

# Regulacja płci u bydła poprzez separację plemników X i Y – wstępne wyniki badań

MICHAŁ BOCHENEK, ZDZISŁAW SMORAĞ

Dział Biotechnologii Rozrodu, Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt Instytutu Zootechniki, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

Bochenek M., Smorağ Z.

## Cattle sex regulation by separation of X and Y spermatozoa – preliminary results

Summary

From the economic point of view the possibility of animal sex regulation is a very attractive idea. The only reliable and relatively easy method is X and Y sperm separation by flow cytometry. The history of the development of the method is described from the first sperm DNA volume measurement in the early eighties up until commercial application today. At the beginning of 2003 the National Research Institute of Animal Production started to introduce this method into cattle production. Currently it is possible to sort 15-20mln spermatozoa of each fraction per hour, with a purity of 90-96% for X fraction and 88-92% for Y fraction. Motility immediately after sorting is 90-95% and 50-70% after freezing/thawing. The sexed semen is frozen in straws with 2.5-3.0 million spermatozoa per straw.

The first calf born in Poland after insemination with sexed semen was from Balice, in September 2003. The pregnancy rate after rectal/USG examination ranges from 22.22% to 84.21% depending on the farm. Four calves – all females – were born after insemination with X fraction until June 2004.

**Keywords:** cattle, sperm sexing, flow cytometry

Możliwość regulacji płci jest ideą przyciągającą uwagę hodowców zwierząt z co najmniej dwóch powodów. Po pierwsze, możliwość dysponowania „na życzenie” większą liczbą samic w stadzie jest korzystna z punktu widzenia prac hodowlanych; po drugie, przewaga samców z ich wyższymi nawet o kilkanaście procent przyrostami masy ciała jest bardzo pożądana z ekonomicznego punktu widzenia w fermach przeznaczających zwierzęta na ubój.

Zainteresowanie metodami rozdziału plemników zwierząt notuje się już od czasu szerokiego wprowadzenia inseminacji do praktyki hodowlanej bydła. Ze względów praktycznych byłaby to najwygodniejsza metoda regulacji płci – jednorodne frakcje plemników przenoszących chromosomy X lub Y mogłyby być zamrażane i wykorzystywane do standardowej inseminacji. Początkowo jednak zasadniczą barierą pozostawał brak wiarygodnych i szybkich metod identyfikacji „płci” plemników, a także możliwości skutecznego odseparowania „rozpoznanych” już frakcji. Poczynając od lat pięćdziesiątych XX w. przeprowadzano próby fizycznego rozdziału nasienia buhajów na frakcje „męską” i „żeńską”. Opierały się one na wykorzystaniu zakładanych różnic pomiędzy plemnikami niosącymi chromosomy X i Y, a dotyczącymi wielkości i masy (7), szybkości poruszania się (1), ładunku elektrycznego (3), właściwości powierzchni plemników (5), jak również różnic o charakterze immunologicznym (2, 15). Wymienione metody okazały się jednak niezadowolające z powodu niskiej dokładności i wydajności lub też jako dające możliwość odseparowania tylko jednej frakcji nasienia. Rozdzielone w ten sposób nasienie posiadało ponadto niewielką zdolność zapładniającą. W rezultacie żadna ze wspomnianych metod nie znalazła praktycznego zastosowania.

Większość metod rozpoznawania plemników „męskich” i „żeńskich” opiera się na różnicy wielkości pomiędzy chromosomami X i Y. U większości gatunków ssaków chromosom Y jest najmniejszym bądź jednym z najmniejszych elementów w całym komplecie (6). Różnicę tę wykorzystuje również cytometria przepływowa – obecnie jedyna metoda dająca praktyczną możliwość seksowania plemników. Pomysł jej wykorzystania do rozdziału nasienia według „płci” narodził się na początku lat 80. XX w., kiedy Pinkel i wsp. (16) stwierdzili możliwość dokonania precyzyjnego pomiaru DNA oraz różnic jego zawartości pomiędzy plemnikami niosącymi chromosom X lub Y. Barwili oni utrwalone plemniki kilku gatunków ssaków bromkiem etyldyny, mitramycyną lub DAPI. Podobne badania z wykorzystaniem fluorochromu Hoechst 33342 przeprowadził Keeler i wsp. (13). Barwnik ten, stosowany do dzisiaj w seksowaniu nasienia, łatwo przenika przez nieuszkodzone błony żywych komórek, łączy się stechiometrycznie z DNA w okolicach par zasad A-T, a wzbudzany światłem ultrafioletowym fluoryzuje w paśmie 450 nm. Na podstawie wymienionych badań określono dokładne różnice w ilości DNA pomiędzy plemnikami X i Y (tab. 1).

**Tab. 1. Różnice w ilości DNA pomiędzy plemnikami niosącymi chromosomy X i Y**

Gatunek	Różnice w ilości DNA (%)
Człowiek	2,8
Królik	3,0
Knur	3,6
Koń	3,7
Buhaj	3,8
Pies	3,9
Tryk	4,2
Szynszyl	7,5

Pierwszych prób sortowania nasienia tą metodą dokonano w drugiej połowie lat 80. XX w. (9). Nasienie buhaja, knura i tryka zostało dla ułatwienia analizy pozbawione witek. Reanaliza nasienia świeżego, barwionego fluorochromem Hoechst 33342 wykazała, że dokładność separacji wynosiła 86% w przypadku plemników „żeńskich” oraz 81% w przypadku „męskich”. Kolejne badania (14) wykazały, że barwione Hoechstem 33342 i sortowane plemniki buhaja i królika mogą zachować ruchliwość i zdolność zapładniającą. Po inseminacji sortowanym nasieniem buhaja uzyskano istotne przesunięcie proporcji płci potomstwa. Zanotowano jednak znaczne obniżenie płodności, gdyż w wyniku inseminacji wycieliło się zaledwie 30% krów.

W pełni skutecznego rozdziału plemników dokonano w końcu lat 80. na nasieniu królika (10). Reanaliza nasienia świeżego, barwionego Hoechstem 33342 wykazała, że dokładność separacji wynosiła 86% w przypadku plemników „żeńskich” oraz 81% w przypadku „męskich”. Rozdzielone plemniki wprowadzane były chirurgicznie do macicy królic. Uzyskano ok. 28% wykotów; potomstwo urodzone po inseminacji frakcją X było w 94% płci żeńskiej, natomiast po inseminacji frakcją Y w 81% męskie. Nieco gorsze rezultaty osiągnięto sortując nasienie knura (8). W tym przypadku skuteczność rozdziału oceniano również na podstawie reanalizy i inseminacji chirurgicznej loch. Odsetek prosiąt płci żeńskiej po inseminacji „żeńską” frakcją wyniósł 74%, a płci męskiej po inseminacji „męską” frakcją – 68%. Wymienione prace wykazały, że istnieje realna możliwość seksowania nasienia. Badania te wskazały jednak równocześnie na pewne istotne ograniczenia metody, z których najważniejszym była niewielka szybkość sortowania, osiągająca przeciętnie 100-200 komórek/sekundę. Na szybkość tę, oprócz niskiej wydajności samych sorterów, wpływał w sposób pośredni specyficzny płaski kształt główek plemników, powodujący zjawisko soczewkowania fluorescencji. Polega ono na uginaniu fluorescencji pochodzącej z wnętrza ku krawędziom główki plemnika. Fluorescencja nie jest zatem dystrybuowana równomiernie wokół całej główki, lecz soczewkowana w kierunkach zbliżonych do jej płaszczyzny. W przypadku analiz ilości DNA plemników, gdzie spodziewane różnice fluorescencji są niewielkie, zjawisko to ma skrajnie niekorzystny charakter. Płynące w punkcie analizy plemniki ustawiają się w sposób losowy w kierunku detektorów, zatem różnice intensywności fluorescencji wynikające z jej soczewkowania całkowicie zagłuszają różnice spowodowane rzeczywistą ilością DNA w komórce. Zjawisko to wymagało zastosowania specjalnych modyfikacji cytometrów przepływowych, polegających na zmianie kształtu dyszy wylotowej i odczytywaniu fluorescencji DNA plemników równocześnie przez dwa detektory umieszczone pod kątem 90°. Zmodyfikowana w ten sposób dysza powodowała spłaszczenie strumienia cieczy z plemnikami do postaci wstęgi tak, by ich główki układały się w większości w tej samej płaszczyźnie, natomiast przeniesienie detektora pozwoliło na odczyt fluorescencji DNA również z części plemników ustawionych „nieprawidłowo”. Mimo takich rozwiązań nadal część plemników była odrzucana z analizy i sortowania, zmniejszając tym samym wydajność seksowania.

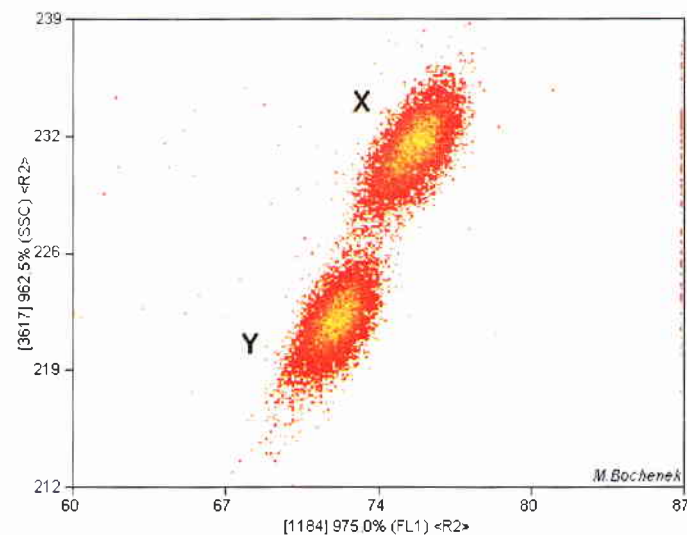
Osobnym problemem pozostaje wpływ barwnika i wzbudzającego go światła laserowego na zdolność zapładniają-

cą seksowanych plemników oraz późniejszy rozwój zarodka. Jak już wspomniano wyżej, fluorochromem stosowanym przy separacji nasienia jest Hoechst 33342, wzbudzany światłem UV o długości 350 nm. Wysuwane początkowo obawy dotyczące szkodliwości jego działania nie znalazły jak dotąd potwierdzenia. W przypadku barwionych tym związkem plemników buhaja obserwowano wprawdzie nieznaczne obniżenie zdolności do zapłodnienia *in vitro*, jednak nie dotyczyło ono wszystkich badanych ejakulatów. Podobnie nie potwierdziły się zastrzeżenia dotyczące uszkodzeń chromosomów czy też wad potomstwa jako rezultatu zapłodnienia barwionymi plemnikami (19). Także badania wpływu wiązki światła UV na plemniki nie potwierdziły wcześniejszych zastrzeżeń (7).

W obecnych cytometrach przepływowych specjalizowanych w seksowaniu nasienia (ryc. 1) wykorzystuje się omówione wyżej i udoskonalone modyfikacje razem z nowoczesną elektroniką. Pozwala to na osiągnięcie dobrej wizualizacji i separacji plemników X i Y (ryc. 2) przy przepływie do ok. 40 000 komórek/sek. i uzyskanie w ciągu godziny ok. 15 mln plemników o czystości frakcji ponad



Ryc. 1. Cytometr przepływowy MoFloSX (DakoCytomation, USA) przeznaczony do seksowania nasienia ssaków



Ryc. 2. Obraz plemników X i Y buhaja, uzyskany w cytometrze przepływowym MoFlo SX (Cytomation, USA). Na osiach x i y odczyt tej samej fluorescencji DNA z dwóch detektorów ustawionych pod kątem 90° (M. Bochenek)

Tab. 2. Wyniki inseminacji frakcją „żeńską” nasienia seksowanego (badania własne)

Buhaj	Obora	Liczba inseminacji	Cielne	
			szt.	%
I	A	4	2	50,00
	B	5	2	40,00
	C	7	4	57,14
	D	6	4	66,67
	E	3	2	66,67
	F	96	22	22,92
	G	8	5	62,50
	H	9	2	22,22
Razem (buhaj I)		138	43	31,16
II	I	19	16	84,21
III	J	21	7	33,33
Razem (wszystkie buhaje)		178	66	37,08

90% (12). Nasienie takie jest standardowo mrożone w słomkach, w porcjach zawierających 2-2,5 ml plemników. Po rozmrożeniu nasienie to wykazuje zwykle 50-60% ruchu postępowego, a jego płodność jest tylko niewiele niższa od nasienia „standardowego”. W szeroko zakrojonych doświadczeniach polowych, obejmujących inseminacje seksowanym nasieniem 1000 jałówek (18) osiągnięto 90% potomstwa zakładanej płci przy zachowaniu płodności inseminowanych jałówek na poziomie 90% w stosunku do grupy kontrolnej, inseminowanej zwykłym nasieniem.

W chwili obecnej, dwadzieścia lat po tym, jak cytometria przepływowa została z powodzeniem zastosowana do rozpoznania plemników X i Y, seksowane nasienie staje się już komercyjnie dostępne w USA i niektórych krajach Europy.

W Instytucie Zootechniki rozpoczęto na początku 2003 roku prace nad seksowaniem nasienia buhajów. Pierwsze próby seksowania przeprowadzono na nasieniu dwóch buhajów rasy polska czerwona. Właśnie po inseminacji frakcją X jednego z nich urodziło się we wrześniu 2003 r. pierwsze w Polsce cielę o zaprogramowanej płci żeńskiej.

Przyjęta przez nas procedura seksowania nasienia buhajów przedstawia się następująco:

Po pobraniu nasienie jest rozcieńczane do koncentracji 100 mln/ml i barwione fluorochromem Hoechst 33343 w celu zróżnicowania plemników X i Y. Dodatkowo stosujemy barwnik – Red Food Stain, który pozwala na eliminację w trakcie sortowania plemników martwych. Sortowanie przebiega z szybkością ok. 4000 plemników każdej z frakcji nasienia w ciągu sekundy, co pozwala na uzyskanie po 15-20 mln plemników frakcji X i Y w ciągu godziny. Bezpośrednio po sortowaniu ruchliwość plemników wynosi 90-95%, a po zamrożeniu i rozmrożeniu – 50-70%. Czystość sortowanych frakcji jest kontrolowana na bieżąco poprzez reanalizę w cytometrze przepływowym. Średnio, dla frakcji X wynosi ona 90-96%, a dla frakcji Y 88-92%. Nasienie o czystości poniżej 85% jest eliminowane. Seksowane nasienie mrożone jest w słomkach 0,25 ml, w ilości 2,5-3,0 mln plemników/słomkę. Dzięki stosowaniu barwnika pozwalającego na eliminację plemników mart-

wych seksowanie może być wykonywane nawet po upływie doby od pobrania ejakulatu.

Obecnie przeprowadzane jest seksowanie i mrożenie nasienia buhajów hodowlanych. Frakcja „żeńską” nasienia jest wykorzystywana w doświadczeniach terenowych, które objęły kilkadziesiąt inseminacji w celu określenia płodności i dokładności rozdziału plemników. Dotychczasowe (czerwiec 2004), potwierdzone badaniami rektalnymi lub USG, wyniki inseminacji przedstawione są w tabeli 2. Uwagę zwraca duża rozpiętość uzyskanych wyników płodności: od ok. 22% do ponad 84%. Wskazuje to z jednej strony na możliwość uzyskania wysokiej płodności po użyciu nasienia seksowanego, a z drugiej strony na istotny wpływ warunków utrzymania i żywienia zwierząt oraz przestrzegania zasad inseminacji na uzyskaną płodność.

Jak dotąd w wyniku inseminacji nasieniem frakcji X urodziły się 4 cielęta – wszystkie rasy żeńskiej.

Przedstawione doświadczenie terenowe będzie podstawą do podjęcia decyzji odnośnie skali i sposobu wprowadzenia seksowanego nasienia do praktyki inseminacji w naszym kraju.

## Piśmiennictwo

1. *Beernink F. J., Dmowski W. P., Ericsson R. J.*: Sex preselection through albumin separation of sperm. *Fertil Steril*. 1993, 59, 382-386.
2. *Bennett D., Boyse E. A.*: Sex ratio in progeny of mice inseminated with sperm treated with H-Y antiserum. *Nature* 1973, 246, 308-309.
3. *Blotner S., Bostedi H., Hewes K., Schill W. B.*: Electrophoretic enrichment of bovine X- and Y-spermatozoa quantified by use of Y-specific DNA and the F-body assay. *Proc. 12<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod.*, Hague 1992, 1, s. 411-414.
4. *Bochenek M.*: Fast examination of sperm membrane integrity by flow cytometry. *J. Physiol. Pharm.* 1996, 47, Suppl. 1, 144.
5. *Cartwright E. J., Harrington P. M., Cowin A., Sharpe P. T.*: Separation of bovine X and Y sperm based on surface differences. *Mol. Reprod. Dev.* 1993, 34, 323-328.
6. *George F. W., Wilson J. D.*: Sex determination and differentiation. [w:] *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York 1988, 3-26.
7. *Guthrie H. D., Johnson L. A., Garrett W. M., Welch G. R., Dobrinsky J. R.*: Flow cytometric sperm sorting: effects of varying laser power on embryo development in swine. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 61, 87-92.
8. *Johnson L. A.*: Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X- and Y-bearing sperm. *Reprod. Dom. Anim.* 1991, 26, 309-314.
9. *Johnson L. A., Clark R. N.*: Flow sorting of X and Y chromosome bearing mammalian sperm: activation and pronuclear development of sorted bull, boar and ram sperm microinjected into hamster oocytes. *Gamete Res.* 1988, 21, 335-343.
10. *Johnson L. A., Flook J. P., Hawk H. W.*: Sex preselection in rabbit: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 1989, 41, 199-203.
11. *Johnson L. A., Pinkel D.*: Modification of a laser-based flow cytometer for high-resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry* 1986, 7, 268-273.
12. *Johnson L. A., Welch G. R.*: Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 1999, 52, 1323-1341.
13. *Keeler K. D., Mackenzie N. M., Dresser D. W.*: Direct microfluorometric analysis of living spermatozoa stained with Hoechst 33342. *J. Reprod. Fertil.* 1983, 68, 205-212.
14. *Morrell J. M., Dresser D. W.*: Offspring from insemination with mammalian sperm stained with Hoechst 33342, either with or without flow cytometry. *Mut. Res.* 1989, 224, 177-183.
15. *Peter A. T., Jones P. P., Robinson J. P.*: Fractionation of bovine spermatozoa for sex selection: a rapid immunomagnetic technique to remove spermatozoa that contain the H-Y antigen. *Theriogenology* 1993, 40, 1177-1185.
16. *Pinkel D., Lake S., Gledhill B. L., Van Dilla M. A., Stephenson D., Watchmaker G.*: High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. *Cytometry* 1982, 3, 1-9.
17. *Schilling E.*: Experiments in sedimentation and centrifugation of bull spermatozoa and the sex ratio of born calves. *J. Reprod. Fertil.* 1966, 11, 469-472.
18. *Seidel G. E., Schenk J. L., Herickhoff L. A., Doyle S. P., Brink Z., Green R. D., Cran D. G.*: Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 1999, 52, 1407-1420.
19. *Smorag Z., Rynska B., Kątska L., Słota E.*: Fertilizability of bull spermatozoa stained for flow cytometry. *Anim. Sci., Papers Rep.* 1993, 11, 117-120.