

# Çiftlik Hayvanlarında Cinsiyetin Denetimi

# Cinsiyetin belirlenmesi

- Demokritus (MÖ: 470-402)
- Sağ testisten erkek, sol testisten dişi yavruların dünyaya geldiğini ileri sürmüştür.



# Fötal yaşamda cinsiyetin teşhisi

- Ultrasonografi cihazıyla yapılabilen bir teşhistir.
- Fötusta genital çıkıntının pozisyonuna göre cinsiyet tayin edilebilir.
- Gebeliğin 60-80. günlerinde % 99 isabetle cinsiyet tahmin edilebilir.



# Embriyoda cinsiyet tayin

- Günümüze kadar 5 farklı prensip ile cinsiyetin embriyoda erken tahmini yapılmıştır:
- 1. Sitogenetik yöntem ile embriyonik cinsiyetin belirlenmesi,
- 2. Immunolojik yöntemle embriyonik cinsiyetin belirlenmesi (HY antijeninin belirlenmesi),
- 3. X kromozomuna bağlı enzim aktivasyonlarını saptayarak embriyonik cinsiyetin belirlenmesi,
- 4. Embriyonik gelişim dönemine göre embriyonik cinsiyetin belirlenmesi (erkek ve dişi embriyolar arasındaki metabolik aktivite farklılıklarının saptanması),
- 5. Y kromozomuna özel DNA zincirlerinin kullanılmasıyla embriyonik cinsiyetin belirlenmesi.

# Bovine Sperm Chromosomes

X-Sperm

30



Y-Sperm

30



- Tavşanlarda inaktif X kromozomu olan Barr cisimciği görüntülenerek yapılabilir.
- 10-15 günlük sığır embriyolarında trofoblast hücre biyopsisi ile teşhis
- 6-7 günlük sığır embriyosunda biyopsi ile sitogenetik teşhis (başarı % 60'ın biraz üzerinde)
- Mikro manipülasyonla 6-7 günlük yaştaki embriyoyu bölüp bir yarısında sitogenetik analiz. Biyopsi ile alınan parça kültüre konarak çoğaltılır. Başarı % 60 civarındadır.

# **Immunolojik Yöntemle Embriyonik Cinsiyetin Belirlenmesi (HY antijeninin belirlenmesi)**

- Cinsiyete spesifik antijenin immunolojik olarak ortaya konulması, embriyoda cinsiyetin belirlenmesine imkan tanır.
- Bu antijen farelerde erkekten alınan deri dokusu parçalarının dişiye nakledildiğinde dokunun reddedilmesi ile ilişkilendirilerek varlığı bulunmuştur.

- Erkek farede bu antijen Y kromozomu üzerinde bulunduğu için Histocompatibility-Y veya H-Y antijeni adı verilmiştir.
- Pek çok türün erkek embriyolarında bu antijenin varlığı immunofloresans ve sitolitik yöntemlerle saptanabilmektedir.



- Sitolitik yöntem: Embriyolar H-Y antiserum ve komplementi icerisine bırakılır. H-Y antijenini taşıyan erkek embriyoların gelişmeleri durur veya hucrelerinde erimeler oluşur.
- Bir bozukluk gözlenmeyen diğer embriyolar dişi olarak deęerlendirilir.
- Immunofloresans yöntemi: *Embriyoları antikorla muamele ardından özel floresan boylarla boyamak suretiyle ortaya çıkan renk değişikliği cinsiyet ayırımında kullanılır.*

## X Kromozomuna Bağlı Enzim Aktivasyonlarını Saptayarak Embriyonik Cinsiyetin Belirlenmesi

- Dişilerde, X-kromozomuna bağlı belirli enzimlerin hücre konsantrasyonu ile aktiviteleri erkeklerinkine göre iki kat fazla olmaktadır.
- Morula ve blastosist safhasında bulunan fare embriyolarında, X kromozomuna kodlanmış enzimlerin (Glukoz-6-fosfat-dehidrogenaz (G-6-PD), Hypoxanthinephosphoriboxyl Transferase) araştırılmasıdır.

# Y Kromozomuna Özel DNA Zincirlerinin Kullanılmasıyla Embriyonik Cinsiyetin Belirlenmesi

- Bu yöntemin esası Y-kromozomu üzerindeki komplementar yapı olan DNA-fragmentlerinin kullanılmasıdır.
- Erkek cinsiyete özel DNA problemlerinin kullanılmasıyla sığırlarda %100 doğruluk oranıyla cinsiyet saptanabilmektedir.
- Bu yöntem ile 6-7 günlük inek embriyolarında
- cinsiyet teşhisi için 3 aşamalı işlem yapılır:
  - Embriyodan hücre alınması (biyopsi),
  - Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR),
  - Spesifik PCR fragmentinin elektroforetik olarak belirlenmesi

- Biyopsi işlemi, embriyolardan 100-200 büyütme altında, mikromanuplasyon ile 1-10 adet blastomer alınmasını kapsar.

Biyopsi materyalinin alınmasından

cinsiyet teşhisine kadar 3-5 saat geçmektedir.

Bu durum embriyoların taze transferini mümkün kılar.

- Sığır, at, koyun, fare ve insan embriyolarında PCR kullanarak cinsiyeti saptamak mümkündür.
- Yine gebe hayvanlardan alınan kan örneklerinde de PCR tekniğiyle erkek yavruya ait genetik materyal ortaya konabilmektedir.

- PCR uygulamasından sonra DNA çözeltisi Agaroz jel içerisine aktarılarak elektroforez işlemine geçilir. Bu işlemle, aranan sekanslar diğer proteinlerden ayırt edilir.
- Yaklaşık 30-60 dakika sonra aranan gruplar saptanabilmektedir.
- Erkek embriyo belirli bir Y-kromozomun parçasına özel olan floresan band verir.

## Cinsiyeti Belirlenmiş Sperm

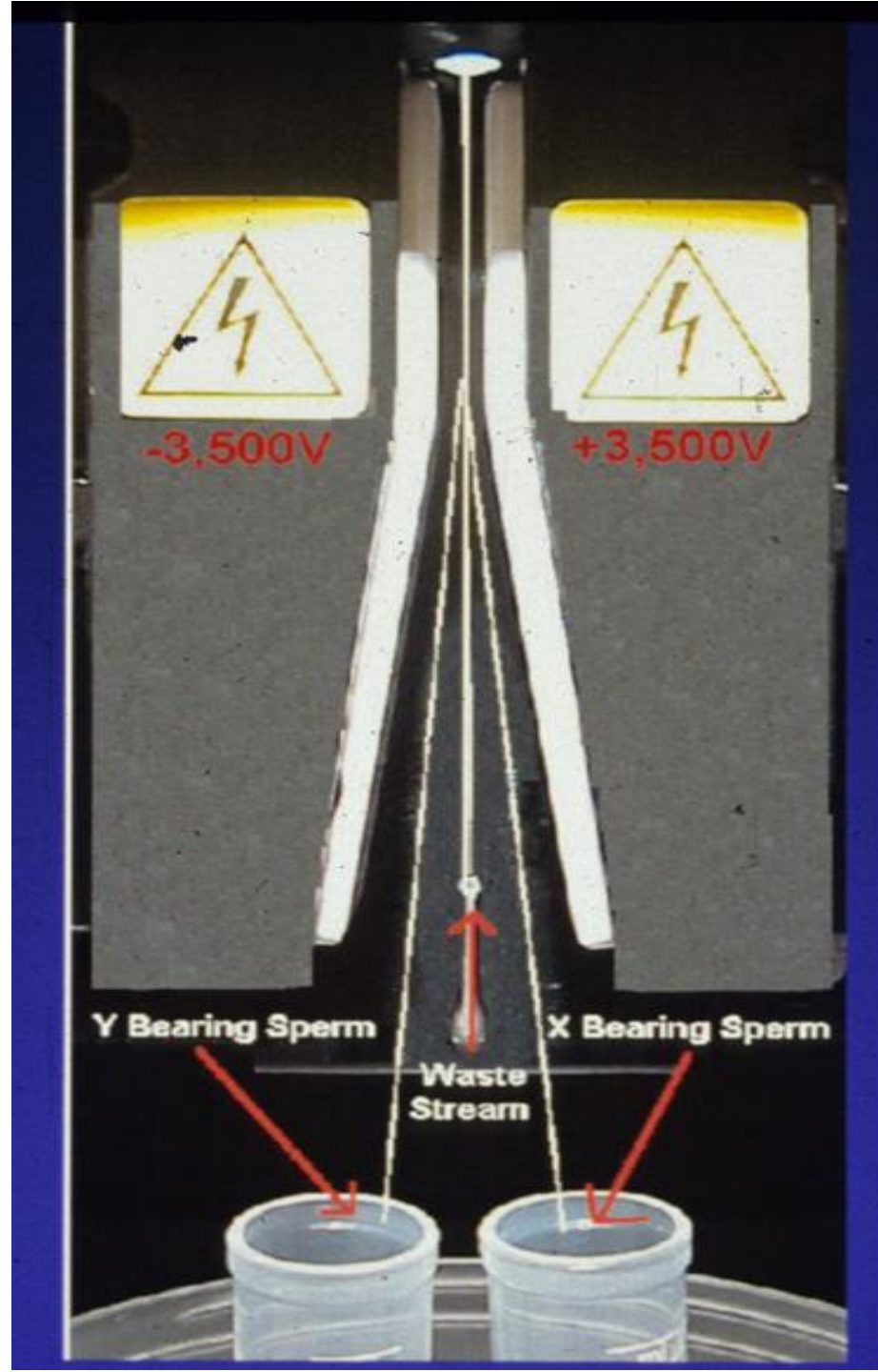
- Biyoteknolojik geliřmelerde geline son noktalardan biri de cinsiyeti belirlenmiş sperma üretimidir
- Fertilizasyon sırasında X kromozomu taşıyan ovum, X kromozomu taşıyan sperm ile birleşirse dişi (XX), Y kromozomu ile birleşirse erkek buzağı (XY) olacaktır.
- Tohumlama öncesi spermler X ve Y kromozomlarına göre ayrılır ise, bu spermler ile yapılan tohumlamalarda embriyoların cinsiyetleri de önceden belirlenmiş olacaktır.
- Santrifügasyon, elektroforez, sedimentasyon, filtrasyon, muhafaza mediumundaki pH değişiklikleri, immunolojik teknikler ve motilite kriterleri gibi yöntemler kullanılmaktadır.

- Ancak bu yöntemler ile elde edilen cinsiyeti belirlenmiş sperm oranları bakımından ciddi farklılıklar vardır. Bu tekniklerin pratikte kullanılmasının pek güvenilir olmadığı bildirilmiştir.
- Sperm hücrelerinde cinsiyetin belirlenmesi için günümüzde kullanılan en popüler ve en ileri teknik **Flow- Sitometri** yöntemidir.
- Bu yöntemle % 90 oranında arzu edilen cinsiyette yavru elde etmek mümkündür
- X ve Y kromozomlarını taşıyan spermlerin ayrılması esasına dayanmaktadır.

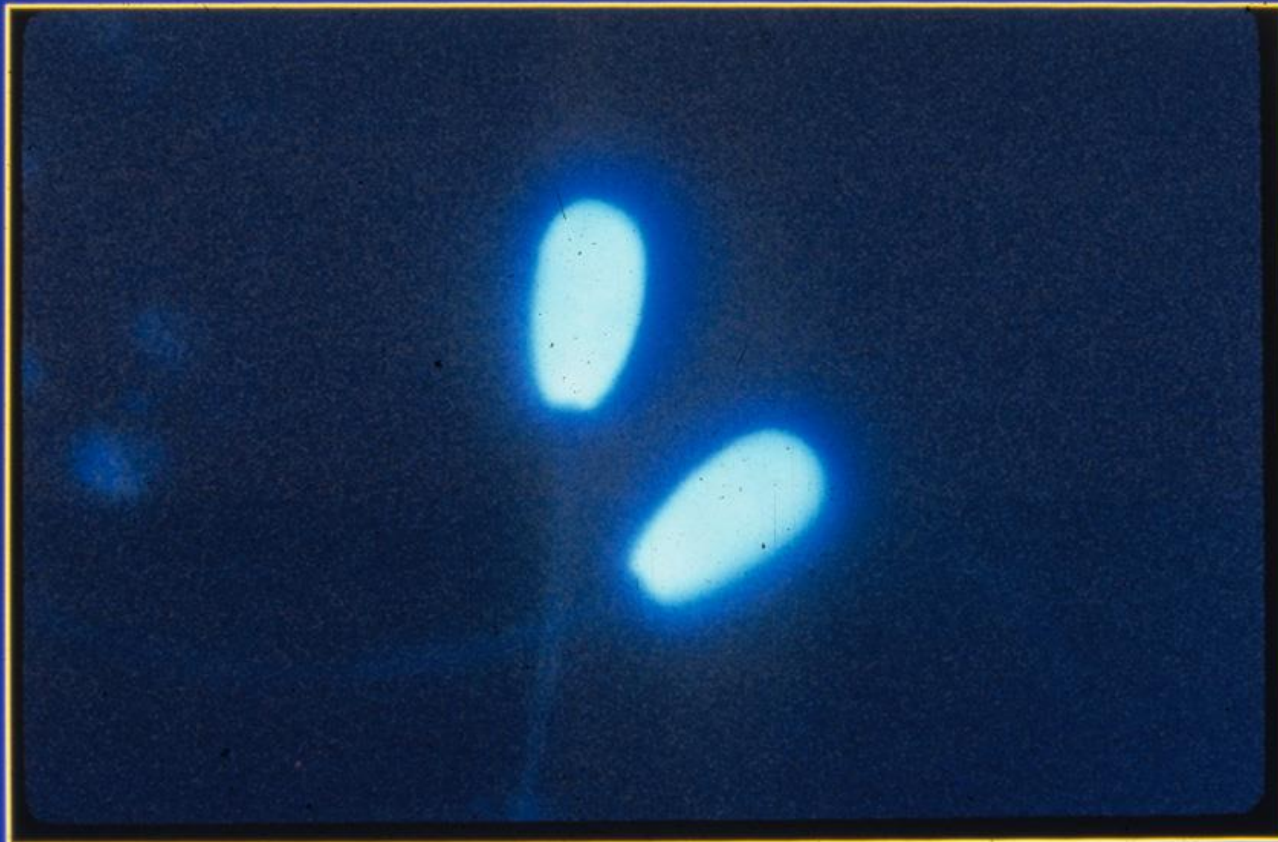


# Flow-Sitometri

- Yöntemin prensibi X kromozomu taşıyan spermin, Y kromozomu taşıyan spermden yaklaşık % 3-4 kadar daha fazla DNA taşımaya dayanmaktadır.
- Bu metotta DNA fluorochrome boya (HO33342) ile boyanmakta ve lazer ışığı altından geçirildiğinde daha çok DNA taşıyan X kromozomu, Y kromozomuna göre daha parlak renk vermektedir.
- Flow-Sitometri ile yapılan sınıflandırmada, başarı bir ölçüde işlem hızına bağlıdır. Sığır spermleri için ayırma hızı saniyede 3000 - 4000 canlı spermatozoit üretimi olarak belirlenmiştir.
- Sınıflandırma sırasında yavaş bir ayırım yapıldığında başarı oranı % 93, hızlı ayırmada ise başarı % 87'e inmektedir.
- Ayırma sonrası spermlerin % 20'sinin kaybedilebileceği dikkate alınmalıdır.



# HO33342 STAINED SPERM



- İşlem sırasında spermde şekilsel bozulmalar ve sperm sayısındaki azalmalar fertilitiyi azaltabilmektedir.
- Ayırma işlemi sırasında meydana gelen spermatozoa kayıpları nedeniyle tohumlamada kullanılan dozdaki spermatozoa sayısı daha azdır (2 milyon motil spermatozoa)
- Ayırma işlemi ile % 90 oranında doğacak buzağının cinsiyeti belirlenebilmektedir.

- Cinsiyete göre ayrılmış sperma ile yapılan tohumlamaların başarısı, ayrılmamış normal sperma ile yapılanın %80-90'ı kadardır, yani başarı daha düşüktür.
- ABD koşullarında cinsiyeti ayrılmış spermin doz fiyatı normal sperma dozuna oranla 20-25 USD daha pahalıdır.

- ABD'nin Wisconsin eyaletinde etçi sığır yetiştiricilerinin sürü yenileme amacıyla daha çok dişi sperma tercih ettiği görülmüştür.
- Erkek buzağı hedefleyenler ise pazara sunacağı kasaplık hayvan sayısını artırma beklentisiyle cinsiyeti ayrılmış sperma kullanmaktadır.



# Spermada cinsiyet ayırımında kullanılan cihaz

