stigande ålder har även setts i en studie på lodjur (Axn r *et al.*, 2009). Korrelationen mellan testikelvikt och ålder var hos vargarna 0,517, vilket eventuellt hade varit högre om individer födda under april – november hade uteslutits ut statistiken då detta hade eliminerat säsong som faktor. En viss individuell variation i testikelstorlek förväntas också inom en population, men det är oklart hur stor variation denna normalt står för. I studien av Axn r *et al.* (2009) sågs på lodjur att gonadosomatiskt index uppvisade en signifikant skillnad mellan könsmogna och icke könsmogna lodjur av hankön, vilket ansågs bero på en ökning i testikelvikt under könsmognad som inte åtföljs av en lika stor ökning av kroppsvikten. I den här studien på varg s gs att gonadosomatiskt index, testikelvikt och testikelvolym uppvisade en statistiskt signifikant skillnad mellan fertila och infertila individer, där de infertila både innefattar ej ännu könsmogna individer och individer som av annan orsak hade avsaknad av spermier i bitestikelsvansen. En signifikant skillnad sågs även i testikelvikt och testikelvolym mellan fertila (könsmogna) och infertila (ej ännu könsmogna) individer under ett års ålder, men denna skillnad sågs inte f r gonadosomatiskt index. En möjlig förklaring till detta skulle kunna vara att då testikelvikten ökar vid könsmognad sker även en ökning av kroppsvikten, vilket gör att gonadosomatiskt index inte uppvisar en signifikant skillnad mellan könsmogna och icke könsmogna individer. Detta s gs inte i studien på lodjur av Axn r *et al.* (2009) men skulle eventuellt kunna bero på skillnader mellan arterna. Det skulle också kunna bero på den säsongsmässiga storleksförändringen av testiklarna som ses hos hanvargar och som g r att testikelvikten  r lägre under april – november. Denna faktor skulle kunna elimineras om endast vargar som dött under december – mars användes i studien, dock skulle det innebära att många individer skulle behöva uteslutas och underlaget för statistiken skulle bli mindre. Att testikelvolymen i denna studie uppvisade en signifikant skillnad mellan fertila och infertila individer kan ligga till grund för att individuella vargars testikelvolym i framtiden kan beräknas och användas som ett mått på fertilitet. Detta skulle då kunna göras in vivo på levande vargar för att uppskatta reproduktionspotentialen i en population.

Inavel

Medelvärdet på inavelsgraden för alla vargar i studien låg på 0,257 vilket är strax över värdet på 0,228 som har setts hos vargpopulationen  r 2016 och 2017. Detta stämmer överens med de data som rapporterats gällande inavelsgraden på vargar i Skandinavien de senaste åren (Liberg *et al.*, 2005; Bensch *et al.*, 2006; Åkesson & Svensson, 2018). En inavelskoefficient på 0,25 motsvarar samma inavelsgrad som en avkomma från en parning mellan helsyskon. Det relativt höga värdet på inavelskoefficienten f r vargpopulationen i Skandinavien anses bero på att hela populationen härstammar från endast ett fåtal individer (Liberg *et al.*, 2005; Bensch *et al.*, 2006). Inavelskoefficienterna som använts i denna studie  r beräknad utifrån släktträdet över vargarna i Skandinavien. En studie har visat att dessa inavelskoefficienter troligtvis är falskt

låga då de bygger på antagandet att grundarna till populationen var obesläktade, något som studien visade vara felaktigt (Kardos *et al.*, 2018).

Inget samband som var statistiskt signifikant kunde ses vid jämförelse mellan gonadosomatiskt index och inavelskoefficient ($p = 0,416$), och inte heller vid jämförelse mellan testikelvikt och inavelskoefficient ($p = 0,056$). Ett statistiskt signifikant samband kunde ses vid jämförelse mellan kroppsvikt och inavelskoefficient ($p = 0,009$), vilket tyder på att kroppsvikten till viss del påverkas av inavelskoefficienten. Korrelationen mellan dessa var negativ, vilket innebär att vargar med en högre inavelskoefficient har en lägre kroppsvikt, vilket även setts i en tidigare studie på varg (Fredrickson & Hedrick, 2002). Korrelationen mellan dessa parametrar var dock svag ($r = -0,243$) vilket tyder på att skillnader i kroppsvikt mellan vargar endast delvis kan förklaras av inavelskoefficienten.

Inavelsdepression anses påverka reproduktionsförmågan negativt (Griffiths *et al.*, 2012; Kardos *et al.*, 2018). I denna studie kunde inget signifikant samband ses mellan inavelskoefficient och fertilitet. Vid jämförelse mellan medelvärdet på inavelskoefficienten mellan individer ≥ 1 år som bedömts som fertila, infertila och de med okänd fertilitetsstatus sågs ingen signifikant ($p > 0,05$) skillnad. Detta visar att förekomst av spermier i bitestikelsvansen hos svenska hanvargar inte nämnvärt påverkas av inavelskoefficienten. För att kunna reproducera spelar dock även andra faktorer in, och baserat på materialet som undersökts i denna studie har inte spermernas morfologi, motilitet eller mängden spermier kunnat bedömas. Det har visats i en tidigare studie på varg att en hög inavelskoefficient korrelerar med en sämre spermiekvalitet (Fredrickson *et al.*, 2007). Detta har inte kunnat utvärderas i den aktuella studien och kan självklart påverka vargarnas reproduktionsförmåga negativt.

Kryptorkism och avvikande viktskillnad mellan testiklarna

Åtta individer i studien hade avvikande viktskillnad mellan höger och vänster testikel. Fyra av dessa (individ 1, 4, 7 och 8 i tabell 4, tabell 5 och figur 17) stod noterade som kryptorkida i tillgängliga data men det stod ej specificerat om det rörde sig om unilateral eller bilateral kryptorkism, samt om testiklarna var placerade i buken eller i inguinalkanalen. Dock hade alla dessa individer förutom individ 7 spermier i bitestikelsvansen, och detta tolkades som att individ 1, 4 och 8 var unilateralt kryptorkida med en spermieproducerande testikel i scrotum. Huruvida individ 7 var unilateralt eller bilateralt kryptorkid är oklart men inga spermier återfanns i de histologiska snitten och individen bedömdes som infertil. Sannolikt hade dessa vargar unilateral testikelhypoplasi men diagnos kunde inte ställas på det tillgängliga materialet då det inte var färskt vid fixering.

Ytterligare sex individer stod noterade som kryptorkida i tillgängliga data men dessa hade ingen avvikande viktskillnad mellan testiklarna. För ingen individ stod det specificerat om testiklarna var placerade i buken eller i inguinalkanalen. Två av dessa (individ 9 och individ 6 i tabell 5) stod som bilateralt kryptorkida, hos övriga stod det inte specificerat om kryptorkismen var unilateral eller bilateral. Individ 9 och individ 6 hade dock testiklar med en normal vikt för deras ålder (baserat på resultaten i denna studie) och spermier fanns lagrade i bitestikeln. Båda dessa individer tolkades därför som fertila och denna notis om bilateral kryptorkism tolkades därför som ett eventuellt misstag och båda dessa vargar inkluderades i studien. Tre av

individerna som hade noterats som kryptorkida (individ 2, 3 och 5 i tabell 5) hade åldersbestämts eller fått en uppskattad ålder på upp till eller lika med ett år. De hade ingen avvikande viktskillnad mellan testiklarna och ansågs ej vara könsmogna än baserat på den histologiska bedömningen. Dock är det möjligt att de var kryptorkida, antingen unilateralt där testikeln i *scrotum* inte hade ökat i vikt ännu då individerna inte nått ålder för könsmognad än, eller bilateralt kryptorkid. Eftersom ingen avvikande viktskillnad kunde ses mellan testiklarna hos dessa individer är det troligt att den/de drabbade testikeln/testiklarna var placerade i inguinalkanalen. För en annan av dessa individer (individ 10) fanns endast en testikel sparad. Eftersom denna testikel hade en fullt normal storlek och vikt och spermier tydligt kunde ses i bitestikeln tolkades detta som att den hade varit unilateralt kryptorkid och testikeln som sparats var den som hade legat i *scrotum*.

Inavelskoefficienten för de kryptorkida vargarna låg något högre än medelvärdet för alla vargarna men var inte de högsta värdena i studien. Ingen signifikant skillnad visades mellan medelvärdet på inavelskoefficienten mellan kryptorkida individer och icke kryptorkida individer. Dock var det endast 10 kryptorkida individer i studien och därför kan inga slutsatser dras gällande om inavelskoefficienten har ett samband med kryptorkism. Hundar med bilateral kryptorkism har visats ha generellt högre inavelskoefficient än hundar med unilateralt kryptorkism (Cox *et al.*, 1978; Hayes *et al.*, 1985; Romagnoli, 1991). Eftersom endast 10 kryptorkida vargar ingick i den aktuella studien, varav sex av dessa bedömdes som fertila och därmed tolkades som unilateralt kryptorkida, och tre individer var åldersbestämda till ≤ 1 år och eventuellt inte blivit könsmogna ännu, kunde inget samband mellan bilateral kryptorkism och inavelskoefficient undersökas i denna studie.

En hypotes fanns att eftersom kryptorkism har setts vara ärftligt hos hund kunde detta även gälla varg, och därför är även länet vargarna dog i med i tabell 4. Dalarnas län var länet där individ 1, 4, 7 och 8 sköts, och individ 6 hittades på gränsen mellan Dalarnas län och Värmlands län. Värt att notera är att individ 1, 4, 7 och 8 var de individer med avvikande viktskillnad mellan testiklarna som även stod noterade som kryptorkida. Länet som vargarna dog i har endast tagits med för de 14 vargarna med en avvikande viktskillnad mellan testiklarna och/eller kryptorkism. För resterande vargar i studien har inte data gällande området de hittades i använts och inga data på hur många vargar som dog i vilka län har gjorts i denna studie. Eftersom vargarna lämnar sin föräldraflock när de är ca 10 – 15 månader gamla är det även oklart hur stor betydelse länet de dog i hade för att undersöka om de föddes i samma region. En mer ingående studie av släktträdet över vargpopulationen som SKANDULV har upprättat skulle krävas för att identifiera om någon av dessa kryptorkida vargar var släkt med varandra och huruvida detta är ärftligt inom den skandinaviska vargpopulationen.

KONKLUSION

Syftet med studien var att beskriva reproduktionspotentialen hos svenska hanvargar och att korrelera detta till inavelskoefficient. Studien visar resultat om svenska hanvargars reproduktionspotential som tidigare inte har publicerats. Säsongsvariation har i denna studie setts påverka testikelvikt, testikelvolym och gonadosomatiskt index signifikant, där dessa parametrar är som störst under december – mars för att sedan minska under de övriga månaderna på året. Detta är viktigt att ta hänsyn till vid studier gällande testikelstorlek hos varg.

Ålder för könsmognad hos hanvargar har i denna studie setts ske tidigare än ett års ålder för en del individer, och vid ett års ålder var nästan alla vargar könsmogna. Detta stämmer överens med litteraturen som visat att hanvargar kan para och göra en tik dräktig innan ett års ålder, men att de i det vilda parar först efter 20 månaders ålder när de funnit en tik i löp som inte redan hör ihop med en alfahane. Testikelvolymens har i denna studie uppvisat en signifikant skillnad mellan fertila och infertila individer, med de största värdena för de fertila. Detta kan ligga till grund för att individuella vargars testikelvolym i framtiden kan beräknas och användas som ett mått på fertilitet. Detta skulle då kunna göras in vivo på levande vargar för att uppskatta reproduktionspotentialen i en population. Inavelskoefficient har inte uppvisat någon signifikant korrelation med testikelstorlek eller gonadosomatiskt index i denna studie, däremot sågs en statistiskt signifikant negativ korrelation med kroppsvikten, dock en relativt svag sådan. Korrelation mellan inavelskoefficient och spermiemorfologi eller spermiekvalitet har inte kunnat undersökas baserat på materialet i denna studie. Inga slutsatser har kunnat dras gällande huruvida hög inavelskoefficient korrelerar med kryptorkism. De faktiska släktskapen mellan vargarna har inte studerats och därmed har inga eventuella samband kunnat fastställas gällande ärftlighet av kryptorkism inom den svenska vargpopulationen.

Baserat på materialet som undersökts i denna studie är reproduktionspotentialen hos hanvargar i Sverige god.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Vargpopulationen i Skandinavien är en gemensam vargstam i Sverige och Norge, där en del flockar har revir enbart i Sverige, enbart i Norge eller revir som överlappar landsgränserna. År 1960 uppskattades att endast 10 vargar fanns i Skandinavien och vargpopulationen räknades som i praktiken utrotad år 1966. Vargpopulationen återhämtade sig med hjälp av invandrande vargar från den finsk-ryska vargstammen och mer än 400 vargar finns nu i Skandinavien. Syftet med denna studie var att undersöka de svenska hanvargarnas reproduktionspotential genom att undersöka testiklar och bitestiklar från varg som insamlats av Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) från år 2003 till 2018, och se om det finns ett samband mellan testikelstorlek och grad av inavel.

Vargtikar löper endast en gång per år, vilket här i Sverige är i slutet på februari till början på mars. Vargtiken lever i ett livslångt parförhållande med varghanen och de kan tillsammans få 40 – 60 valpar under sin livstid. En vargflock består ofta av ett vargpar, en alfahane och en alfahona, och deras ungar. Dödligheten hos vargarna i Skandinavien beror i huvudsak på avsiktligt dödande genom licensjakt, skyddsjakt eller olaglig jakt, men även andra dödsorsaker såsom trafikolyckor, övriga olyckor och sjukdom förekommer. Alla vargar som hittats döda eller dödas i Sverige skickas till SVA för obduktion. Graden av inavel beräknas av det skandinaviska forskningsprojektet SKANDULV med hjälp av DNA som tas från vargarna antingen vid obduktion, vid infångst av levande djur eller som funnits i naturen i form av blod, päls, urin eller avföring. Bestämning av ålder på varg kan ske antingen genom att analysera tänderna eller, som har gjorts i Skandinavien, genom att bygga upp ett släkträd för alla vargar i populationen och därmed avgöra vilka föräldrar en individ har och vilken årskull individen föddes.

Inga studier som beskriver hanvargars reproduktionsorgans anatomi har hittats, men eftersom varg och hund är nära besläktade kan de antas ha samma anatomi i detta avseende. Hanens reproduktionsorgan består av testiklar, bitestiklar, sädesledaren, urinröret, den accessoriska könskörteln prostata och penis. Spermieproduktionen sker i testiklarna. Testiklarna har normalt en halvelastisk konsistens och mjuka testiklar kan tyda på nedsatt spermieproduktion. Bitestikeln kan delas in i bitestikelhuvud, bitestikelkropp och bitestikelsvans. Spermier mognar när de transporteras genom bitestikeln, vilket tar ca 1 – 2 veckor, och lagras sedan i bitestikelsvansen innan ejakulation sker. Vid ejakulation transporteras spermier från bitestikelsvansen ut i sädesledaren och vidare till urinröret (*uretra*). Testiklarna hos hund bildas i buken och behöver flytta sig ned till pungen genom inguinalkanalen för att produktionen av spermier ska kunna ske normalt. Hos hund sker detta vanligen vid ca tre till fyra dagars ålder. Vid sex månaders ålder har inguinalkanalen ofta minskat i storlek så pass mycket att testiklarna inte längre kan passera igenom den. Om en eller båda testiklarna är kvar i buken eller i inguinalkanalen vid sex månaders ålder benämns individen enkelsidigt (om en testikel är i pungen) eller dubbelsidigt (om ingen testikel är i pungen) kryptorkid. Kryptorkism anses vara genetiskt och kryptorkida individer bör därför ej avlas på. Under puberteten utvecklas könsorganen och testiklarna växer till och blir större. Åldern då en hanhund blir könsmogen, dvs har spermier i ejakulat, varierar mellan 5 och 12 månaders ålder. Honvarg i det vilda blir könsmogen senare än hund enligt flera studier, där det har setts att åldern då en honvarg löper för första gången var vid 22 månaders ålder. I en studie har det setts att en hanvarg på 10

månader parade sig med en vargtik vilket ledde till dräktighet, men dessa vargar hölls i fångenskap. Vargar lämnar sina föräldrars flock när det är ca 10 – 15 månader gamla och söker en partner. Oftast har de hittat en partner och startat en egen flock vid ca 20 månaders ålder. Det innebär att parning sker vid nästa parningssäsong, vilket ofta är vid 22 månaders ålder. Ingen tidigare studie som har undersökt vid vilken ålder spermier kan ses i ejakulat från varg har gjorts i Sverige. Testiklarna hos hanvargar har setts variera i storlek med säsong, där den största storleken uppnås vid parningssäsongen.

Testiklar och bitestiklar från 221 vargar undersöktes i denna studie. Alla testiklar hade förvarats frysta på SVA sedan obduktion och organen tinades innan undersökning. Testiklar och bitestiklar separerades från varandra och undersöktes med avseende på mått och vikt. Biopsier togs från testiklar och bitestiklar och fixerades i formalin innan de preparerades, snittades och färgades med Hematoxylin- och eosinfärgning och limmades fast på glas. Biopsier togs främst på höger testikel och bitestikel, men togs även på vänster sidas organ i de fall det var en stor storleksskillnad mellan vänster och höger testikel, eller då höger sidas organ bedömdes för ruttna. De färdiga snitten undersöktes sedan i mikroskop för att bedöma om spermier kunde ses i testikeln eller bitestikeln. Individer där spermier kunde ses bedömdes som fertila och de individer där inga spermier kunde ses bedömdes som infertila. Data gällande vargarna, inklusive ID, datum för obduktion, kroppsvikt, ålder, dödsorsak, inavelsgrad och speciella fynd från obduktionen, insamlades från SVA:s journalsystem och SKANDULV:s databas. Åldrarna som användes i studien var framtagna både med analys av tänder och genom föräldraskapsbestämning.

Detta är den första svenska studie där testiklar från varg har undersökts för att bedöma reproduktionsförmågan. Det är även den första studien där förekomst av spermier i bitestikelsvansen har använts som ett mått på könsmodnhet hos hanvarg. 212 av de 221 individer som undersöktes inkluderades i studien. Av dessa hade åtta individer en onormal viktskillnad mellan höger och vänster testikel. Fyra av dessa individer samt sex andra individer från studien (som inte hade en onormal viktskillnad mellan testiklarna) var kryptorkida. Av de vargar som ingick i studien bedömdes 145 vara fertila, 51 infertila och hos 16 individer kunde fertilitet med säkerhet inte bedömas. Testikelvikten sågs ha ett positivt samband med kroppsvikten, vilket innebär att en högre kroppsvikt ger en högre testikelvikt hos vargarna. Testikelvikten sågs också ha ett starkt positivt samband med testikelvolymen, vilket även setts i studier på andra djurslag. Månaden som vargarna dog användes för att undersöka om en säsongsvariation kunde ses på testikelstorlek hos varg. Säsongen visades i denna studie påverka både testikelvikt och testikelvolym signifikant, där det största värdet på båda dessa parametrar sågs vid december – mars. Testikelvikt och testikelvolym minskade efter mars och låg lågt för att stiga igen i november – december. Vid ett års ålder var nästan alla vargar i studien könsmodna, och en del av vargarna blev könsmodna även innan de nått ett års ålder. Detta fynd stämmer överens med vad som tidigare visats på två vargar i fångenskap. Under vilda förhållanden parar sig varghanarna dock troligtvis först efter 20 månaders ålder då de lämnat sina föräldrars flock och funnit en vargtik i lopp som inte är i ett parförhållande med en annan alfahane. Testikelvolymen visades vara störst hos fertila individer och det fanns ett tydligt samband mellan högre testikelvolym och fertilitet. Detta kan ligga till grund för att individuella vargars testikelvolym

i framtiden ska kunna beräknas och användas som ett mått på fertilitet. Detta skulle då kunna göras på levande vargar för att uppskatta reproduktionspotentialen i en population.

Inget samband kunde ses mellan graden av inavel och testikelvikt, men däremot kunde ett svagt negativt samband ses mellan graden av inavel och kroppsvikt. Detta innebär att individer med en hög inavelsgrad hade en något lägre kroppsvikt än individer med en låg inavelsgrad. Denna korrelation var dock svag och detta tyder på att skillnaden mellan kroppsvikter hos vargar endast delvis kan förklaras med en högre inavelsgrad. I denna studie har inte spermernas funktionsduglighet eller mängden spermier kunnat bedömas eftersom materialet då behöver vara väldigt färskt vid undersökning och fixering. I en studie på varg har det visats att vargarnas spermiekvalitet försämras med ökande inavelsgrad. Det är därför möjligt att vargarnas reproduktionsförmåga påverkas negativt av en hög inavelsgrad trots att det inte visats på materialet som undersökts i denna studie. Vargarna som var kryptorkida kunde ses ha en något högre inavelsgrad än medelvärdet för alla vargarna i studien men det var inte den högsta inavelsgraden som sågs i studien. Inga slutsatser kunde därför dras om huruvida en hög inavelsgrad har ett samband med kryptorkism.

Baserat på materialet som undersökts i denna studie är reproduktionspotentialen hos hanvargar i Sverige god.

TACK

Ett stort tack till mina handledare Anne-Marie Dalin, Eva Axnér, Erik Ågren och Mikael Åkesson, som hjälpt till genom hela arbetets gång med att korrekturläsa, svara på frågor och dela med sig av kunskap och tips. Jag vill även rikta ett stort tack till SVA och SKANDULV, som båda två ställt upp med material och möjliggjort denna studie. Till Cecilia Petersen, som har stöttat, korrekturläst och svarat på frågor på sena kvällar, vill jag också rikta ett stort tack. Jag vill även tacka Harry Heath för kontinuerligt stöd genom hela arbetets gång och för att han tålmodigt lyssnat varje gång jag delat med mig av min nyfunna kunskap gällande vargtestiklar.

REFERENSER

- Aronson, Å., Sand, H. (2004). Om vargens utveckling i Skandinavien under de senaste 30 åren. *Skogsvilt III*, ss. 47-53.
- Axnér, E. (2010). *Kompendium – Reproduktion hos hund*. SLU, institutionen för kliniska vetenskaper, ss. 4.
- Axnér, E., Uhlhorn, H., Ågren, E., Mörner, T. (2009). Reproductive maturation in the male Eurasian lynx (*Lynx lynx*): a study on 55 reproductive organs collected from carcasses during 2002-2005. *Reproduction in Domestic Animals*, Vol 44 (3), ss 467-473. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01130.x>
- Bacha, W.J., Bacha, L.M. (2012). *Color atlas of veterinary histology*. 3rd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, ss. 225-231.
- Bensch, S., Andrén, H., Hansson, B., Pedersen, H-C., Sand, H., Sejberg, D., Wabakken, P., Åkesson, M., Liberg, O. (2006). Selection for heterozygosity gives hope to a wild population of inbred wolves. *PLoS ONE*, Vol 1 (1), ss. 1-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000072>
- Cederlund, E. (2017). *Reproduktion hos vargtikar (Canis lupus) i Sverige*. Sveriges Lantbruksuniversitet. Institutionen för kliniska vetenskaper/veterinärprogrammet (Examensarbete 2017:81).
- Chapron, G., Wikenros, C., Liberg, O., Wabakken, P., Flagstad, Ø., Milleret, C., Månsson, J., Svensson, L., Zimmermann, B., Åkesson, M., Sand, H. (2016). Estimating wolf (*Canis lupus*) population size from number of packs and an individual based model. *Ecological Modelling*, Vol 339, ss. 33-44. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2016.08.012>
- Cox, V. A., Wallace, L. J., Jessen, C. R. (1978). An anatomic and genetic study of canine cryptorchidism. *Teratology*, Vol 18 (2), ss. 233-240. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/tera.1420180208>
- Dahl, J. (2017). *Gonadosomatiskt index hos hanhundar – samband mellan testikelstorlek och spermiemorfologi*. Sveriges Lantbruksuniversitet. Institutionen för kliniska vetenskaper/veterinärprogrammet (Examensarbete 2017:19).
- Fredrickson, R., Hedrick, P. (2002). Body size in endangered Mexican wolves: effects of inbreeding and cross-lineage matings. *Animal Conservation*, Vol 5 (1), ss. 39-43. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S1367943002001051>
- Fredrickson, R. J., Siminski, P., Woolf, M., Hedrick, P. W. (2007). Genetic rescue and inbreeding depression in Mexican wolves. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol 274 (1623), ss. 2365-2371. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2007.0785>
- Geiger, M., Gendron, K., Willmitzer, F., Sánchez-Villagra, M. R. (2016). Unaltered sequence of dental, skeletal, and sexual maturity in domestic dogs compared to the wolf. *Zoological Letters*, Vol 2 (1). DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s40851-016-0055-2>
- Gipson, P. S., Ballard, W. B., Nowak, R. M., Mech, L. D. (2000). Accuracy and precision of estimating age of gray wolves by tooth wear. *The Journal of Wildlife Management*, Vol 64 (3), ss. 752-758. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/3802745>
- Goodwin, E. A., Ballard, W. B. (1985). Use of tooth cementum for age determination of gray wolves. *The Journal for Wildlife Management*, Vol 49 (2), ss. 313-316. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/3801522>

- Gouletsoy, P., Galatos, A. D., Leontides, L. S. (2008). Comparison between ultrasonographic and caliper measurements of testicular volume in the dog. *Animal Reproduction Science*, Vol 108 (1-2), ss. 1-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.020>
- Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Carroll, S. B., Doebley, J. (2012). *Introduction to Genetic Analysis*. 10th ed. New York & Basingstoke: W. H. Freeman and Company, ss. 32 & 622-627.
- Hayes, H. M., Wilson, G. P., Pendergrass, T. W., Cox, V. S. (1985). Canine cryptorchism and subsequent testicular neoplasia: case control study with epidemiologic update. *Teratology*, Vol 32 (1), ss. 51-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/tera.1420320108>
- Kardos, M., Åkesson, M., Fountain, T., Flagstad, Ø., Liber, O., Olason, P., Sand, H., Wabakken, P., Wikenros., Ellegren, H. (2018). Genomic consequences of intensive inbreeding in an isolated wolf population. *Nature Ecology & Evolution*, Vol 2 (1), ss. 124-131. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41559-017-0375-4>
- Kawakami, E., Tsutsui, T., Ogasa, A. (1991). Histological observations of the reproductive organs of the male dog from birth to sexual maturity. *Journal of Veterinary Medical Science*, Vol 53 (2), ss. 241-248. DOI: <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.53.241>
- Kenagy, G. J., Trombulak, S. C. (1986). Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalogy*, Vol 67 (1), ss. 1-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/1380997>
- Khan, F. A., Gartley, C. J., Khanam, A. (2018). Canine cryptorchidism: an update. *Reproduction in Domestic Animals*, ss. 1-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/rda.13231>
- Kothari, L. K., Srivastava, K. K., Mishra, P., Patni, M. K. (1972). Total Leydig cell volume and its estimation in dogs and in models of testis. *The Anatomical Record*, Vol 174 (2), ss. 259-264. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ar.1091740210>
- König, H. E., Liebich H-G. (2009). *Veterinary anatomy of domestic mammals*. 4th Ed. Stuttgart: Schattauer, ss. 407-417.
- Laikre, L., Ryman, N. (1991). Inbreeding depression in a captive wolf (*Canis lupus*) population. *Conservation Biology*, Vol 5 (1), ss. 33-40. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1739.1991.tb00385.x>
- Landon, D. B., Waite, C. A., Peterson, R. O., Mech, L. D. (1998). Evaluation of age determination techniques for gray wolves. *The Journal of Wildlife Management*, Vol 62 (2), ss. 674-682. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/3802343>
- Liberg, O., Andrén, H., Pedersen, H-C., Sand, H., Sejberg, D., Wabakken, P., Åkesson, M., Bensch, S. (2005). Severe inbreeding depression in a wild wolf (*Canis lupus*) population. *Biology Letters*, Vol 1 (1), ss. 17-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2004.0266>
- Mech, L. D. (1999). Alpha status, dominance, and division of labor in wolf packs. *Canadian Journal of Zoology*, Vol 77, ss. 1196-1203.
- Mech, L. D. (2002). Breeding season of wolves, *Canis lupus*, in relation to latitude. *Canadian Field Naturalist*, Vol 116 (1), ss. 139-140.
- Mech, L. D. (2006). Age-related body mass and reproductive measurements of gray wolves in Minnesota. *Journal of Mammalogy*, Vol 87 (1), ss. 80-84. DOI: <http://dx.doi.org/10.1644/05-MAMM-F-212R1.1>
- Medjo, D. C., Mech, L. D. (1976). Reproductive activity in nine- and ten-month-old wolves. *Journal of Mammalogy*, Vol 57 (2), ss. 406-408. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/1379708>

- Olar, T. T., Amann, R. P., Pickett, B. W. (1983). Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog. *Biology of Reproduction*, Vol 29 (5), ss 1114-1120. DOI: <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod29.5.1114>
- Rausch, R. A. (1967). Some aspects of the population ecology of wolves, Alaska. *American Zoologist*, Vol 7 (2), ss. 253-265. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/icb/7.2.253>
- Romagnoli, S. E. (1991). Canine cryptorchidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, Vol 21 (3), ss. 533-544. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(91\)50059-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50059-0)
- Räikkönen, J., Vucetich, J. A., Vucetich, L. M., Peterson, R. O., Nelson, M. P., Hansson, B. (2013). What the inbred Scandinavian wolf population tells us about the nature of conservation. *PLoS ONE*, Vol 8 (6), ss. 1-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067218>
- Sand, H., Liberg, O., Flagstad, Ö., Wabakken, P., Åkesson, M., Karlsson, J., Ahlqvist, P. (2014). Den skandinaviska vargen, en sammanställning av kunskapsläget 1998-2014 från det skandinaviska forskningsprojektet SKANDULV, Grimsö forskningsstation, SLU. Rapport till Direktoratet for Naturforvaltning, Trondheim, Norge.
- Santos, M., Marcos, R., Caniatti, M. (2010). Cytologic study of normal canine testis. *Theriogenology*, Vol 73 (2), ss. 208-214. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.030>
- Schmidt, K., Jedrzejewski, W., Theuerkauf, J., Kowalczyk, R., Okarma, H., Jedrzejewska, B. (2008). Reproductive behaviour of wild-living wolves in Bialowieza Primeval forest (Poland). *Journal of Ethology*, Vol 26 (1), ss. 69-70. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10164-006-0031-y>
- Seal, U. S., Plotka, E. D., Packard, J. M., Mech, L. D. (1979). Endocrine correlates of reproduction in the wolf. I. Serum progesterone, estradiol and LH during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, Vol 21 (5), ss. 1057-1066. DOI: <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod21.5.1057>
- Sjaastad, Ø. V., Sand, O., Hove, K. (2010). *Physiology of Domestic Animals*. 2nd Ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press, ss. 684-701.
- Spörndly-Nees, E., Ekstedt, E., Magnusson, U., Fakhrzadeh, A., Luengo Hendriks, C. L., Holm, L. (2015). Effect of pre-fixation delay and freezing on mink testicular endpoints for environmental research. *PLoS ONE*, Vol 10 (5), ss. 1-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0125139>
- Svensson, L., Wabakken, P., Maartmann, E., Åkesson, M., Flagstad, Ø. (2017). *Inventering av varg vintern 2016-2017*. Viltskadecenter, institutionen för ekologi, Sveriges Lantbruksuniversitet, ss. 1-49.
- Tsutsui, T., Tsuji, J., Kawakami, E., Yamada, Y., Amano, T., Yamauchi, M. (1987). Peripheral plasma androgen levels in the male dog from birth to sexual maturity. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, Vol 49 (1), ss. 177-179. DOI: <http://dx.doi.org/10.1292/jvms1939.49.177>
- Wabakken, P., Sand, H., Liberg, O., Björvall, A. (2001). The recovery, distribution, and population dynamics of wolves in the Scandinavian peninsula, 1978-1998. *Canadian Journal of Zoology*, Vol 79 (4), ss. 710-725. DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/cjz-79-4-710>
- Wabakken, P., Svensson, L., Maartmann, E., Åkesson, M., Flagstad, Ø. (2018). *Bestandsövervakning av ulv vintern 2017-2018*. Viltskadecenter, Sveriges Lantbruksuniversitet, ss. 1-54.
- Woodall, P. F., Johnstone, I. P. (1988a). Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in domestic dog (*Canis familiaris*). *Journals of Reproduction and Fertility*, Vol 82 (2), ss. 603-609. DOI: <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0820603>

- Woodall, P. F., Johnstone, I. P. (1988b). Scrotal width as an index of testicular size in dogs and its relationship to body size. *Journal of Small Animal Practice*, Vol 29 (8), ss. 543-547. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-5827.1988.tb02306.x>
- Åkesson, M., Danielsson, A., Hedmark, E., Öhrn, F. (2018). *Teknisk rapport över genetiska analyser på varg i Sverige år 2017*. Grimsö forskningsstation: institutionen för ekologi, Sveriges Lantbruksuniversitet, ss. 1-194.
- Åkesson, M., Liberg, O., Sand, H., Wabakken, P., Bensch, S., Flagstad, Ø. (2016). Genetic rescue in a severely inbred wolf population. *Molecular Ecology*, Vol 25 (19), ss. 4745-4756. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/mec.13797>
- Åkesson, M., Svensson, L. (2018). *Sammanställning av släkträdet över den skandinaviska vargpopulationen fram till 2017*. Viltskadecenter, institutionen för ekologi, Sveriges Lantbruksuniversitet, ss. 1-13.