



Farklı Dönemlerdeki *In Vivo* Üretilmiş Sığır Embriyolarında Cinsiyetin Dağılımının Belirlenmesi ve Cinsiyetin Bu Dağılıma Etkisinin Araştırılması

Tahir KARAŞAHİN¹, Muharrem SATILMIŞ¹, Sedat Hamdi KIZIL¹, Numan AKYOL²

¹ Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara-TÜRKİYE

² Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Kırıkkale-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışmanın konusu, farklı dönemlerdeki *in vivo* sığır embriyolarının cinsiyetlerinin non elektroforetik PCR yöntemi ile tespit edilerek, cinsiyet dağılımının ve bu dağılımın arasındaki farkların cinsiyetten etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesidir. Cinsiyet tayini amacıyla yedi günlük toplam 65 adet *in vivo* üretilmiş embriyo kullanıldı. Embriyo elde etmek için rutin süperovulasyon yöntemleri kullanıldı. Tohumlamalardan yedi gün sonra cerrahi olmayan yöntemle uterus yıkaması yapılarak embriyolar toplandı. Elde edilen embriyolar kalite değerlendirmesinin ardından cinsiyetleri tespit edildi. Embriyoların trophektoderm kısmından mikro manipülatöre bağlı mikro bıçak ile %10-30 oranında bir parça kesilerek biyopsi materyali alındı. Embriyodan biyopsi alma işlemi %20 FCS içeren D-PBS solüsyonu içerisinde yapıldı. Alınan biyopsi parçaları, lizis ve denaturasyon işlemleri amacıyla PCR cihazına yerleştirildi. Lizisi takiben DNA amplifikasyon işlemi 35 döngü olarak gerçekleştirildi. PCR cihazından çıkarılan tüpler, 302-312 nm dalga boyunda ışık veren UV lamba altında incelendi. Pembe renk veren embriyo "erkek embriyo" olarak belirlendi. Cinsiyet tayini yapılan embriyolardan kompakt morula aşamasında olan 30 embriyodan 14'ünün erkek (%46.7; 14/30), 16'sının dişi (%53.3; 16/30) cinsiyette; blastosist aşamasındaki 35 embriyodan 21'inin erkek (%60.0; 21/35), 14'ünün dişi (%40.0; 14/35) cinsiyete sahip olduğu tespit edildi. Blastosist aşamasındaki erkeklerin oranının (%60.0) morula aşamasına (%46.7) göre daha yüksek bulunmasına rağmen aralarındaki farklılık istatistik önemde bulunmamıştır (P>0.05).

Anahtar Kelimeler: Cinsiyet, non-elektroforetik PCR, sığır embriyosu

Investigation of Sex Distribution and the Effect of Sex to This Distribution on *In Vivo* Produced Bovine Embryos at Different Stages

Summary: The objective of this study is to investigate whether sex distribution and the variance of this distribution are affected by sex. Sex detection of *in vivo* produced bovine embryos at different stages was made using non-electrophoretic PCR method. For sexing; *in vivo* derived day-seven 65 embryos were used. Embryos were obtained from routine superovulation procedure. After seven days of artificial insemination; embryos were collected by nonsurgical uterine flushing technique. The sex of the embryos was determined; following evaluation of the quality of embryos. 10-30% of the trophectoderm of the embryo was excised with a micro blade attached to the micro manipulator. Embryo biopsy procedure was carried out in D-PBS solution containing 20% FCS. The biopsy materials were placed in PCR instrument for lysis and denaturation. After lysis period, DNA amplification process was carried out in 35 cycles. The tubes taken out of the PCR instrument were inspected under UV illumination of 302-312 nm wave length. Pink fluorescence indicates the presence of a male sample. As a result of the sex determination out of 30 embryos; 14 male (46.7%; 14/30), 16 female (53.3%; 16/30) were determined at compact morula stage, out of 35 embryos; 21 male (60.0%; 21/35), 14 female (40.0%; 14/35) were determined at blastocyst stage. Even though the rate of males (60%) at blastocyst stage was higher than that at morula stage (46.7%), the difference was not found statistically significant (P>0.05).

Key Words: Bovine embryo, non-electrophoretic PCR, sexing

Giriş

Cinsiyet tayini biyoteknolojik çalışmalarda da avantaj sağlamaktadır. Yavru cinsiyetlerinin önceden bilinmesi, ileriye dönük suni tohumlama ve embriyo transferi programının yapılmasını kolaylaştırabilir (15). Günümüzde birçok reproduktif bi-

yoteknik geliştirilmiş ve uygulamaya aktarılmıştır. Kullanılan bu biyoteknoloji sayesinde istenilen yonde verim artışı sağlanabilmektedir. Yeni kullanılmaya başlayan teknolojik yöntemlerden birisi de cinsiyeti belirlenmiş embriyo üretimidir. Embriyoda cinsiyet tayini amacıyla; H-Y antijeni saptanmasıyla cinsiyet tayini (18), floresan insitu hibridizasyon (10), spermada X ve Y kromozomlarının tespiti (flow cytometry) yoluyla cinsiyet tayini (13) gibi yöntemler kullanılmıştır. PCR yöntemiyle, gerek *in*

vivo gerekse *in vitro* şartlarda üretilen embriyolar da X ve Y kromozomlarının amplifikasyonu ile embriyonun cinsiyet tayini kısa sürede ve yüksek güvenilirlikte (%95) tespit edilebilmektedir (3, 11, 14). Cinsiyet tespitinin tek blastomerle %92, iki blastomerle %94, üç blastomerle %96'nın üzerinde bir isabetle gerçekleştirildiği bildirilmiştir (5, 7, 12). Non-elektroforetik PCR yöntemi son yıllarda kullanılmaya başlanan ve elektroforez kullanılan PCR metoduna kıyasla daha kısa sürede ve ekonomik bir şekilde sonuca ulaştıran, hatta elektroforez kullanılmadığından bu aşamada olası DNA kontaminasyonuna meydan vermeyen etkin bir yöntemdir (3, 5).

Cinsiyet tayini amacıyla embriyodan hücrelerin biyopsi ile alınması gerekmekte ve işlem bir kaç şekilde gerçekleştirilmektedir. Bunlar, blastomer veya hücre aspirasyonu ve mikro biyopsi yöntemleridir. Embriyoda cinsiyet tayini son zamanlarda ticari amaçlı olarak kullanılagelen bir yöntemdir (3, 4, 14, 16). *In vivo* üretilen sığır embriyolarının taze olarak transferlerinin yanında dondurularak saklama, cinsiyetlerinin belirlenerek transfer ve cinsiyeti belirlenmiş bu embriyoların dondurularak saklanması ve transferi işlemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (2, 14).

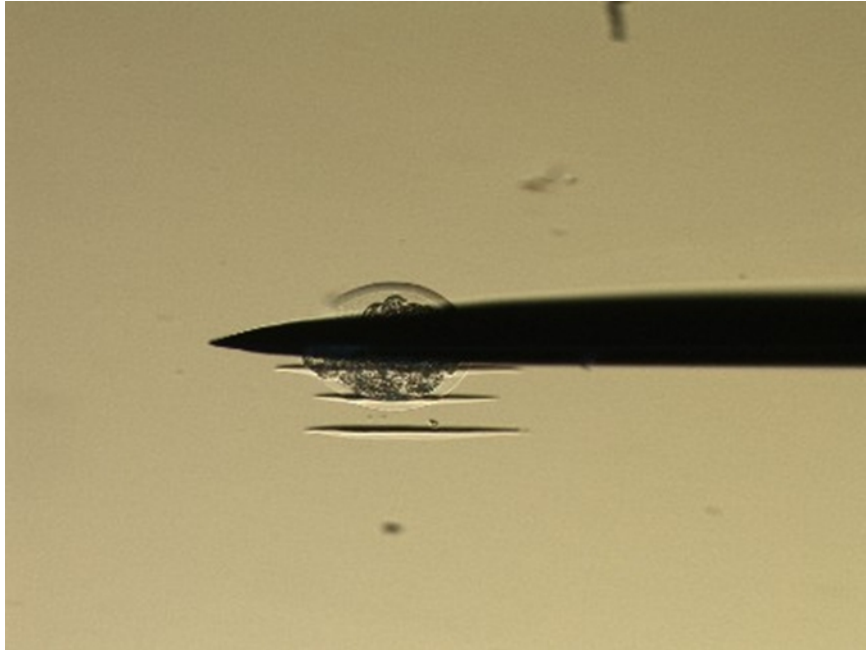
Gereç ve Yöntem

In vivo embriyo üretimi amacıyla 5 adet sığır kullanılmıştır. Embriyo elde etmek amacıyla hayvanla-

rın seksüel siklusları dikkate alınmaksızın progesteron uygulaması yapılmış ve bu uygulama zamanı sıfır (0) olarak kabul edilmiştir. 7. günden itibaren 4 gün süreyle azalan dozlarda sabah akşam (100:100 IU, 75:75 IU, 50:50 IU, 25:25 IU) 500 IU FSH ve 500 IU LH olacak şekilde Pluset (Calier, İspanya) enjeksiyonu yapılmıştır. Dokuzuncu gün sabah PGF₂α enjeksiyonu yapılmış ve akşam progesteron uzaklaştırılmıştır. Sığırlara çift doz suni tohumlama yapılmıştır. 18. günde yıkama işlemi yapılarak embriyolar toplanmıştır. Uterus yıkamaları, tohumlamayı izleyen 7. günde gerçekleştirilmiştir. Uterus yıkamasında elde edilen süzüntü mikroskop altında taranmış ve bulunan embriyolar PBS + %20 FCS + %0,4 BSA solüsyonu içerisine aktarılarak kalite ve gelişim safhalarına göre sınıflandırılmıştır.

Embriyodan kesit alma işlemi %20 fötal buzağı serumu ve 100 IU/mL kristalize penisilin G potasyum içeren D-PBS solüsyonunda gerçekleştirilmiştir (6). 90 mm'lik petri içerisine bu solüsyondan 150 µL miktarında damlalar hazırlanmıştır. Embriyolardan alınan parçalar cinsiyetinin belirlenmesi amacıyla PCR cihazına yerleştirilmiştir. Embriyoların kesme işlemini kolaylaştırmak maksadıyla embriyonun içinde bulunduğu petri kutusu tabanına birkaç adet mikro çizgi atılmıştır (Şekil 1).

Bu çizgiler arasında embriyolar sabitlenmiş ve kesim işlemi kolay bir şekilde yapılmıştır. Alınan biyopsi materyali, 10 µL ampli-Y A-solüsyonu

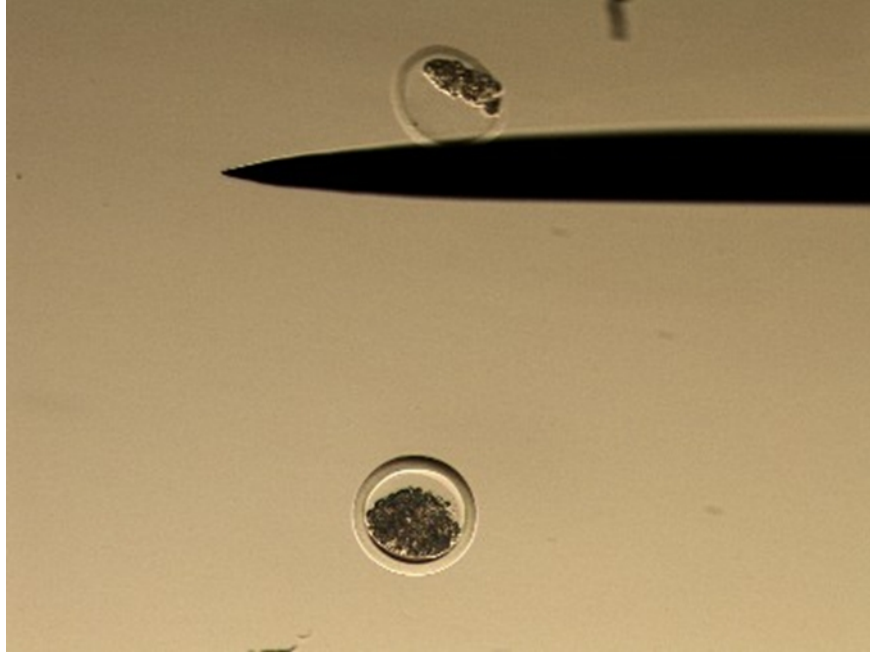


Şekil 1. Petri kutusu tabanına atılan çizgiler ve embriyodan parça alınması

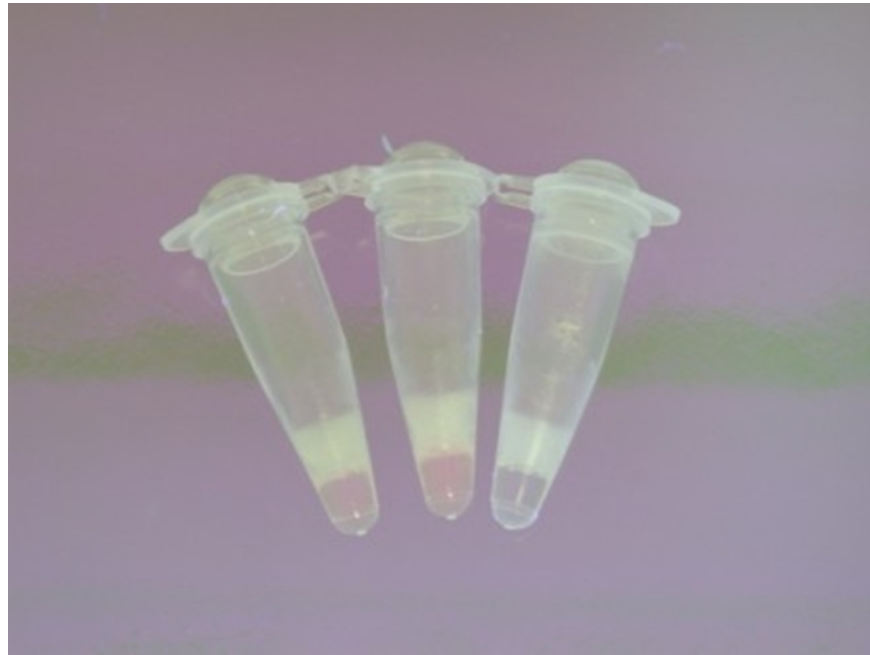
(Finnzymes, Finlandiya) içeren reaksiyon tüpü içerisine alınmış ve PCR cihazına yerleştirilmiştir (Şekil 2).

Bu tüplerin yanına erkek ve dişi kontrolden oluşan iki adet kontrol tüpü de yerleştirilmiştir. Kontrol

tüpleri içerisine ampli-Y A-solüsyonu ilave edilmiştir. Kesilen embriyolardan alınan örneklerin tüplere yerleştirilmesinin ardından PCR cihazı çalıştırılmıştır. Örneklere 55 °C'de 5 dakika lizis, 95 °C'de 5 dakika denaturasyon işlemi uygulanmıştır. DNA amplifikasyon programının başlatılması ama-



Şekil 2. Embriyonun asıl kısmı ve alınan örnek.



Şekil 3. Embriyoların cinsiyetleri, pembe renk erkek, açık renk dişi embriyo

ciyla cihazda bulunan her bir tüp içerisine kontrol tüpleri de dâhil olmak üzere 15 µL ampli-Y B-solüsyonu 94 °C'de ilave edilmiştir. B solüsyonu ilavesi yapıldıktan sonra 10 döngü halinde 94 °C'de 20 saniye, 50 °C'de 40 saniye ve 75 °C'de 20 saniye ilk amplifikasyon işlemi yapılmıştır. Ardından 96 °C'de 10 saniye, 60 °C'de 30 saniye, 75 °C'de 25 saniye ikinci amplifikasyon işlemi 35 döngü olarak yapılmıştır. Bu işlemin ardından 75 °C'de 5 dakika final uzama işlemi yapılmış, bunun ardından tüplerin kontrol edilmesine kadar 4 °C'de bekletilmiştir. PCR cihazından çıkarılan tüpler, 302-312 nm dalga boyunda ışık veren UV lamba altında incelenmiştir. UV ışıkta pembe renk veren embriyo erkek cinsiyetli, renk vermeyen ise dişi cinsiyetli embriyo olarak saptanıp kayıt altına alınmıştır (Şekil 3).

Bulgular

Cinsiyet tayini yapılan embriyolardan kompakt morula aşamasında olan 30 embriyodan 14'ünün erkek (%46.7; 14/30), 16'sının dişi (%53.3; 16/30) cinsiyette, blastosist aşamasındaki 35 embriyodan 21'inin erkek (%60.0; 21/35), 14'ünün dişi (%40.0; 14/35) cinsiyete sahip olduğu tespit edilmiştir. Blastosist aşamasında erkeklerin oranı (%60.0) kompakt morula aşamasına (%46.7) göre daha fazla olmuş ancak bu farklılık istatistik önemde bulunmamıştır ($P>0.05$).

Tartışma ve Sonuç

Son yirmi yılda gerek *in vitro*, gerekse *in vivo* sığır embriyolarının cinsiyetlerinin tespiti çeşitli yollarla ve başarılı bir şekilde yapılagelmektedir. *In vivo* veya *in vitro* yöntemlerle elde edilen sığır embriyolarından erkek cinsiyetteki embriyoların dişi cinsiyetteki embriyolara oranla daha hızlı geliştiği araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (1, 5, 17). Bazı araştırmacılar ise cinsiyet oranı ile embriyonun gelişimi arasında bir ilişkinin olmadığını belirtmektedirler (8). Kitiyanant ve ark. (9) *in vitro* olarak elde ettikleri iki hücreli sığır embriyoları üzerinde yaptıkları çalışmalarında erken bölünen embriyoların çoğunluğunun erkek cinsiyete sahip olduğunu ve bu cinsiyet oranının istatistiki açıdan önemli olduğunu bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada yedi günlük *in vivo* sığır embriyolarından; erkek embriyoların çoğunun blastosist aşamasında, dişi embriyoların ise çoğunun kompakt morula aşamasında oldukları tespit edildi. Yaptığımız çalışmada King ve ark.'larının (8) tespit ettiği gibi, cinsiyet tayini yapılan embriyolardan kompakt morula ve blastosist aşamasındaki embriyoların cinsiyetleri açısından oluşan farkın istatistiki açıdan önemli olmadığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, embriyonun cinsiyetinin *in vivo* sığır embriyolarının gelişimi ve kalitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Sunulan çalışmadan elde edilen bulgulara göre hızlı gelişen embriyoların erkek veya yavaş gelişen embriyoların dişi cinsiyette olduklarının söylenemeyeceği kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Avery B, Claus BJ, Madison V, Greve T. Morphological development and sex of bovine *in vitro* fertilized embryos. *Mol Reprod Dev* 1992; 32: 265-70.
2. Bredbacka P, Veimala R, Peippo J. Survival of biopsied and sexed bovine demi-embryos. *Theriogenology* 1994; 41: 1023-31.
3. Bredbacka P, Kankaanpaa A, Peippo, J. PCR sexing of bovine embryos: A simplified protocol. *Theriogenology* 1995; 44: 167-76.
4. Garcia JF, Nogueira MFG, Pupim F, Pantano T, Visintin JA. Pregnancy rates of blastomere biopsied bovine embryos frozen in ethylene glycol. *Theriogenology* 1997; 47: 268.
5. Hasler JF, Cardey E, Stokes JE, Bredbacka P. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology* 2002; 58: 1457-69.
6. Hassun PA, Mello MRB, Porto LPC, Garcia JF. Bovine embryo sexing by primer extension preamplification polymerase chain reaction. *Theriogenology* 1999; 51: 398.
7. Jafar SI, Flint APF. Sex selection in mammals: A review. *Theriogenology* 1996; 46: 191-200.
8. King WA, Yadav BR, Xu KP, Picard L, Sirard MA, Supplizi AV, Betteridge KJ. The sex ratios of bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 1991; 36: 779-88.
9. Kitiyanant Y, Saikhun J, Siritaroonrat B, Pavasuthipaisit K. Sex determination by polymerase chain reaction and karyotyping of bovine embryos at first cleavage *in vitro*. *Scienceasia* 2000; 26: 9-13.
10. Kobayashi J, Sekimoto A, Uchida H, Wada T, Sasaki K, Sasada H, Umezumi M, Sato E. Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence *in situ* hybridization. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 390-4.

11. Machaty Z, Paldi A, Csaki T, Varga Z, Kiss I, Barandi Z, Vajta G. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1993; 98: 467-70.
12. Park JH, Lee JH, Choi KM, Joung SY, Kim JY, Chung GM, Jin DI, Im KS. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. *Theriogenology* 2001; 55: 1843-53.
13. Rens W, Welch GR, Johnson LA. Improved flow cytometric sorting of X and Y chromosome bearing sperm: Substantial increase in yield of sexed semen. *Mol Reprod Dev* 1999; 52: 50-6.
14. Shea BF. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: A six-year retrospective study. *Theriogenology* 1999; 51: 841-54.
15. Şendağ S, Aydın İ, Çelik HA. İneklerde prenatal embriyonik/föetal cinsiyetin belirlenmesi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2005; 2(1): 39-44.
16. Thibier M, Nibart M. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 1995; 43: 71-80.
17. Tominaga K. Cryopreservation and sexing of in vivo and in vitro produced bovine embryos for their practical use. *J Reprod Develop* 2004; 50: 29-38.
18. Utsumi K, Kawamoto T, Kim JH, Iritani A, Sakai A, Komano T. Sex determination of bovine embryos by the polymerase chain reaction using Y specific primers. *J Reprod Develop* 1992; 38: 35-43.

Yazışma Adresi :

Dr. Tahir KARAŞAHİN
Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü
Müdürlüğü Lalahan
06852 Mamak/ANKARA
Tel: 0312 8651196-239 / 05305425411
Fax: 0312 8651112
E-posta: tahirkarasahin@gmail.com