



**Review**  
(Derleme)

Burcu ESİN  0000-0002-5728-1478  
Mesut ÇEVİK  0000-0002-0754-6116

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Döleme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Samsun

Corresponding author: burcuyalcin@omu.edu.tr



J. Anim. Prod., 2020, 61 (1): 63-71  
DOI: 10.29185/hayuretim.643715

## Memelilerde Cinsiyetin Tayini ve Değerlendirilmesi

Gender Determination and Evaluation in Mammals

Alınış (Received): 21.06.2019

Kabul tarihi (Accepted): 30.08.2019

### Anahtar Kelimeler:

Cinsiyet tayini, embriyo, fötüs, memeliler, sperma.

### Keywords:

Embryo, fetuses, mammals, sex determination, spermatozoa.

### ÖZ

Gebe hayvanlarda doğacak yavruların cinsiyetlerinin önceden belirlenebilmesi yetiştiricilikte birçok avantajı beraberinde getirmektedir. Cinsiyetin tayini, et veya süt üretimi yapan işletmelerin üretim stratejilerinin önceden belirlenmesini sağladığı gibi, biyoteknolojik (suni tohumlama, embriyo transferi, in vitro fertilizasyon gibi) programlarının da önceden planlanmasını kolaylaştırmaktadır. İşletmelerde çeşitli yöntemlerle doğacak yavrunun cinsiyetinin önceden belirlenmesi ve hatta istenilen cinsiyette yavru elde edilmesi işletmelerle birlikte ülke hayvancılığında ıslah ve genetik ilerlemenin hız kazanmasını sağlamaktadır. Günümüzde, cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanılarak istenilen cinsiyette yavru elde edilebilmektedir ve prenatal embriyonik ya da fetal cinsiyetin belirlenmesine yönelik çalışmalar spermatozoa, embriyo ve fötüsler üzerinde değişik yöntemler uygulanarak gerçekleştirilmektedir.

### ABSTRACT

The ability to predetermine the sex of offspring in pregnant animals brings with it many advantages in breeding. Gender identification facilitates the planning of biotechnological (artificial insemination, embryo transfer, in vitro fertilization) programs in advance, as well as allowing the production strategies of businesses that produce meat or milk to be predetermined. Pre-determination of the sex of the offspring by various methods in the enterprises and even obtaining the offspring in the desired sex ensures that the breeding and genetic progress of the animal husbandry is accelerated in that enterprise. Today, genders can be obtained by sex-determined sperm method and the studies for determining prenatal embryonic or fetal sex are performed by applying different methods on spermatozoa, embryo and fetuses.

### GİRİŞ

Embriyonal dönemde cinsiyetin nasıl belirlendiği çok eski tarihlerden bu yana insanlığın merak konusu olmuştur. Bu konu üzerine üretilen teorilerin kökeni 3.000 yıl öncesine dayanmaktadır. Örneğin, M.Ö. 384–322 yılları arasında yaşamış olan Aristo, çevresel koşulların cinsiyet tayini üzerine etkili olduğunu savunmuştur. Sıcak ve kuru rahimde gelişen yavrunun erkek, soğuk ve nemli rahimde gelişen yavrunun ise dişi olacağına inanmıştır. Ancak, 20. yüzyılın başında kromozomların cinsiyet tayini üzerindeki rollerinin keşfiyle birlikte memelilerde cinsiyetin çevresel koşullarla belirlendiği tezi çürütülmüş ve üçüncü çeyreğinde ise Y kromozomunun erkek cinsiyeti oluşumundaki rolü bulunmuştur. Geçtiğimiz yüzyılın sonunda ise 'Y kromozomu üzerinde cinsiyet belirleyen bölge' adı verilen "SRY" geninin (Sex Determining region Y gene) izolasyonu

gerçekleşmiştir. Androjenlerin embriyonal hayatta cinsiyet gelişimi üzerine etkileri ilk defa 1947'de ortaya konulmuş olmasına rağmen konuyla ilgili fizyopatolojik bulgular ve androjenlerin özellikle beyinde cinsel davranışları düzenleyen mekanizmaya olan etkileri son 10 yıldır üzerinde yoğun çalışılan konulardır (Mittwoch, 2005).

### Cinsiyet Gelişiminin Genetik ve Hormonal Kontrolü

Genetik yapı, iç ve dış cinsel organ yapısı ile belirlenen cinsiyeti yalnızca tek bir başlık altında incelemek yeterli değildir. Cinsiyeti belirleyen özellikler oldukça karmaşık ve çok yönlü faktörlerin rol oynadığı, kendi aralarında da etkileşim gösteren gelişim süreçleridir. Cinsel farklılaşmanın temel amacı, herhangi bir erkek ya da dişiye özgü fiziksel ya da davranışsal özelliklerin gelişimi ve organizmalarda



cinsel üreme oluşmasına izin vermek için gerekli anatomi ve fizyolojidir (Wilhelm ve ark., 2007).

Embriyonal dönemin normal cinsiyet gelişim sürecinde 3 önemli adım gerçekleşmektedir. Bu adımlar;

**Kromozomal olarak cinsiyetin tanımlanması:** XX veya XY cinsiyet kromozomunun oluşumu fertilizasyon sırasında meydana gelmekte ve primer germ hücrelerini taşıyan hücrelerin mitoz bölünmesi ile devam etmektedir (George ve Wilson, 1988). Memelilerde fertilizasyonu gerçekleştirebilecek olan spermatozoonların yarısı tek bir X kromozomu ve diğer yarısı da bir Y kromozomu içerir. Spermatozoonların aksine ovumlar sadece X kromozomuna sahiptirler. X kromozomuna sahip olan spermatozoon ile fertilizasyonu gerçekleştiren ovumdan gelişen canlı dişi bir hayvan olurken (XX), Y kromozomuna sahip spermatozoonla fertilize olan ovumdan gelişen canlı ise erkek (XY) cinsiyete sahip olur. Cinsiyetin kromozomlar tarafından belirlenmesi, genotipik cinsiyet belirlenmesi olarak tanımlanır ve bu tanımlamada bireyin cinsiyeti, cinsiyet kromozomları üzerindeki genler tarafından gerçekleştirilir (McGeady ve ark., 2011).

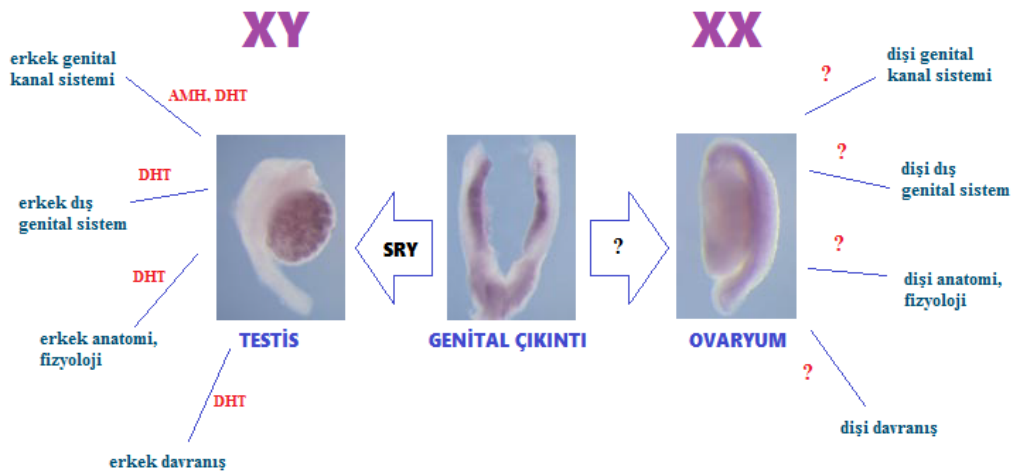
**Gonadal cinsiyetin gelişimi:** Erken embriyonal dönemde gonadlar farklılaşmamış olup bu dönem "İndifferent Dönem" olarak adlandırılmaktadır. Eğer cinsiyet kromozomları XX ise; indifferent gonad ilerleyen dönemde ovaryumlara dönüşmekte, XY ise; testisler gelişmektedir. Bu dönemde testislerin gelişimi Y kromozomunda bulunan SRY gen bölgesi tarafından kontrol edilmektedir. 1960'larda memeli kromozomunun karyotiplendirilmesiyle ilgili tekniklerin gelişimiyle birlikte, memelilerde testisin gelişiminden sorumlu kromozomun Y kromozomu

olduğu saptanmıştır. Canlı genotipinde kaç tane X kromozomu olursa olsun, Y kromozomunun varlığında canlı erkek, yokluğunda ise dişi olarak gelişecektir (George ve Wilson, 1988). Ancak 1990 yılında "sex reversal syndrome" (zıt cinsiyet sendromu) adı verilen bir hastalığa sahip, genotipik ve fenotipik cinsiyetleri zıt bireylerin incelenmesi ile konu yeni bir boyut kazanmıştır. Bu hastalığa sahip bireylerin XY kromozomlu olmalarına rağmen tamamen dişi olarak geliştiklerinin gözlenmesiyle birlikte, cinsiyeti belirleyen asıl faktörün tamamıyla Y kromozomunun değil, Y kromozomu üzerinde bulunan "hareketli bir gen parçası" olduğu keşfedilmiştir. Testis gelişiminden sorumlu olan bu gene "Y kromozomu üzerinde cinsiyet belirleyen bölge" (Sex determining region Y gene) SRY adı verilmiştir. SRY, Y kromozomunun kısa kolu üzerinde "pseudautosomal region 1" (PAR1) adı verilen bölgeye çok yakın bir pozisyonda bulunmaktadır. PAR1 adı verilen bölge mayoz bölünmenin profaz I aşamasında "crossing over" dediğimiz gen değişimi olayının en sıklıkla gerçekleştiği bölgedir ve bazen SRY'nin de gen değişimine katılması söz konusu olur. Bu nedenle embriyo XY kromozomuna sahip olmasına rağmen SRY'yi kaybettiği için dişi olarak, XX kromozomuna sahip bir embriyo ise SRY'yi kazandığı için erkek olarak gelişecektir (Seda ve ark., 2006). SRY geni, SRY gen transkripti olan TDF'yi (Testis Determining Factor: TDF) üreterek gonadların testis yönünde farklılaşmasını indüklemekte iken SRY geni ve SRY gen transkriptinin olmadığı durumda bipotansiyel gonadlar ovaryum olarak gelişmektedirler (George ve Wilson, 1988). Şekil 1'de erkek ve dişi üreme sistemlerinin geliştiği embriyonik taslaklar sunulmuştur (McGeady ve ark., 2011).

Embriyonik Yapı	Erkek Üreme Sisteminde Oluşan Yapı	Dişi Üreme Sisteminde Oluşan Yapı
Primordial cinsiyet hücreleri	Spermatozoonlar	Ovumlar
Gonad	Testis	Ovaryum
Cinsiyet Kordonları	Tubulus seminiferus kontortuslar, Sertoli hücreleri	Folikül hücreleri
Mezonefroz tüpçükleri	Ductuli eferentesler	Epooforon, paraoforon
Mezonefroz kanalı	Epididimis, ductus deferens, vezikula seminalis	Gartner kanalı
Paramezonefroz kanalı	Testisin eklentisi, uterus maskulinus	Tuba uterina ve vaginanın cranialı
Ürogenitalis	Üretranın pars pelvina, prostat bezi, glandula bulbo uretralis, üretranın pars penis	Vestibulum ve buradaki bezler
Tüberkulum genitalis	Penisin gövdesi	Klitoris
Ürogenital kıvrımlar	Üretranın pars penis kısmının ventralini saran dokular	Labiumlar ve vulva
Genital şişkinlikler	Skrotum	

**Şekil 1.** Erkek ve dişi üreme sistemlerinin geliştiği embriyonik taslaklar (McGeady ve ark., 2011' den uyarlanmıştır).

**Figure 1.** Embryonic draft that develops the male and female reproductive systems



Şekil 2. Memelilerde cinsel fenotip gelişimi (Wilhelm ve ark., 2007'den uyarlanmıştır).  
Figure 2. Sexual phenotype development in mammals

**Fenotipik cinsiyet gelişimi:** Gonadların cinsiyet kromozomlarına göre ovaryum veya testislerle farklılaşmasının ardından internal ve eksternal genital kanalın oluşumu başlamaktadır. Memelilerde cinsel fenotip gelişimi Şekil 2'de gösterilmiştir (Wilhelm ve ark., 2007).

Erkek genital kanalın farklılaşması ve dış genital organların gelişmesi testislerde bulunan Sertoli hücreleri tarafından üretilen Anti-Müllerian hormon (AMH) ve Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron sayesinde olmaktadır. Gonadların testis yönünde farklılaşmasıyla AMH hormon, Müller kanalının gelişimi durdurmakta ve testosteron hormonunun etkisiyle Wolf kanalının gelişimi uyarılmakta ve böylece erkek genital kanalı gelişmektedir (Gürler ve Kaymaz, 2013). Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteron, 5 $\alpha$ -redüktazın etkisiyle dihidrotestosterona dönüştürülmekte ve erkek dış genital organlarının farklılaşması başlatılarak testislerde devam eden epididimis, duktus deferens ve vezikula seminalis gibi çift halindeki erkek genital kanal sistemi kısımlarının farklılaşması sağlanmaktadır (Troedsson ve Madill, 2004).

Erkek genital kanalının gelişimi, erkeklik hormonları etkisi altında gerçekleşen aktif bir süreçken, dişi genital kanalının gelişimi, erkeklik hormonlarının yokluğunda kendiliğinden gerçekleşen pasif bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Troedsson ve Madill, 2004). Gonadların ovaryum yönünde farklılaşması durumunda ortamda testosteron bulunmayacağından Wolf kanalı körelir ve AMH salgılanmayacağı için Müller kanalı gelişerek uterus ve ovidukt'u meydana getirir. Dişi embriyoda fetal ovaryumlardaki foliküler hücrelerden (primitif

granüloza hücreleri) ve plasentadan östrojen ve progesteron hormonları salınmasına rağmen, bu hormonların embriyonal dönemde cinsiyet gelişimi üzerine belirleyici etkileri bulunmamaktadır. Nitekim aromataz enzimi etkinliği önlenmek suretiyle östrojen sentezinin engellendiği dişi fare embriyolarında, dişi genital kanalının eksiksiz geliştiği gözlemlenmiştir. Aynı şekilde Müller kanalı üzerindeki östrojen reseptörleri bloke edilmesinin de dişi fare embriyolarında, dişi genital kanalının gelişimini engellemediği saptanmıştır. Fakat östrojen reseptörleri bloke edilmiş dişi fare fötüsünde üreme kanalı tam olgunlaşmadığı için kısırlık gözlemlenmiştir. Buradan östrojenin, dişi genital kanalının oluşumu için değilse bile olgunlaşması ve fonksiyonel hale gelmesi için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır (Troedsson ve Madill, 2004). Normal cinsiyet farklılaşma sürecinin herhangi bir basamağında meydana gelen her türlü anormallik durumunda interseksüalite ya da hermafrodizm olarak adlandırılan gonadal cinsiyet anomalileri ortaya çıkabilmektedir (Gürler ve Kaymaz, 2013).

### Cinsiyetin Tayini

Son yıllarda, hayvancılık alanında yavru verimini geliştirmek için kullanılan farklı biyoteknolojik gelişmelerden sıklıkla yararlanılmaktadır. Söz konusu biyoteknolojik gelişmelerden öne çıkan teknikler arasında sperma, embriyo ve fötüsta cinsiyetin ileri teknikler kullanılarak belirlenmesi ve cinsiyeti belirlenmiş sperma ile in vivo ya da in vitro koşullarda embriyo üretimi yapılması gibi biyoteknolojiler bulunmaktadır (Gosálvez ve ark., 2011).

Cinsiyet tayini uygulamalarının temeli X ve Y kromozomu taşıyan spermatozonların fiziksel ve



fizyolojik özellikleri arasındaki farkların kullanılması esasına dayanmaktadır. Uzun süredir prenatal dönemde embriyo cinsiyetinin belirlenebilmesi sığır yetiştiriciliğinin önemli amaçlarından biri olmuştur. Burada iki yaklaşım mevcuttur. Birincisi, fertilizasyon sonucu oluşan embriyolarda cinsiyetin belirlenmesi, diğeri ise daha embriyo oluşmadan spermalara müdahale ederek oluşacak embriyolarda cinsiyetlerin önceden belirlenebilmesidir (Kamimura ve ark., 1997).

### **Spermada Cinsiyet Tayini ve Cinsiyet Belirleme Yöntemleri**

Hayvancılık sektöründe arzu edilen, doğacak yavruda istenilen cinsiyetin oluşturulması ve sahip olunan faydaya göre artan et ve süt ihtiyacını karşılamaktır ve sonuç olarak sektöre ekonomik fayda sağlanmaktadır. Spermada cinsiyetin önceden belirlenmesi ile hayvansal üretim endüstrilerinde de önemli ekonomik yararlar sağlanmaktadır. Geçmişte, X ve Y kromozoma sahip spermatozoonları ayırmak için sedimentasyon, filtrasyon, santrifüj, yüzdürme (swim up/down), elektroforez, sperma medyumundaki pH değişiklikleri, immünolojik teknikler ve motilite kriterleri, viskozite, basınç değişiklikleri gibi farklılıklara dayanan çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bazıları umut verici sonuçlar göstermiştir, ancak bilimsel geçerliliğe ve başarıya sahip olamamışlardır. Günümüzde ise yaygın ve en başarılı olarak önerilen Flow Sitometri yöntemi ile spermatozoonların cinsiyetleri belirlenerek kullanıma sunulmakta ve yüksek düzeyde istenilen fayda sağlanabilmektedir (Bhalakiya ve ark., 2018).

**Yoğunluk özelliklerine dayalı santrifüj yöntemi:** Yapılan çalışmalarda X kromozomu ve Y kromozomu taşıyan boğa spermatozoası arasındaki yoğunluk farkı sadece 0.0007 gr/cm<sup>3</sup> olarak tespit edilmiştir (Meistrich, 1982). Cinsiyetin tayinine bu açıdan bakıldığında spermatozondaki kromozomal yoğunluk özelliğinin spermanın cinsiyet tayininde bir kriter olarak kullanımının uygun ve kullanışlı bir teknoloji olamayacağı şeklinde değerlendirmeler yapılmıştır (Meistrich, 1982; Sharma ve Sharma, 2016).

**Laminar akış altında yüzdürme yöntemi:** Söz konusu yöntemde göre Y kromozomu taşıyan spermatozoonların akan ortamın bir sütununda X kromozomu taşıyan spermatozoonlara oranla daha farklı ve daha hızlı yüzdüğünü bildirilmiştir. Ancak bu yöntem sisteme yerleştirilen toplam spermatozoonun miktarının sadece %10'unun tekrar kullanılabilir olmasından dolayı sisteme yeterli düzeyde cevap verememesinden dolayı tercih edilmemektedir (Sarkar ve ark., 1984).

**Serbest akış elektroforezi yöntemi:** Bu yöntemin prensibi, X kromozomu taşıyan spermatozoon ile Y

kromozomu taşıyan spermatozoonun yüzeyindeki elektrik yüklerinin farklı olması olasılığına dayandırılmakta ve spermatozoonları iki ayrı sınıfa ayırmak için elektriksel bir alan kullanılmaktadır (Kaneko ve ark., 1984). Ancak bu yöntem kullanılarak ayrılan spermatozoonlar ile yapılan tohumlamalar hayal kırıklığı yaratan sonuçlar vermiştir. Yapılan bir denemede, 1185 hayvanın kullanıldığı uygulama sonucunda bu yöntem ile elde edilen X kromozomu taşıyan sperma kullanılarak yapılan tohumlamalarda %50,4 dişi buzağı doğum oranı bulunmuştur. Bu oran, normal şartlarda herhangi bir müdahalenin yapılmadığı spermalarla yapılan tohumlamalardan elde edilen sonuçlardan farklı değildir. Bu yöntemin bir diğer dezavantajı ise elektroforeze tabi tutulduktan sonra spermanın motilitesinde ve genetik materyalinde oluşan anomali ve olumsuzluklardır (Blottener ve ark., 1983).

**Karşı akım galvanik ayırma yöntemi:** Her spermatozoon, boyut, şekil, kütle, özgül ağırlık ve hücre ile süspansiyon ortamı arasındaki yoğunluk farkı gibi fiziksel kuvvetlerden etkilenecek bireysel bir çökme hızına sahiptir. Bu faktörler göz önüne alındığında uygun bir mikro-amper ( $\mu$ A) akım uygulanarak Y kromozomu taşıyan spermatozoonun elektrotun anot ucuna ve X kromozomu taşıyan spermatozoonun ise elektrotun katot ucuna çekilebileceği bir prensip ile çalışmakta olan sistem olarak tanımlanabilir (Bhattacharya ve ark., 1977). Ancak, bu yöntemin de daha önce bahsi geçen yöntemlere benzer şekilde cinsiyet oranlarının belirlenmesinde anlamlı bir başarı ve değişiklik meydana getirmediği saptanmıştır (Foote, 1985).

**Baş bölgesi hacimsel farklarına dayalı yöntem:** Mikroskop kullanarak ve beraberinde görüntüleme yaparak spermatozoonların DNA'sını taşıyan baş bölgesinin büyüklüğüne göre X ve Y kromozomu taşıyan memeli spermatozoonlarını ayırma esasına dayanmaktadır. Ancak spermatozoonun baş bölgesinin hacmine dayalı olarak ayrılan cinsiyeti belirlenmiş spermatozoon teorik değerlerde %80'i geçmemektedir. Spermada cinsiyet tayini için bu yöntemde dayalı olarak flow sitometre ve mikroskop optikleri kullanarak modifiye yeni yöntemler geliştirilmiştir (Van Munster, 2002).

**İmmünolojik cinsiyet tayini:** Freund'un adjuvant maddesi ile deri altından sperma preparasyonları enjekte edilerek erkek ve dişi tavşanların immunize edilmesi, spermatozoon membran proteinlerine karşı antikorların oluşması sağlanmıştır. Dişi tavşanlardan elde edilen anti-sperm antiserumları "anti-Y", erkek tavşanlardan elde edilen antiserumlar ise "anti-X"



olarak kabul edilmiştir. Sadece “anti-X” anti-serumlarının spermatozoanın aglütinasyonuna neden olduğu, “anti-Y” antiserumlarının ise spermatozoada herhangi bir aglütinasyon göstermediği bulunmuştur. Aglütine sperma popülasyonu serbest yüzen spermatozoonlardan filtrasyon ile ayrılarak serbest yüzen spermatozoon popülasyonu (potansiyel olarak Y kromozomu taşıyan spermatozoonlar) izole edilmiştir. Sığır embriyoları, izole spermatozoon popülasyonu kullanılarak in vitro olarak üretilmiş ve blastosistlerden sitogenetik olarak cinsiyet belirlemeleri yapılmıştır. Sonuçlarda, embriyoların %92'sinin cinsiyetinin erkek olduğu ve bu tekniğin sperma cinsiyet tayininde potansiyel yöntemlerinden biri olduğunu göstermiştir. Ancak bu yöntemin başka deneylerle doğrulanması ve güvenilirliğinin test edilerek doğrulanması gereklidir. Yöntemin dezavantajı ise sadece Y kromozomu taşıyan spermatozoonları izole etmede başarılı olmasıdır, Y kromozomu taşıyan spermatozoonları aglütine ederek X kromozomu taşıyan spermatozoonların ayrımı sağlanamamıştır. Dolayısıyla, sadece erkek yavru istenilen durumlarda tercih edilebilecek yöntemlerden birisi olarak kabul edilebilir (Blecher ve ark., 1999; Yang ve ark., 2014).

**Flow sitometre:** İnsan spermatozoasında X kromozomu taşıyan spermatozoon ile Y kromozomu taşıyan spermatozoonun DNA içeriği arasındaki fark ilk kez 1979 yılında bildirilmiştir (Otto ve ark., 1979). Daha sonra bu prensipten yola çıkılarak flow sitometrik yöntem ile erkek ve dişi spermatozoonlar arasındaki DNA içerik farkı birçok evcil hayvan türünde (boğa, domuz, koç, at, deve, tavşan, vs.) ölçümlenebilmiştir. Konu ile ilgili olarak tespit edilen türlere özgü DNA içerik farkları Çizelge 1’de belirtilmektedir (Sharma ve Sharma, 2016). İnsan haricinde birçok türde flow sitometrik yöntem spermatozoon cinsiyet oranını

tayin etmek için kullanılan en etkin yöntemdir. İnsan spermleri daha çok köşeli ve yönlendirmeyi veya ortama alışmayı güçleştiren mermi şeklindeki başı ile yöntemin kullanımına uygun olmadığı gibi aynı zamanda X ve Y kromozomları taşıyan insan spermleri arasındaki DNA farkının %3’den az olması, analizdeki hassasiyetin artmasını gerekli kılmakla birlikte, söz konusu yöntemi de kullanışsız olarak tanımlamaktadır (Bearden ve ark., 2004). Diğer türlerde etkili olarak kullanılmakta olan bu yöntem, memelilerin X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoonları arasındaki DNA içeriği farkının tam olarak ölçülmesi ile X ve Y kromozomlarını taşıyan canlı gametleri ayırmak için uygulanan %85-90 doğruluk oranına sahiptir (Johnson, 2000; Maxwell ve ark., 2004). Spermanın cinsiyet belirleme yöntemlerindeki gelişmeler de iki önemli nokta üzerinde durulmaktadır. Birincisi birim zamanda cinsiyeti belirlenmiş spermatozoon sayısının arttırılması, ikincisi ise spermaya minimum zarar veren yöntemlerin bulunmasıdır (Demirci, 2014).

Flow sitometre yönteminde, erkek damızlıktan alınan spermatozoa spesifik bir bisbenzimidazole DNA-bağlayıcı boyası olan Hoechst 33342 (Calbiochem, La Jolla, CA) ile bir saat süresince boyanır. Bu boyanmış spermatozoa sıvı bir süspansiyon içerisinde basınçlı bir şekilde flow sitometrenin tüpü içerisine konulur. Tüp içerisine giren spermatozoonlar tüpün eğim verilmiş ucundan dışarı çıkarken kaplama sıvısı içerisine yönlendirilir. Spermatozoa süspansiyonu ve kaplama sıvısı ikisi birlikte tüpün 76 mikronluk çıkışı ucundan ayrılırken bu yöntem spermatozoonların laminar akış istikametini korur. Boyanmış spermatozoonlar kısa dalga boylu bir lazer ışınına (Innova 90-5 Argon-ion laser. Coherent, Palo Alto, CA) maruz bırakıldığı zaman parlak mavi floresan ışığı yayarlar.

**Çizelge 1.** Erkek ve dişi spermatozoonlar arasındaki DNA içeriği farkı (Sharma ve Sharma 2016’dan uyarlanmıştır).

**Table 1.** DNA content difference between male and female spermatozoa

Tür	X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoonların DNA İçerik farkı (%)	Kaynakça
Sığır	3.8	Garner et al., 1983; Garner, 2001, 2006; Johnson and Welch, 1999; Johnson, 2000
Manda	3.6	Johnson, 2000; Lu et al., 2006
Koç	4.2	Johnson, 1995, 2000
Keçi	4.4	Parilla et al 2004
At	3.7	Johnson, 2000
Domuz	3.6	Johnson, 2000
İnsan	2.8	Johnson, 2000
Tavşan	3.0	Johnson, 2000
Deve	3.3	Johnson, 2000
Bizon	3.6	Johnson, 2000
Yak	3.6	Johnson, 2000



Daha büyük DNA içeriği nedeniyle boyanmış olan X kromozomu taşıyan spermatozoonlar, Y kromozomu taşıyan spermatozoonlardan daha parlak bir floresan ışık yaymaktadırlar. Bu yayılan floresandaki fark bir fotomultiplikator (ışıl çoğaltıcı) tüp tarafından ölçülür ve analog formattan dijital yani sayısal formata dönüştürülüp bir frekans dağılımı olarak sonuçlar bilgisayardan alınır. En fazla DNA içeriğini ölçmek için sisteme güçlü bir bilgisayar kurulur. Fakat tüm spermatozoonlar foto multiplikator tüpü içerisinde sıvı akışı ile birlikte geçerken kesin olarak belirlenemez. Spermatozoonları ihtiva eden akıntı cihazın boşalma deliğinden dışarı çıkarken ayrı damlacıklar oluşturmaları için yüksek frekansta, yaklaşık saniyede 90.000 defa titreştirilir. Bütün damlacıklar spermatozoon ihtiva etmemesine rağmen dedektör tarafından temin edilen DNA içeriği bilgisine bağlı olarak pozitif veya negatif bir yükle yüklenirler. Birden daha fazla spermatozoon ihtiva eden damlacıklara ise yük uygulanmaz. Daha sonra aksi yüklü saptırıcı levhalar tek akıntıyı 3 akıntıya ayırır. Pozitif olarak yüklenmiş X kromozomuna sahip spermatozoonları taşıyan damlacıklar negatif yüklü saptırma levhası tarafına, negatif olarak yüklenmiş Y kromozomuna sahip spermatozoonları taşıyan damlacıklar ise pozitif yüklü saptırma levhası tarafına yönlendirilir. Birden fazla spermatozoon taşıyan veya cinsiyeti belirlenmemiş spermatozoonları taşıyan yüklenmemiş damlacıklar ise hiç bir tarafa sapmadan direkt olarak çöp bölümüne gider (Johnson, 1992; Bearden ve ark., 2004). Sonuç olarak saniyede toplam 20.000 spermatozoon cihazdan geçer ve her bir cinsiyet için saniyede takriben 4.000 canlı spermatozoon eşzamanlı olarak ayrılabilir. Bugünkü geçerli sistem yaklaşık olarak her bir cinsiyet için saatte  $10-13 \times 10^6$  canlı spermatozoon üretebilmektedir (Johnson, 1992).

Genellikle cinsiyeti belirlenmiş spermatozoonlardan  $0.25 \text{ cm}^3/2-6$  milyon spermatozoon konularak hazırlanmış payetler kullanılarak yapılan tohumlamalardan yeterli dölverimi alınmaktadır. Cinsiyeti belirlenmiş dondurulmuş sperma kullanılarak suni tohumlama uygulaması ile ilk yavru 1999 yılında elde edilmiştir (Garner, 2006). Flow sitometri yönteminin spermanın cinsiyet tayinindeki etkinliğine rağmen, bu yöntemin pahalı bir donanım gerektirmesi, işlem süresinin uzun olması, üretim maliyetlerinin yüksek olması ve elde edilen dölverimi oranlarının düşük olması gibi nedenlerden sahada uygulanabilirliği tartışılmaktadır. Ayrıca bu yöntemde işlem gören spermanın yaklaşık %70'lik kısmı hasar (genetik materyal, DNA hasarı) görmekte olup ancak %0.2 -

%0.4 oranında bir geri kazanım söz konusudur (Weigel, 2003).

**Swim-up (Yüzdürme) yöntemi:** Swim-up prosedürü değişik kromozomal yapıya sahip spermatozoonların yüzme kabiliyetlerinin farklı olması prensibini temel alarak yavru cinsiyetinin fertilizasyon sırasında belirlenmesi esasına dayanır. Swim-up uygulamalarında X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoonların ağırlık farkı veya metabolizma hızlarının farklı olması nedeniyle yüzme hızlarının da farklılık arz etmesi hipotezine dayalı olarak memelilerde yapılan çalışmalardan farklı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Khatamee ve ark., 1999; Demiral ve ark., 2007). Yapılan bir çalışmada swim-up tekniği uygulanarak elde edilen spermalarla yapılan tohumlamalardan doğan dişi ve erkek çocuk sayılarının kontrol gruplarına oranla sırasıyla %86.7 ve %89.7 daha yüksek olduklarını bildirilmiştir (Khatamee ve ark., 1999). Bir diğer çalışmada tavşanlarda swim-up işlemi uygulayarak elde ettikleri spermalarla yapılan tohumlamalarda; 15 dakikalık swim-up uygulanan spermalarla yapılan tohumlamalardan %33.30; 30 dakikalık inkubasyon ile elde edilen spermalarla yapılan tohumlamalardan %22.20 ve 45 dakikalık inkubasyonla elde edilen spermalarla yapılan tohumlamalardan ise %50 oranında gebelik elde edildiği bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada birinci grupta fertilizasyon oluşma oranı %66.66, ikinci grupta %50 ve üçüncü grupta ise %81.81 olarak belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar uygulanan bu yöntemle elde edilen yavru cinsiyetlerinin değiştirilebileceğini bildirmişlerdir (Demiral ve ark., 2007). Ancak, düvelerde yapılan çalışmalarda ön seleksiyonu yapılmış spermalar ile yapılan tohumlamalardan elde edilen yavruların cinsiyet oranları ile kontrol gruplarından elde edilen yavruların cinsiyet oranları karşılaştırıldığında, yavruların cinsiyet oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığa rastlanılmadığı bildirilmiştir (Seidel ve ark., 1999). İnsan (Khatamee ve ark., 1999) ve tavşanlarda (Demiral ve ark., 2007) yapılan swim-up yöntemi ve embriyo cinsiyeti arasındaki ilişki göz önünde tutulduğunda çiftlik hayvanlarında bu yöntemin uygulanabilirliği hakkında daha çok çalışma yapılması gerektiğini düşünülmektedir. Yapılacak yeni çalışmalarla farklı swim-up uygulamaları ile elde edilecek embriyoların cinsiyet oranlarının değiştirilebileceği düşünülmektedir.

### Embriyoda Cinsiyetin Tayini

Son zamanlarda geliştirilmiş olan birçok reproduktif biyoteknoloji sayesinde spermada olduğu



gibi embriyolar için de cinsiyetin belirlenmesinin mümkün olduğu bildirilmiştir. Embriyoda cinsiyet tayini için çeşitli yöntemler mevcut olup, bu amaçla en çok invaziv ve non-invaziv yöntemler kullanılmaktadır (Wakchaure ve ark., 2015).

#### **İnvaziv yöntemler ile embriyoda cinsiyetin tayini**

**Sitogenetik yöntem:** Embriyodan biyopsiyle sınırlı sayıda hücre alınmaktadır ve bu hücrelerin mitoz bölünmedeki hücre bölünmesini durdurmak için metafaz bloke edici bir madde (Colcemid gibi) bulundurulmuş besiyerlerinde kültüre edilir. Bu besiyerlerinde gelişmeye bırakılan hücrelerde kromozomlar birbirlerinden ayrılırlar. Lam üzerine aktarılan hücreler fikse edilip, DNA'ya spesifik boyalar kullanılarak (Hoechst, PI, Giemsa gibi) boyandıktan sonra flöresan mikroskopta incelenirler. Metafaz aşamasında gelişmesi durdurulmuş hücrelerde kromozom ayrıntısı analiz edilebilmektedir. Bu analizde cinsiyet teşhisi için iki tane X kromozomu veya bir tane Y kromozomunun görülmesi yeterli olmaktadır (King, 1984; Leibo ve Rall, 1987). Bu yöntem ile embriyoların transfer edilmeden önce kromozomal anormallikleri belirlenebilmektedir. Metodun doğruluk oranı %100'e çok yakın olarak bildirilmektedir. Cinsiyetin belirlenebilmesi için 20 ng'dan daha az DNA örneği yeterli olabilmektedir. Ayrıca reaktifler ucuz ve elde edilmesi kolaydır. Ancak bu yöntem sırasında embriyoların canlılık ve gebelik oranı manipülasyonlara bağlı olarak azalabilmektedir (Kitiyant ve ark., 2000).

**Cinsiyet kromatininin (Barr cisimciği) identifikasyonu:** Bu yöntemde cinsiyetin belirlenmesi *Barr cisimciği*'nin görülmesi esasına dayanmaktadır. *Barr cisimciği*, sadece dişilerdeki somatik hücrelerde görülen inaktif bir X kromozomudur. Fakat çoğu türün embriyolarında stoplazmanın granüler yapısı nedeniyle *Barr cisimciği*'nin görülmesi zorlaşmaktadır. Bu nedenle bu yöntem tavşan embriyolarının cinsiyetlendirilmesinde kullanılabilmektedir (Wakchaure ve ark., 2015). Ayrıca bu cisimciğin görülebilmesi hücre siklusuna bağlı olduğu için çok sayıda hücreleri kapsayan biyopsiye de ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden uygulama embriyonal erken dönem ile sınırlı olmaktadır. Bu yöntemde cinsiyeti doğru olarak belirleme oranı oldukça yüksek olmasına karşılık, kullanılan 5-6 günlük tavşan embriyolarının yaşama gücü de çok zayıf olmaktadır. Bununla birlikte, henüz *Barr cisimciği*'nin şekillenmediği dönemlerde yapılacak kontrollerde, diş embriyolar yanlışlıkla erkek olarak değerlendirilebilmektedir (King, 1991).

**Y kromozomuna özel DNA probu tekniği kullanımı:** Bu yöntem Y-kromozomu üzerindeki komplementar

yapı olan DNA fragmentlerinin kullanılması prensibine dayanmaktadır. Erkek cinsiyete özel DNA problemlerinin kullanılmasıyla sığır embriyolarında %100 doğruluk oranıyla cinsiyetin saptanabileceğini bildirilmiştir (Ellis ve ark., 1989). Y-spesifik prob tekniği embriyodan az sayıda hücrenin biyopsisi sonrasında proteinazlarla DNA'nın açığa çıkarılmasını ve daha sonra radyoaktif olarak etiketlenmiş Y-kromozom spesifik prob ile hibritlenmesini kapsamaktadır. Pozitif hibridizasyon sonuçları Y kromozomunun varlığını ve dolayısıyla erkek kromozom cinsiyetini göstermektedir. Y-spesifik prob ile 30 saat içerisinde sığır embriyolarının cinsiyet tayini sağlanmaktadır (Leonard ve ark., 1987).

**Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) metodu:** Polimeraz zincir reaksiyon metodu (PZR), spesifik DNA zincirlerinin enzimatik sentezi için geliştirilmiş in vitro bir metottur. Birçok araştırmacı sığır, at, koyun, fare ve insan embriyolarında PZR kullanarak cinsiyetin saptanabileceğini ifade etmişlerdir. Polimeraz zincir reaksiyonu tekniğinin keşfi sayesinde erkek cinsiyet kromozomuna özel primerler kullanılarak embriyoların cinsiyetlerinin belirlenmesi yaygın olarak kullanılan bir araç olmuştur. Biyopsi yapılarak alınan blastomer hücreleri, içerisinde eritme solüsyonu bulunan PZR tüplerine aktarılmaktadır. PZR yöntemiyle, gerek in vivo gerekse in vitro şartlarda üretilen embriyolarda X ve Y kromozomlarının amplifikasyonu ile embriyonun cinsiyet tayini kısa sürede ve yüksek güvenilirlikte (%95) tespit edilebilmektedir (Bredbacka ve ark., 1991).

#### **Non-invaziv yöntemler ile embriyoda cinsiyetin tayini**

**X kromozomuna bağlı enzim aktivasyonlarının saptanması:** Memeli hayvanlarda homogametlik cinsiyet iki X kromozomu taşıırken (XX), heterogametlik cinsiyet tek bir X kromozomu taşımaktadır (XY) (McGeady ve ark., 2011). Bu durumda, X kromozomuna bağlı belirli enzimlerin hücresel konsantrasyonu dişilerde erkeklere göre iki kat fazla olmaktadır. Buna dayanarak fare embriyolarında cinsiyet tayini için X kromozomuna bağlı enzim aktivasyonlarının belirlenmesi yöntemi geliştirilmiştir. Metodun ana hedefi süperovulasyon sonrası, morula ve blastosist safhasında bulunan fare embriyolarında, X kromozomuna kodlanmış enzimlerin (Glukoz 6-fosfat-dehidrogenaz (G-6-PD), Hypoxanthinephosphoriboxyl-Transferase) araştırılmasına dayanmaktadır (Niemann ve Meinecke, 1993).

**İmmünolojik yöntem (HY antijeninin belirlenmesi):** Cinsiyete spesifik antijenin immünolojik olarak ortaya konulması embriyoda cinsiyetin non-invaziv olarak belirlenmesine imkan tanımaktadır. Bu antijen ilk



olarak, erkek farelerden alınan deri parçalarının dişi farelere transplante edildiğinde, bu graftların dişi fareler tarafından reddedilmesiyle anlaşılmıştır. Diğer tüm kombinasyonlarda (erkek erkek, dişi-dişi, dişi-erkek) ise bu ret olayı görülmemektedir (Niemann ve Meinecke, 1993). Bu şekilde, erkek cinsiyete spesifik antijenin varlığı anlaşılmış, bu antijene Y kromozomu üzerinde bulunduğu için de "Histocompatibility-Y" veya "H-Y antijeni" adı verilmiştir. Hemen hemen tüm türlerin (>%70) erkek cinsiyetlerinde, somatik hücrelerinde bulunan H-Y antijenini embriyolar üzerinde belirlemek için sitolitik ve immunofluoresans yöntemler geliştirilmiştir (Anderson, 1987).

**Embriyonik gelişim dönemine göre metabolik aktivite farklılıklarının saptanması:** Araştırmalar erkek embriyoların dişi embriyolara göre daha hızlı geliştiğini göstermektedir. Buna göre, aynı anda fertilize olduğu kabul edilen embriyoların gelişme hızlarına bakarak, bu embriyoları dişi veya erkek olarak sınıflandırmak mümkün olabilmektedir (Avery ve ark., 1991). Yapılan bir çalışmada, tohumlamadan sonraki 8. günde hatched blastosist dönemindeki embriyoların büyük çoğunluğunun erkek olduğunu, ayrıca erkek embriyoların dişilere göre daha çok hücreye sahip olduklarını bildirmektedirler. Ancak cinsiyet ile embriyoların gelişme hızları arasındaki bu korelasyon her zaman doğru olmamaktadır. Çünkü süperovulasyonun gerçekleştirildiği hayvanlarda, ovulasyonlar uzun bir döneme sarkmakta (10-12 saat), tam ovulasyon zamanları da bilinmemektedir. Bu nedenle, in vivo şartlarda üretilen embriyolarda, belirli gelişme dönemlerindeki bölünme hızlarına göre embriyonik cinsiyet teşhisi relatif olarak şüpheli olmaktadır. Ancak, bu yöntem in vitro koşullarda üretilen ve gelişim aşamaları rahatlıkla gözlemlenebilen embriyolarda başarıyla uygulanabilir kabul edilmektedir (Niemann ve Meinecke, 1993; Xu ve ark., 1992).

### **Fötüste Cinsiyetin Tayini**

Gebelik şekillendikten sonra, fötüs vasıtasıyla prenatal cinsiyetin belirlenmesi amniosentez ve ultrasonografi ile yapılabilmektedir.

### **Amniosentez ile fötal cinsiyetin belirlenmesi:**

Gebelikte, uterus üzerinden yavru zarları geçilerek, fötüsü içerisinde barındıran sıvıya ulaşıp, örnek sıvı alınması işlemine "amniosentez" denilmektedir. Amniosentez, vaginal yolla veya açlık çukurluğundan uygulanan özel iğnelerle ya da laparotomi ile uterusu ulaşılarak 20-25 ml miktarındaki fötal sıvının aspire edilmesi şeklinde yapılmaktadır (Alaçam ve ark., 1991). Amniosentez ile kazanılan amnion sıvısı ile

fertilizasyondan yaklaşık 7-20 hafta sonra sitolojik, biyokimyasal veya endokrinolojik yöntemler ile (testiküler androjenin belirlenmesi) fötüsün cinsiyeti belirlenebilmektedir (Leibo ve Rall, 1987; Kamimura ve ark., 1997).

### **Ultrasonografi ile fötal cinsiyetin belirlenmesi:**

Ultrasonografi tekniğinin diğer yöntemlere göre en önemli avantajı, her türlü saha şartlarında uygulanabilme ve çabuk sonuç verme özelliğinin olmasıdır. Günümüzde gebelik tanısında en yaygın olarak kullanılan yöntem ultrasonografidir (Akköse ve Çebi Şen, 2019). Bu metot intra-uterin ortamda fötal skrotum, meme başı sürgünleri veya fötal genital çıkıntılarının (penis, preputium, vulva ve clitoris) yerleşimlerinin görüntülenmesi esasına göre değerlendirilmektedir (Stroud, 1996). Fötal genital çıkıntılar (Tuberkulum genitale) erkek cinsiyette penis, preputium, dişilerde ise vulva ve klitoris 'dir. Bu çıkıntılar gebeliğin henüz 45. gününde gelişmekte, ancak her iki cinsiyette de bu dönemde arka ekstremiteler arasında lokalize olmaktadır. Fötal cinsiyet tayini genital çıkıntılarının lokalizasyonuna göre yapılacaksa, en uygun zamanın gebeliğin 55-60. günleri arası olduğunu belirtilmektedir (Curran ve Ginther, 1991). Skrotum ve meme başı sürgünleri ile fötal cinsiyet belirlenecekse tohumlamadan sonraki 73-120. günler arasını tavsiye etmektedir (Müller ve Winkowski, 1986). Tüm cinsiyet organlarının birlikte gözlemlenmesiyle yapılacak cinsiyet teşhisinde gebeliğin 55- 120. günleri arasını önermektedirler (Wideman, 1989).

### **SONUÇ**

Spermada, embriyoda ve fötüsta çeşitli yöntemlerle cinsiyet kontrollerinin sağlanması, hem bilimsel hem de pratik açıdan büyük yarar sağlamaktadır. Ülkemiz hayvan yetiştiricilerinin yeterli düzeyde bilinçlendirilmesi, teşvik edilmesi ve bu tekniklerin sahaya aktarılması ülkemiz hayvancılığına ve ekonomisine önemli katkılar sunacağı kaçınılmaz bir gerçektir. Etçi ve sütçü amaçlı yetiştiriciliklerde doğacak olan bir yavrunun cinsiyetinin önceden belirlenebilir olması işletmelerin üretim ve ekonomik stratejilerinin oluşturabilmesi için oldukça önemli bir faktördür. Cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanılarak etçi sığır işletmelerinde erkek hayvan yetiştirme programları oldukça fayda sağlayabilirken, sütçü tipi işletmelerde dişi hayvan yetiştirme programları kullanılabilir. Ayrıca embriyoların veya fötüsün cinsiyetlerinin de önceden belirlenebilmesiyle işletme tipine uygun program izlenebilmektedir.



**KAYNAKLAR**

- Akköse M, Çebi Şen Ç. 2019. Early Pregnancy Diagnosis in Dairy Cattle. *Journal of Animal Production*, 60(2):171-179.
- Alaçam E, Tekeli T, Güven B, Dinç DA, Özsar S, Güler M. 1991. İneklere fetal sıvıdaki testosteron hormonu düzeylerinin araştırılması ile cinsiyet tayini. *Hay Araş Derg* 1:19-21.
- Anderson GB. 1987. Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigens. *Theriogenology*, 27:81-97.
- Avery B, Madison V, Greve T. 1991. Sex and development in bovine in vitro fertilized embryos. *Theriogenology*, 35:953-963.
- Bearden HJ, Fuquay JW, Willard ST. 2004. *Applied Animal Reprod*. 6th Edition. New Jersey: Upper Saddle River.
- Bhalakiya N, Haque1 N, Patel D, Chaudhari A, Patel G, Madhavatar M, Patel P, Hossain S, Kumar R. 2018. Sperm Sexing and its Application in Livestock Sector. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 7:259-272.
- Bhattacharya BC, Shome P, Gunther AH, Evans BM. 1977. Successful separation of X and Y spermatozoa in human and bull semen. *Int J Fert*, 22:30-35.
- Blecher SR, Howie R, Li S, Detmar J, Blahut LM. 1999. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology*, 52:1309-1321.
- Blottener S, Nehring H, Jenichem W, Peter W. 1983. Use of carrier free deflection electrophoresis in experiments for separation of sperm genotypes. *Arch. Exp. Veterinamed*, 37:641-655.
- Bredbacka P, Bredbacka K, Peippo J. 1991. Experiences of using PZR for sexing bovine embryos. *Reprod Dom Anim*, 26:75-77.
- Curran S, Ginther OJ. 1991. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. *Theriogenology*, 5:809-814.
- Demiral ÖO, Bekyürek T, Ün M, Abay M, Atabay NÖ. 2007. Tavşanlarda swim-up yönteminin yavru cinsiyet oranları üzerine etkisi. *Erciyes Üniv Sağlık Bil Derg*, 16(3):145-151.
- Demirci E. 2014. Flov Sitometre ile Boğa Spermilerinde Cinsiyetin Belirlenmesi. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 28(3):159-161.
- Ellis SB, Bondioli KR, Williams ME, Pryor JH, Harpold MM. 1989. Sex determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. *Theriogenology*, 229-242.
- Footo RH. 1985. Normal development of fetuses resulting from Holstein semen processed for sex separation. *Theriogenology*, 24:197-202.
- Garner DL. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, 65:943-957.
- George WF, Wilson JD. 1988. Sex Determination and Differentiation. In: E. Krobil, editors. *The Physiology of Reproduction*. J. Neil, New York: New York Raven Press p. 3-21.
- Gosálvez J, Ramirez MA, López-Fernández C, Crespo F, Evans KM, Kjelland ME ve ark. 2011. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology*, 75:197-205.
- Gürler H, Kaymaz M. 2013. Üreme Sisteminin Morfolojisi, Köpek ve Kedilerde Doğum ve Jinekoloji, 1. Baskı. Malatya: Medipres Matbaacılık Yayıncılık Ltd. Şti. p. 3-4.
- Johnson LA. 1992. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. *J Anim Sci*, 70:8-18.
- Johnson LA. 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: The state of the art. *Anim Reprod Sci*, 60-61:93-107.
- Kamimura S, Nishiyama N, Ookutsu S, Goto K, Hamana K. 1997. Determination of bovine fetal sex by PZR using fetal fluid aspirated by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis. *Theriogenology*, 47:1563-1569.
- Kaneko S, Oshiro S, Kobayashi T, Itzuka R, Mohri H. 1984. Human X- and Y- bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. *Biochem Biophys Res Commun*, 124:950-955.
- Khatamee MA, Horn SR, Alvin W, Farooq T, Jaffe SB, Jewelewicz R. A. 1999. Controlled study for gender selection Using swim up separation. *Gynecol Obstet Invest*, 48:7-13.
- King WA. 1991. Embryo-mediated pregnancy failure in cattle. *Can Vet J*, 32:99-103.
- King WA. 1984. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology*, 21:7-17.
- Kitiyanant Y, Saikhun J, Siriaroonrat B, Pavasuthipaisit K. 2000. Sex determination by polymerase chain reaction and karyotyping of bovine embryos at first cleavage in vitro. *Science Asia*, 26:9-13.
- Leibo SP, Rall WF. 1987. Determination of prenatal sex in cattle by amniocentesis. *Theriogenology*, 27:246.
- Leonard M, Kirszenbaum C, Cotinot C, Chesné P, Heyman Y, Stinnakre MG, Bishop C, Delouis C, Vaiman M, Fellous M. 1987. Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNAprobe. *Theriogenology*, 27:248.
- Maxwell WMC, Evans G, Hollinshead FK. 2004. Integration of sperm sexing technology into the art toolbox. *Anim Reprod Sci*, 82-83:79-85.
- McGeedy TA, Quinn PI, FitzPatrick ES, Ryan MT. 2011. Veteriner Embriyoloji. 1. Baskı, Malatya: Medipres Yayıncılık p. 263-266.
- Meistrich M. 1982. Potentials and limitations of physical methods for separations of sperm bearing an X or Y chromosome prospects for sexing Mammalian sperm. Colorado Associated Univ. Press, Boulder, Colorado. p. 145-163.
- Mittwoch U. 2005. Sex determination in mythology and history. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 49(1):7-13.
- Müller E., Winkowski. G. 1986. Visualization of male and female characteristic of bovine fetuses by real-time ultrasonics. *Theriogenology*, 25:571-574.
- Niemann H, Meinecke B. 1993. Embryotransfer und assoziierte biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Otto FJ, Hacker U, Zante J. 1979. Flow cytometry of human sperm. *Histochemistry*, 62:249-254.
- Sarkar S, Jolly DJ, Friedman T, Jones OW. 1984. Swimming behaviour of X and Y human sperm. *Differentiation*, 27:120-125.
- Seda O, Liska F, Sedova L. 2006. Sex Determination. In: Multimedia E-textbook of Medical Biology, Genetics and Genomics. Czech Republic, Prague.
- Seidel GE, Sche JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Gren RD, Cran DG. 1999. Insemination of heifer with sexed sperm. *Theriogenology*, 52:1407-1420.
- Sharma M, Sharma N. 2016. Sperm Sexing in Animals. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4(10):543-549.
- Stroud B. 1996. Using ultrasonography to determine bovine fetal sex. *Vet Med*, 7:663-672.
- Troedsson HT, Madill S. 2004. Pathophysiology of the Reproductive System. In: R.H. Dunlop, C.H. Malbert (Ed), *Veterinary Pathophysiology*, 214-220.
- Van Munster EB. 2002. Interferometry in flow to sort unstained X- and Y- bearing bull spermatozoa. *Cytometry*, 47:192-199.
- Wakchaur R, Ganguly S, Kumar P, Mahajan T. 2015. Methods for Embryos Sexing and Their Applications in Animal Breeding: A Review. *Octa. J Biosci*, 3(2):47-49.
- Weigel KA. 2003. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. *J Dairy Sci*, 87:120-130.
- Wideman D, Dorn C, Kraemer DC. 1989. Sex detection of the bovine fetus using linear array real-time ultrasonography. *Theriogenology*, 31:272.
- Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews*, 87:1-28.
- Xu KP, Yadav BR, King WA and Betteridge KJ. 1992. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro. *Mol Reprod Develop*, 31:249-252.
- Yang WC, Sang L, Xiao Y, Zhang HL, Tang KQ, Yang LG. 2014. Tentative identification of sex-specific antibodies and their application for screening bovine sperm proteins for sex-specificity. *Mol Biol Rep*, 41(1):217-23.

