

neklerde Prenatal Embriyonik/Fötal Cinsiyetin Belirlenmesi

Sait ENDA¹, brahim AYDIN², Hacı Ahmet ÇELİK³

¹ Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doçum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Van-TÜRK YE

² Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doçum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Konya-TÜRK YE

³ Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doçum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Afyon-TÜRK YE

Özet: Gebe ineklerde doğacak yavruların cinsiyetlerinin önceden belirlenmesi, yeti tiricilikte bazı avantajları beraberinde getirmektedir. Cinsiyet tespiti, et veya süt üretimi yapan işletmelerin üretim stratejilerini önceden planlamalarına olanak sağlar gibi, biyoteknolojik çalışmalar (suni tohumlama, embriyo transferi vs.) programlarının da önceden yapılmasını kolaylaştırır. Günümüzde prenatal embriyonik ya da fötal cinsiyetin belirlenmesine yönelik çalışmalar spermatozoa, embriyo ve fötüsler üzerinde de iki yöntemler uygulanarak gerçekleştirilmektedir. Sunulan derlemede bu yöntemler hakkında ayrıntılı bilgiler verilecektir.

Anahtar Kelimeler: Cinsiyet, inek, prenatal.

Prenatal Embryonic or Fetal Sex Determination in Cows

Summary: To determine the sex of the offsprings in advance has some advantages in terms of animal breeding. To detect the sex facilitates the programming of biotechnologic studies (artificial insemination, embryo transfer etc.) as well as it helps the ones who are engaged in meat and dairy production to form their strategies in advance. Current studies regarding the determination of prenatal embryonic or fetal sex are conducted through various applications of methods on spermatozoa, embryo or fetus. In this review detailed information about these methods are given.

Key Words: Sex, cow, prenatal.

Giriş

Besicilik yapılan işletmelerde doğacak yavruların erkek, süt üretimi yapılan işletmelerde de dişi olması arzu edilir. Bu yüzden gebe ineklerde doğacak yavruların cinsiyetlerinin önceden belirlenmesi, yeti tiricilikte bazı avantajları beraberinde getirir. Doğacak yavrunun cinsiyetine göre her işletme, programına uygun gebe inek satın alabilir, üretim stratejisini de 6-7 ay öncesinden planlayabilir. Cinsiyet tayini biyoteknolojik çalışmalarda da avantaj sağlar. Yavru cinsiyetlerinin önceden bilinmesi, ileriye dönük suni tohumlama ve embriyo transferi programının yapılmasını kolaylaştırır. Günümüzde prenatal fötal cinsiyetin belirlenmesine yönelik çalışmalar spermatozoa, embriyo ve fötüsler üzerinde de iki yöntemler uygulanarak gerçekleştirilmektedir. Bu derlemede, ülkemizde henüz pratik olarak aktarılmamış bu yöntemler hakkında ayrıntılı bilgiler verilecektir.

Spermada Cinsiyetin Saptanması

Memeli hayvanlarda doğacak yavruların cinsiyetleri fertilizasyon sırasında ekillenmektedir. Fertilizasyon sırasında X kromozomu taşıyan haploid ovum, X kromozomu taşıyan haploid spermatozoa ile birleştiğinde (XX), Y kromozomu

ile birleşirse erkek (XY) cinsiyet oluşmaktadır. Tohumlamalar öncesi spermatozoalar X veya Y kromozomlarına göre ayrılıp sınıflandırılabilirse, bu spermatozoalar ile yapılan tohumlamalar sonrası embriyoların cinsiyetleri de saptanabilir olur (2, 19, 28).

Spermada X ve Y kromozomlarının ayırt edilerek cinsiyet saptanmasında, santrifüjasyon, elektroforez, sedimentasyon, filtrasyon, muhafaza mediumundaki pH değeri, iklimleri, immunolojik teknikler ve motilite kriterleri gibi yöntemler ile elde edilen sonuçlar çok farklı olup, pratikte güvenilir değildir (8, 19, 28).

X veya Y kromozomları taşıyan spermatozoonlar arasındaki en önemli kanıtlanabilir fark, bu kromozomlardaki cinsiyete göre değişen DNA miktarıdır. X kromozomu Y kromozomuna göre önemli ölçüde büyük olduğu için, Y kromozomuna göre yaklaşık % 3 daha fazla DNA ihtiva etmektedir (28). Johnson ve ark (19) bu farklılığı dayanarak spermatozoonların flow sitometri analiz yöntemiyle, cinsiyete göre iki gruba ayrılabilirliğini bildirmektedirler. Ancak günümüzde bu yöntemin de pratikte kullanımını sınırlandıran üç önemli dezavantajı bulunmaktadır. Bunlar: Saat başı ayrılabilir spermatozoa sayısı oldukça az olup, 3.5×10^5 dir. Yöntem oldukça masraflıdır. Yine metotta kullanılan fluorokrom, spermatozoaların vitalitesi üzerinde olumsuz etki oluşturarak, embriyonik ölüm oranını arttırmaktadır (5, 28).

Embriyoda Cinsiyetin Saptanması

Günümüzde, embriyolar üzerinde 5 farklı yöntemle cinsiyet belirlenebilmektedir (13, 28).

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.

Sitogenetik Yöntem ile Embriyonik Cinsiyetin Belirlenmesi

Bu yöntemde, embriyodan biyopsiyle sınırlı sayıda hücre alınır. Bu hücreler, mitozdaki hücre bölünmesini durdurmak için, metafaz bloke edici bir madde (örn. colcemid) ihtiva eden besi yerlerinde kültüre edilir. Bu besi yerlerinde gelişmeye bırakılan hücrelerde kromozomlar birbirlerinden ayrılır. Lam üzerine aktarılan hücreler fikse edilip, DNA'ya spesifik bir boya maddesi ile (örn. Giemsa) boyandıktan sonra mikroskop altında incelenir. Metafaz aamasında gelişmesi durdurulmuş hücrelerde kromozom ayrıntısı analiz edilebilmektedir. Bu analizde cinsiyet testi için iki X kromozomu veya bir Y kromozomunun görülmesi yeterli olmaktadır. Metodun doğruluk oranı % 100'e çok yakındır (22, 32, 37).

inek, koyun ve tavşan embriyolarında transferden önce, 4 dişi iki sitogenetik yöntemle başarıyla ekilde cinsiyet tayini yapılabilmektedir (28).

1. Cinsiyet kromatinin (barr cisimciği) identifiye edilmesi

Barr cisimciği sadece dişilerde, somatik hücrelerde görülen inaktif bir X kromozomudur. Dişer evcil hayvanlarda yavru bir sitoplazma tarafından gizlendiği için, sadece çok hücreli tavşan embriyolarında ortaya konabilmektedir. 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 (28).

Bu yöntemde cinsiyeti do ru olarak belirleme oranı oldukça yüksek olmasına karşılık, kullanılan 5-6 günlük tavşan embriyolarının yavru ama gücü de çok zayıf olmaktadır. Bununla birlikte, henüz barr cisimciğinin ekillenmediği dönemlerde yapılacak kontrollerde, dişi embriyolar yanlışlıkla erkek olarak değerlendirilebilir (23).

2. 10-15 günlük sıvı embriyolarında trofoblast biyopsisi

Bu yöntemde embriyoların % 65-70'inde cinsiyet do ru olarak saptanabilmektedir. Zaman alıcı olan bu metotta, deneyimli iki sitogenetikçi 12-15 embriyo üzerinde çalışmak için beş saate ihtiyaç duyar. Embriyolar in vitro ortamda birkaç saatten fazla korunmamaktadır (28). Bu nedenle, aynı günde transferin gerçekleştirilmesi için, cinsiyet testisini zamanında ve do ru olarak yapabilmek zor olmaktadır (22, 37).

3. 6-7 günlük sıvı embriyolarında trofoblast biyopsisi

Bu analizde, embriyodan mikro irurjikal yolla alınan 10-15 hücre, sitogenetik kromozom analizi için hazırlanır. Embriyoların toplanması, transferi ve dondurulması, cerrahi olmayan embriyo transferi için ideal şartları kapsamaktadır. Yöntemin başarı oranı % 33 ile % 60 arasında değişmektedir (28). Picard ve ark (31), bu yöntemi kullanarak 36 embriyonun yaklaşık % 60'ında; Rall ve Leibo (32) ise, 177 embriyodan 110'unda (% 62) embriyonik cinsiyeti saptayabildilerdir.

4. Embriyonun mikro irurjikal olarak bölünmesi

iki eiti parçaya bölünen embriyo parçalarında, sitogenetik tekniklerle cinsiyet % 60 oranında belirlenebilmektedir. Biyopsiyle alınan hücrelerin uzun süreli kültüre edilmesi veya dişer embriyo yarımlarının kullanılmasıyla başarı oranı artabilmektedir. Ancak uzun süreli in vitro kültürün istenmeyen gelişim komplikasyonlarını beraberinde getirebileceği unutulmamalıdır. Yine de bu yöntem dişer cinsiyet belirleyici analizlerin doğrulanmasında kullanılabilen destekleyici bir analiz ekli olabilmektedir (28).

Immunolojik Yöntemle Embriyonik Cinsiyetin Belirlenmesi (HY antijeninin belirlenmesi)

Cinsiyete spesifik antijenin immunolojik olarak ortaya konulması, embriyoda cinsiyetin noninvasif olarak belirlenmesine imkan tanımaktadır (18, 39, 41). Bu antijen ilk olarak, erkek farelerden alınan

deri parçalarının di i farelere transplante edildi inde, bu graftların di i fareler tarafından reddedilmesiyle anlaşılmıştır. Di er tüm kombinasyonlarda (erkek-erkek, di i-di i, di i-erkek) ise bu ret olayı görülmemektedir (28). Bu eklede, erkek cinsiyete spesifik antijenin varlığı anlaşılmıştır, 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 yöntemleri geliştirilmiştir (2, 37).

Sitolitik yöntem

Bu yöntemde embriyolar sulandırılmış H-Y antiserum ve komplemanı içerisine bırakılır. H-Y antijenini taşıyan embriyoların gelişmeleri durur veya hücrelerinde erimeler olur. Embriyolar bu eklede erkek olarak sınıflandırılır. Gelişmelerinde herhangi bir bozukluk gözlenmeyen di er embriyolar da di i olarak değerlendirilerek transferde kullanılır (28, 37). White ve ark (40), sitotoksik yöntem ile 8-16 hücreli fare embriyolarında yaptıkları çalışmada, ölçümden etkilenmeyen ve di i olarak kabul edilen embriyoların alıcı hayvanlara transferinden sonra doğan yavruların % 86'sının di i olduğunu gözlemledir.

Immunofluoresans yöntem

Bu yöntemde, sitolitik metodun aksine, erkek embriyoların gelişme kabiliyetleri etkilenmemektedir. Embriyolar yaklaşık 30-45 dakikalık in vivo primer antikorlarla inkübe edilir, yıkanır ve sonuçta fluoresans boya maddesiyle (Fluorescein Isothiocyanate = FITC) etiketlenen ikinci antikorla inkübe edilir. Yeniden yıkanan embriyolar, fluoresans mikroskobu ile spesifik fluoresans mevcudiyeti açısından incelenir. Erkek embriyolar uygun bir fluoresans reaksiyonu ile tanınır (2, 28, 37). Bir çalışmada (42) immunofluoresans yöntemi ile incelenen 258 sırt embriyosunda, 132 embriyo erkek, 126 embriyoda di i olarak ayrılmıştır. Erkek olarak ayrılan embriyolardan 84 tanesinin karyotipinin hazırlanmasıyla, bunlardan % 79'unun erkek olduğu gözlenmiştir. Di i olarak ayrılan embriyolardan 65 tanesinin karyotiplerinin hazırlanmasıyla da % 89'unun di i olduğu anlaşılmıştır.

X Kromozomuna Bağlı Enzim Aktivasyonlarını Saptayarak Embriyonik Cinsiyetin Belirlenmesi

Memeli hayvanlarda homogenetik cinsiyet iki X kromozomu (XX) taşıırken, heterogenetik cinsiyet

tek bir X kromozomu taşımaktadır (XY). Bu durumda di ilerde, X-kromozomuna bağlı belirli enzimlerin selüler konsantrasyonu ile aktiviteleri erkeklere göre iki kat fazla olmaktadır (18, 37, 44). Bu hipoteze dayanarak, fare embriyolarında cinsiyet testi 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), Hypoxanthine-phosphoriboxyl-Transferase) araştırılmasıdır (28).

Embriyonik Gelişim Dönemine Göre Embriyonik Cinsiyetin Belirlenmesi (erkek ve di i embriyolar arasındaki metabolik aktivite farklılıklarının saptanması)

Araştırmalar erkek embriyoların di i embriyolara göre daha hızlı geliştiğini göstermektedir. Buna göre, aynı anda döllenmiş embriyoların gelişme hızlarına bakarak, bu embriyoları di i veya erkek olarak sınıflandırmak mümkün olabilmektedir (3, 4). Xu ve ark (45), tohumlamadan sonraki 8. günde hatched blastosist dönemindeki embriyoların büyük çoğunluğunun erkek olduğunu, ayrıca erkek embriyoların di ilere 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 sarmakta (10-12 saat), tam ovulasyon zamanları da bilinmemektedir. Bu nedenle, in vivo ortamda üretilen embriyolarda, belirli gelişme dönemlerindeki bölünme hızlarına göre embriyonik cinsiyet testi nispeten olarak zayıf olmaktadır. Bu yöntem in vitro koşullarda üretilen embriyolarda başarıyla uygulanabilir (28).

Y Kromozomuna Özel DNA Zincirlerinin Kullanılmasıyla Embriyonik Cinsiyetin Belirlenmesi

Bu yöntemin esasında, Y-kromozomu üzerindeki komplementer yapı olan DNA-fragmentlerinin kullanılması yatar (28). Ellis ve ark (12), erkek cinsiyete özel DNA problemlerinin kullanılmasıyla sırtlarında %100 doğruluk oranıyla cinsiyetin saptanabileceğini bildirmektedirler.

Bu yöntem ile, 6^{1/2}-7 günlük inek embriyolarında cinsiyet testi için üç önemli basamağa ihtiyaç duyulur. Bunlar:

Embriyodan hücre alınması (biyopsi),

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR),

Spesifik PCR fragmentinin elektroforetik olarak belirlenmesi (28).

Biyopsi i lemi, embriyolardan 100-200 büyütme altında, mikromanüplasyon ile 1-10 adet blastomer alınmasını kapsar. Biyopsi materyalinin alınmasından cinsiyet te hisine kadar 3-5 saat geçmektedir. Bu durum embriyoların taze transferine olanak sa lamaktadır (33).

PCR ise, spesifik DNA zincirlerinin enzimatik sentezi için geli tirilmi in vitro bir metottur (7, 29, 30, 33). Birçok ara tırıcı sı ır (17, 30, 35, 36), at (29), koyun (16), fare (6) ve insan (15) embriyolarında PCR kullanarak cinsiyetin saptanabilece ini ifade etmektedirler. Yine gebe hayvanlardan alınan kan örneklerinde de PCR tekni iyle erkek yavruya ait genetik materyal ortaya konabilmektedir (20).

PCR uygulamasından sonra DNA çözeltili agarosejel içerisine aktarılarak elektroforez i lemne geçilir. Bu i lemle, aranan sekansların di er proteinlerden ayırt edilmesi mümkün olabilmektedir. Yakla ık 30-60 dakika sonra aranan gruplar identifiye edilebilmektedir. Erkek bir embriyo söz konusu oldu unda, belirli bir Y-kromozomun parçasına spesifik olan florasan veren band gözlenebilir. Bu spesifik bandın görülememesi de embriyonun di i oldu unu gösterir. Bu yöntemdeki ba arı oranları da oldukça yüksektir. Biyopsi alınan embriyolarda % 95'den daha fazla oranlarda DNA analizi yapılabilmekte, prenatal cinsiyet tayini de % 95 ile % 100'lük do ruluk oranlarıyla belirlenebilmektedir. (28).

Fötüste Cinsiyet Te hisi

Gebelik ekillendikten sonra, fötüs vasıtasıyla prenatal cinsiyetin belirlenmesi, amniosentez (1, 20, 24, 25) ve ultrasonografi (9, 14, 21, 26, 38, 34) ile yapılabilmektedir.

Amniosentez ile Fötal Cinsiyetin Belirlenmesi

Gebelikte, uterus üzerinden yavru zarları geçilecek, fötüsü içerisinde barındıran sıvıya ula ılıp, örnek sıvı alınması i lemne amniosentez denilmektedir. Amniosentez, vaginal yolla veya açlık çukurlu undan uygulanan özel i nelerle ya da laparotomi ile uterusu ula ılarak 20-25 ml miktarındaki fötal sıvının aspire edilmesi ekinde yapılmaktadır (1). Amniosentez ile kazanılan amnion sıvısı ile, fertilizasyondan yakla ık 7-20 hafta sonra sitolojik, biyokimyasal veya endokrinolojik yöntemler ile (testiküler androgenin belirlenmesi) fötüsün cinsiyeti belirlenebilmektedir (20, 24, 25).

Yapılan post-mortem bir çalı mada Alaçam ve ark (1), gebeli in 90-120. günleri arasında amniosentez ile elde edilen sıvılarda, RIA yöntemi ile testosteron hormonu düzeylerinin tayini ile fötal cinsiyetin belirlenebilece ini bildirmektedirler.

Leibo ve Rall (24), amniosentez tekni iyle gebeliklerinin 50-90. günleri arasında bulunan 775 inekten 732 adetinde fötal cinsiyeti (359 erkek, 373 di i) belirleyebilmi lerdir.

Sitolojik yöntemde her iki fötal cinsiyet % 95 do ruluk oranıyla belirlenebilirken, bu oran erkek cinsiyette % 100'ü, di i cinsiyette de % 95'i bulmaktadır (28).

Ultrasonografi ile Fötal Cinsiyetin Belirlenmesi

Ultrasonografi tekni inin di er yöntemlere göre en önemli avantajı, her türlü saha artlarında uygulanabilme ve çabuk sonuç verme özelli inin olmasıdır. Bu metotta hedef, fötal scrotum ile meme ba ı sürgünü veya fötal genital çıkıntılarının yerle iminin görüntülenmesidir (10, 11, 14, 21, 26, 34, 38, 43).

Gebeli in erken dönemlerinde, meme ba ı sürgünlerinin gözlenmesiyle di i yavruların belirlenmesi oldukça güçtür. Çünkü ultrasonografide nokta ekinde gözlenen meme ba ı sürgünleri, bölgedeki di er noktamsı yapılarla karı abilmektedir (21). Bu nedenle, gebeli in erken dönemlerindeki cinsiyet te hisinde genital çıkıntılarının muayenesi önem kazanır (9). Fötal genital çıkıntılar (Tuberkulum genitale) erkek cinsiyette penis, preputium, di ilerde de vulva ve klitoris'dir. Bu çıkıntılar gebeli in henüz 45. gününde geli mekte, ancak her iki cinsiyette de bu dönemde arka ekstremiteler arasında lokalize olmaktadır (38). Kähn (21), ba langıçta her iki cinsiyette de arka ekstremiteler arasında lokalize olan bu genital çıkıntılarının, gebeli in 40-60. günleri arasında erkek cinsiyette göbek kordonuna, di i cinsiyette de kuyruk köküne do ru göç etti ini bildirmektedir.

Curran ve ark (9), gebeli in 48-60. günleri arasında bulunan 16 düve üzerinde yaptıkları çalı mada, genital çıkıntılarının morfolojisi ve yerle imlerini belirlemeyi amaçlamı larıdır. Bu ara tırıcılar, genital çıkıntılarının her iki cinsiyette gebeli in 48-49. günlerinde arka bacaklar arasında yer aldı ını, erkeklerde 56.0 ± 0.8 günde göbek kordonunun hemen kaudalinde, di ilerde ise 53.8 ± 0.2 günde kuyruğun altında yer aldı ını bildirmektedirler. Aynı ara tırıcılar genital çıkıntılarının saptanmasıyla yapılacak cinsiyet tayininde, gebeli in 55-60. günleri arasında maksimal do ruluk oranının elde edilebilece ini vurgulamaktadırlar.

Müller ve Wittkowski (27), scrotum ve meme bezinin hedef alınıp görüntülenmesiyle, tohumlamadan sonraki 73-120. günler arasında % 94 do ruluk oranıyla fõtal cinsiyetin belirlenebilece ini bildirmektedirler. Dinç ve ark (11) da genital çıkıntılarla beraber, skrotum ve meme ba ı sürgünlerinin gözlenmesiye, gebeli in 55-120. günleri arasında bulunan düve ve ineklerde fõtal cinsiyetin % 78.4'lük do ruluk oranıyla belirlenebilece ini bildirmektedirler.

Kaynaklar

1. Alaçam E, Tekeli T, Güven B, Dinç DA, Özsar S ve Güler M, 1991. neklerde fõtal sıvılardaki testosteron hormonu düzeylerinin ara tırılması ile cinsiyet tayini. *Hay Ara Derg.*, 1, 1: 19-21.
2. Anderson GB, 1987. Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigens. *Theriogenology*, 27: 81-97.
3. Avery B, Madison V and Greve T, 1991. Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos. *Theriogenology*, 35: 953-963.
4. Avery B, Jorgensen CB, Madison V and Greve T, 1992. Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos. *Mol Reprod Develop.*, 32: 265-270.
5. Binder H, Jakob CH und Bucher P, 1996. Reproduktionsmedizin im wandel: Neue entwicklungen beim embryotransfer. *Schweizer archiv für tierheilkunde*, 138, 5: 215-219.
6. Bradbury MW, Isola LM and Gordon JM, 1990. Enzymatic amplification of a Y chromosome repeat in a single blastomere allows identification of the sex of preimplantation mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci.*, 87: 4053-4057.
7. Bredbacka P, Bredbacka K and Peippo J, 1991. Experiences of using PCR for sexing bovine embryos. *Reprod Dom Anim.*, 26: 75-77.
8. Carvalho RV, Del Campo MR, Palasz AT, Plante Y and Mapletoft RJ, 1996. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7. *Theriogenology*, 45: 489-498.
9. Curran S, Kastelic JP and Ginther OJ, 1989. Determining sex of the bovine fetus by ultrasonic assessment of the relative location of the genital tubercle. *Anim Reprod Sci.*, 19: 217-227.
10. Curran S and Ginther OJ, 1991. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. *Theriogenology*, 5: 809-814.
11. Dinç DA, enda S, Çelik HA, Aydın , Ümütlü S ve Aral F, 2002. nek ve düvelerde real-time, B-mode ultrasonografi ile fõtal cinsiyetin belirlenmesi. *Vet Bil Derg.*, 18, (3-4): 5-11.
12. Ellis SB, Bondioli KR, Williams ME, Pryor JH and Harpold MM, 1989. Sex determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. *Theriogenology*, 29: 242.
13. Espinasse J, 1990. Biotechnologien und buiatrik. *Tierärztl. Umschau*, 45: 666-677.
14. Franck M and Martinot S, 1993. Diagnosis of fetal sex by ultrasonography. *Sciences Veterinaires Medecine Comparee*, 3: 201-208.
15. Handyside AH, Penketh RJA, Winston RML, Pattinson JK, Delhanty JDA and Tuddenham EGD, 1989. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet*, 1: 347-349.
16. Herr CM, Holt NA, Matthaei KI and Reed KC, 1990a. Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y-chromosome-detection assay. *Theriogenology*, 33: 247.
17. Horvat S, Medrano JF, Behboodi E, Anderson GB and Murray JD, 1996. Sexing and detection of gene construct in microinjected bovine blastocysts using the polymerase chain reaction. *Transgenic Research*, 2: 134-140.
18. Jafar SI and Flint APF, 1996. Sex selection in mammals: A Review. *Theriogenology*, 46: 191-200.
19. Johnson LA, Cran DG and Polge C, 1994. Recent advances in sex preselection of cattle: Flow cytometric sorting of X- Y- chromosome bearing sperm based on DNA to progeny. *Theriogenology*, 41: 51-56.
20. Kamimura S, Nishiyama N, Ookutsu S, Goto K and Hamana K, 1997. Determination of bovine fetal sex by PCR using fetal fluid aspirated by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis. *Theriogenology*, 47: 1563-1569.
21. Kähn W, 1991. *Atlas und Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik*. Schlütersche, Hannover.
22. King WA, 1984. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology*, 21: 7-17.

23. King WA, 1991. Embryo-mediated pregnancy failure in cattle. *Can Vet J*, 32: 99-103.
24. Leibo SP and Rall WF, 1987. Determination of prenatal sex in cattle by amniocentesis. *Theriogenology*, 27: 246.
25. Leibo SP and Rall WF, 1990. Prenatal diagnosis of sex in bovine fetuses by amniocentesis. *Theriogenology*, 32: 531-551.
26. Müller E, Rath D, Klug E und Merkt H, 1986. Die anwendbarkeit der sonographie zur diagnostik am weiblichen genitale des rindes. *Berl Münch Tierärztl Wschr.*, 99: 311-318.
27. Müller E and Wittkowski G, 1986. Visualization of male and female characteristic of bovine fetuses by real-time ultrasonics. *Theriogenology*, 25: 571-574.
28. Niemann H und Meinecke B, 1993. *Embryotransfer und assoziierte biotechniken bei landwirtschaftlichen nutztieren*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
29. Peippo J, Huhtinen M and Kotilainen T, 1995. Sex diagnosis of equine embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology*, 44: 619-627.
30. Peura T, Hyttinen JM, Trunen M and Jänne J, 1991. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using polymerase chain reaction. *Theriogenology*, 35: 547-555.
31. Picard L, King WA and Betteridge KJ, 1985. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Vet Rec.*, 117: 603-608.
32. Rall WF and Leibo SP, 1987. Production of sexed bovine pregnancies by cytogenetic analysis of cultured demi-embryos. *Theriogenology*, 27: 269.
33. Schwerin M, Warnat G, Giehm D, Wolf H and Thomsen PD, 1991. Multilocus genetic typing of bovine single cells by multiplex polymerase chain reaction. *Reprod Dom Anim.*, 26: 70-74.
34. Stroud B, 1996. Using ultrasonography to determine bovine fetal sex. *Food Anim Pract.*, 7: 663-672.
35. Thibier M and Nibart M, 1992. Bovine embryo sexing by a DNA probe on the field. *Reprod Dom Anim.*, 27: 29-33.
36. Thibier M and Nibart M, 1995. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology*, 43: 71-80.
37. Van Vliet RA, Verrinder Gibbins AM and Walton JS, 1989. Livestock embryo sexing: A review of current methods, with emphasis on Y-specific DNA probes. *Theriogenology*, 32: 421-438.
38. Viana IG und Marx D, 1994. Geschlechtsbestimmung von rinderfeten mittels ultraschall. *Tierärztl. Umschau*, 49: 484-486.
39. Wachtel SS, 1984. H-Y Antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology*, 21: 18-28.
40. White KL, Lindner GM, Anderson GB and Bondurant RH, 1982. Survival after transfer of "sexed" mouse embryos exposed to H-Y antisera. *Theriogenology*, 18: 655-662.
41. White KL, Bradbury MW, Anderson GB and Bondurant RH, 1984. Immunofluorescent detection of a male-specific factor on preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*, 21: 275.
42. White KL, Anderson GB and Bondurant RH, 1987. Expression of a male-specific factor on various stages of preimplantation bovine embryos. *Biol Reprod.*, 37: 867-873.
43. Wideman D, Dorn CG and Kraemer DC, 1989. Sex detection of the bovine fetus using linear array real-time ultrasonography. *Theriogenology*, 31: 272.
44. Williams TJ, 1986. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, Glucose-6-Phosphatase Dehydrogenase. *Theriogenology*, 25: 733-739.
45. 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.

Yazı ma Adresi:

Ar . Gör. Dr. brahim AYDIN
 Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 Do um ve Jinekoloji Anabilim Dalı
 42075 KONYA
 Tel: 0.332.2232742
 Fax: 0.332.2410063
 e-mail: iaydin@selcuk.edu.tr

